

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



**BIOSÍNTESIS Y ACTIVIDAD DE BACTERIOCINAS PRODUCIDAS
POR CEPAS MEXICANAS DE *Bacillus thuringiensis*
CON POTENCIAL APLICACIÓN
COMO BIOCONSERVADORES
EN ALIMENTOS**

Por

NORMA MARGARITA DE LA FUENTE SALCIDO

**Como requisito parcial para obtener el Grado de
DOCTOR EN CIENCIAS
ACENTUACIÓN ALIMENTOS**

Septiembre, 2009

**BIOSINTESIS Y ACTIVIDAD DE BACTERIOCINAS PRODUCIDAS
POR CEPAS MEXICANAS DE *Bacillus thuringiensis*
CON POTENCIAL APLICACIÓN
COMO BIOCONSERVADORES
EN ALIMENTOS**



Dra. Ma Guadalupe Alanis Guzmán

Dr. José Eleazar Barboza Corona
Director Externo

BIOSINTESIS Y ACTIVIDAD DE BACTERIOCINAS PRODUCIDAS POR CEPAS MEXICANAS DE *Bacillus thuringiensis* CON POTENCIAL APLICACIÓN COMO BIOCONSERVADORES EN ALIMENTOS



Comité de Tesis

Dra Ma. Guadalupe Alanis Guzmán
Director de la tesis

Dr. J. Eleazar Barboza Corona
Secretario

Dra. Graciela García Díaz
Vocal

Dr. Rubén Salcedo Hernández
Vocal

Dr Carlos E. Hernández Luna

Vocal

BIOSINTESIS Y ACTIVIDAD DE BACTERIOCINAS PRODUCIDAS POR CEPAS MEXICANAS DE *Bacillus thuringiensis* CON POTENCIAL APLICACIÓN COMO BIOCONSERVADORES EN ALIMENTOS

Comité Académico de Doctorado

**Subdirector de Estudios de Posgrado
Dra. Diana Resendez Pérez**

LUGAR DE TRABAJO

El presente trabajo de investigación se realizó en las instalaciones de la División de Ciencias de la Vida de la Universidad de Guanajuato, Campus Irapuato-Salamanca ubicada en la ciudad de Irapuato, Guanajuato, México y en el Departamento de Alimentos de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León.

AGRADECIMIENTO

Agradezco a la Dra. Ma. Guadalupe Alanis Guzmán por su apoyo a la Dirección de este trabajo de investigación, por conducirme acertadamente al lugar y el momento adecuado para realizar esta tesis, por su valiosa amistad.

Al Dr. Rubén Salcedo Hernández por su invaluable colaboración en los aspectos técnicos de esta investigación y por compartir sus valiosos conocimientos y su experiencia.

Agradezco infinitamente a la Dra. Mayela Bautista Justo por haber sido el enlace indispensable para mi estancia en la División de Ciencias de la Vida de la Universidad de Guanajuato, pero principalmente por su apoyo invariable, por su trato amable y por su valiosa amistad.

Mi agradecimiento sincero a mis amigos M.C. Ma. del Socorro Linaje Treviño y L.C.Q. Manuel Martínez Gallegos por su apoyo incondicional y motivación constante, por su demostración de que la distancia no es pretexto para olvidar.

Al Dr. José Eleazar Barboza Corona por su alto grado de compromiso y esfuerzo que siempre tuvo en la dirección externa de éste trabajo de investigación, por compartir conmigo su experiencia profesional y sus conocimientos prácticos y técnicos para la realización de mi tesis. Le agradezco además su persistente motivación y apoyo que me alentaron a concluir mis investigaciones con la mayor calidad posible. Pero lo que más le agradezco es su sencillez y su amistad que fueron cruciales para mi desarrollo profesional y personal.

Agradezco a Marcela Aideé Vargas de la Fuente sus constantes manifestaciones de entusiasmo y motivación, gracias por compartir el interés por mis logros.

Este trabajo fue realizado a través del apoyo financiero de los proyectos “Influencia de los factores de cultivo de cultivo sobre la producción de bacteriocinas secretadas por *Bacillus thuringiensis*” (número de proyecto 104/08, convocatoria 2008) y “Clonación de un gen de la Morricina 269 de *Bacillus thuringiensis*” (número de proyecto, convocatoria 2006) financiado por la Universidad de Guanajuato, así como el proyecto “Análisis Bioquímico Molecular de algunas bacteriocinas de *Bacillus thuringiensis*: un estudio en cepas mexicanas” (número de proyecto 82317, convocatoria 2008) financiado por SEP-CONACyT.

Se agradece la beca otorgada por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) (número de becario: 204378) para la realización de este trabajo.

DEDICATORIA

A mis hijos Andrés Eduardo, Marcel Alan y Marcela Aideé con todo mi amor y con la esperanza de inculcar en ellos el interés por el estudio.

A mi esposo Jesús Eduardo por su comprensión y apoyo incondicional.

TABLA DE CONTENIDO

Sección	Página
PAGINA DE TITULO	i
DIRECCIÓN DE TESIS	ii
APROBACIÓN DE TESIS DOCTORAL POR COMITÉ DE TESIS	iii
APROBACIÓN DE TESIS POR COMITÉ DE EXAMEN	iv
LUGAR DE TRABAJO	v
AGRADECIMIENTOS	vi
DEDICATORIA	vii
TABLA DE CONTENIDO	viii
LISTA DE TABLAS	ix
LISTA DE FIGURAS	x
ABREVIATURAS	xi
1 RESUMEN Y ABSTRACT	1
2 INTRODUCCIÓN	3
3 JUSTIFICACIÓN (IMPORTANCIA)	5
4 HIPÓTESIS	7
5 OBJETIVOS	8
6 ANTECEDENTES	9
6.1 Bioconservación de alimentos	9
6.2 Bacteriocinas	13
6.2.1 Definición y Clasificación de Bacteriocinas de Bacterias Acido Lácticas (BAL)	14
6.2.2 Síntesis de Bacteriocinas	16
6.2.3 Inducción de la síntesis de bacteriocinas	19
6.2.4 Producción de bacteriocinas	20
6.2.5 Regulación de la producción de bacteriocinas	21
6.2.6 Purificación de bacteriocinas	21
6.2.7 Modo de acción de las bacteriocinas	23

6.2.8	Determinación de la actividad de las bacteriocinas	26
6.2.9	Aplicaciones de las bacteriocinas	28
6.2.9.1	Bioconservación de productos lácteos	30
6.2.9.2	Bioconservación de productos cárnicos	31
6.2.9.3	Bioconservación de productos marinos	33
6.2.9.4	Bioconservación de productos vegetales y bebidas	33
6.2.9.5	Aplicaciones biomédicas	34
6.2.10	Tecnologías de barrera	35
6.3	<i>Bacillus thuringiensis</i>	37
6.3.1	Generalidades	37
6.3.2	δ -endotoxinas (proteínas Cry y Cyt)	39
6.3.3	El genoma de Bt	40
6.3.4	Los plásmidos de Bt	41
6.3.5	Genes <i>cry</i> en México	43
6.3.6	Bacteriocinas de <i>B. thuringiensis</i> (Bt-BLIS)	43
6.3.6.1	Síntesis y producción de Bt-BLIS	47
6.3.6.2	Modo de acción de Bt-BLIS	49
6.3.6.3	Determinación de la actividad de Bt-BLIS	53
6.3.6.4	Purificación de de Bt-BLIS	56
7	MATERIALES Y MÉTODOS	59
7.1	Material Biológico	59
7.2	Producción de las bacteriocinas	60
7.2.1	Determinación del peso molecular y de la actividad directa de las bacteriocinas Bt- BLIS en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE).	60
7.3	Estandarización de un nuevo método para la determinación rápida de la actividad de las Bt-BLIS	61
7.3.1	Correlación entre el nuevo método fluorogénico y el método de difusión en pozos	61
7.4	Efecto de la presencia de la bacteria susceptible en la producción de las Bt-BLIS.	62
7.4.1	Determinación del número de células de <i>B. cereus</i> 183 necesarias para incrementar la síntesis de bacteriocinas de <i>B. thuringiensis</i>	62
7.4.2	Caracterización parcial del inductor de la síntesis de Bacteriocinas de <i>B. thuringiensis</i> .	63
7.5	Determinación de la actividad de las Bt-BLIS contra bacterias y hongos de importancia en alimentos, salud pública y ganadería.	63
7.5.1	Determinación de la actividad de las bacteriocinas contra bacterias patógenas	63
7.5.2	Determinación de actividad de las bacteriocinas contra hongos	64
7.5.3	Determinación de la actividad de las bacteriocinas contra cepas de <i>Staphylococcus aureus</i> causantes de mastitis	65

7.6	Investigación preliminar para el aislamiento de genes que codifican las bacteriocinas	66
7.6.1	Extracción de plásmidos de <i>B. thuringiensis</i>	66
7.6.2	Digestión y análisis tipo Southern Blot	67
7.6.2.1	Diseño y marcaje de la sonda	67
7.6.2.2	Hibridación tipo Southern	67
7.6.3	Obtención de un minibanco plasmídico	68
7.6.4	Detección de la actividad bacteriocinogénica de las transformantes	69
8	RESULTADOS	70
8.1	Producción de las Bacteriocinas y determinación de su peso molecular	70
8.2	Desarrollo de un nuevo método para la determinación rápida de la actividad de las Bt-BLIS	71
8.3	Efecto de la presencia de la bacteria susceptible en la producción de las Bt-BLIS.	75
8.3.1	Determinación del número de células de <i>B. cereus</i> 183 necesarias para incrementar la síntesis de bacteriocinas de <i>B. thuringiensis</i>	75
8.3.2	Detección de un inductor de la síntesis de bacteriocinas de <i>B. thuringiensis</i>	75
8.4	Determinación de la actividad de las bacteriocinas contra bacterias y hongos de importancia en alimentos, salud pública y ganadería.	76
8.4.1	Actividad contra bacterias patógenas de importancia en alimentos y salud pública	76
8.4.2	Actividad contra hongos	80
8.5	Datos preliminares en la clonación de genes que codifiquen bacteriocinas de <i>B. thuringiensis</i>	81
8.6	Detección de fragmentos con probables genes de bacteriocinas de <i>B. thuringiensis</i>	82
8.7	Búsqueda de una clona con actividad de bacteriocinas en un banco plasmídico	83
9	DISCUSIÓN	86
10	CONCLUSIONES	94
11	LITERATURA CITADA	96
12	RESUMEN CURRICULAR	123

LISTA DE TABLAS

Tabla		Página
I	Bacteriocinas de Bacterias Acido Lácticas (BAL)	15
II	Productos a base <i>B. thuringiensis</i> subsp <i>israelensis</i> en el mercado mundial	39
III	Características de Bacteriocinas sintetizadas por diversas cepas de <i>Bacillus thuringiensis</i>	44
IV	Propiedades de Bacteriocinas sintetizadas por diversas cepas de <i>Bacillus thuringiensis</i>	45
V	Producción de bacteriocinas sintetizadas por diversas cepas de <i>Bacillus thuringiensis</i>	49
VI	Actividad de bacteriocinas producidas por cepas de <i>Bacillus thuringiensis</i>	55
VII	Etapas para la purificación de bacteriocinas de <i>B. thuringiensis</i>	56
VIII	Actividad inhibitoria (U) de las Bt-BLIS determinada por difusión en pozos	77
IX	Actividad inhibitoria (U ^a) de las Bt-BLIS parcialmente purificadas contra aislados de <i>S. aureus</i> determinada por el método de difusión de pozos ^{bc}	79
X	Actividad antimicrobiana de Bt-BLIS parcialmente purificadas contra hongos ^a	80

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1	Mecanismo de acción de las bacteriocinas por formación de poros en la membrana bacteriana	24
2	Modo de acción de diversas bacteriocinas	25
3	Marcaje de la sonda degenerada Bact-2 diseñada a partir de dos extremos N-terminales reportados para <i>B. thuringiensis</i>	67
4	Determinación del peso molecular de las bacteriocinas producidas por cepas de <i>B. thuringiensis</i> por SDS-PAGE.	70
5	Fluorescencia emitida por la berberina (sulfato de berberina) localizada al interior de <i>Bacillus cereus</i> .	71
6a	Fluorescencia emitida por sulfato de berberina en interior celular de <i>Bacillus cereus</i> tratado con diferentes bacteriocinas.	72
6b	Correlación entre la actividad en mm ² de área de inhibición y fluorescencia.	73
7	La determinación de la actividad de bacteriocinas comerciales muestra una amplia correlación entre la fluorescencia emitida por la berberina y el área de inhibición en mm ² .	74
8	Incremento en la producción de las bacteriocinas de <i>B. thuringiensis</i> en presencia de la cepa indicadora <i>B. cereus</i> 183 (control), y la actividad por el método fluorogénico.	75
9	Incremento en la producción de bacteriocinas de <i>B. thuringiensis</i> tratadas con sobrenadante libre de células (SLC) o células (C) tratadas a 55 °C. La bacteria (células) indicadora fue <i>B. cereus</i> 183.	76
10	Resistencia antimicrobiana fenotípica de <i>S. aureus</i> aislados de vacas infectadas con mastitis bovina.	78
11	Inhibición de hongos de importancia en alimentos, fitopatógenos y microparásitos.	81

12	Patrón de plásmidos de diferentes cepas de <i>B. thuringiensis</i> .	82
13	(a) Separación de plásmidos no digeridos y digeridos con <i>HindIII</i> de muestras obtenidas de <i>B. thuringiensis</i> subsp <i>morrisoni</i> (LBIT269). (b) hibridación tipo Southern.	83
14	Actividad inhibitoria de las proteínas de secreción de dos transformantes comparada con aquella obtenida por las cepas silvestres. T269 y T287 (T287-1 o T287-7) son transformantes obtenidas de un banco plasmídico de <i>B. thuringiensis</i> subsp <i>morrisoni</i> 269 y <i>B. thuringiensis</i> subsp <i>kurstaki</i> 287.	84
15	(a) Extracción de plásmidos de dos transformantes obtenidas de un banco plasmídico <i>B. thuringiensis</i> subsp <i>kurstaki</i> (LBIT-287). (b) hibridación tipo Southern.	85

NOMENCLATURA

Abreviatura	Significado
Abs	Absorbencia
ABC	ATP- binding cassette
ADES	Agua destilada estéril
ADN	Acido desoxirribonucleico
ARN	Acido ribonucleico
ATCC	American Type Culture Collection
aw	Actividad de agua
BAL	Bacterias Acido Lácticas
Bt	<i>Bacillus thuringiensis</i>
BHI	Caldo infusión cerebro corazón
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
C-terminal	Grupo carboxilo terminal
cel/ml	Células/mililitro
Cry	Proteínas insecticidas
Cyt	Proteínas insecticidas

Da	Daltones
DEAE	Dietilaminoetil
<i>HindIII</i>	Enzima de restricción Tipo 2 (<i>Haemophilus influenzae</i>)
HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución
HPK	Histidín-Proteín-Kinasa
IPTG	Isopropil-beta-D-thiogalactopiranososa
Lan	Lantionina
Langebio	Laboratorio Nacional de Genómica para la Biodiversidad
LB	Caldo Luria
LBIT	Laboratorio de Bioinsecticidas <i>thuringiensis</i>
Kb	Kilo bases
kDa	Kilo Daltones
GRAS	Generally Recognized As Safe
FDA	Food and Drug Administration
FMP	Fuerza motriz de protones
μl	Microlitros
mM	Milimolar
NCBI	National Center for Biotechnology Information
nm	Nanómetros
N-terminal	Grupo amino terminal
OD	Densidad óptica
OMS	Organización Mundial de la Salud
PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
PDA	Agar papa dextrosa
p/v	peso/volumen

r	Coefficiente de correlación
rpm	Revoluciones por minuto
SDS	Dodecil (lauril) sulfato de sodio
UA/ml	Unidades arbitrarias/mililitro
UI/gr	Unidades internacionales/gramo
UTI/gr	Unidades Tóxicas Internacionales/gramo
ufc/ml	Unidades formadoras de colonia/mililitro
V	Voltios
v/v	volumen/volumen
X-gal	5-bromo-4-cloro-3-indolil-beta-D-galactopiranososa

1 RESUMEN

En este trabajo se describe un método novedoso para detectar la presencia de bacteriocinas el cual se basa en la fluorescencia emitida por la berberina al ingresar a células dañadas por las bacteriocinas. Esta técnica genera resultados rápidos en menos de una hora y muestra correlación con el método convencional de difusión en pozos. Con este método identificamos la actividad de las bacteriocinas sintetizadas por *Bacillus thuringiensis* y de bacteriocinas comerciales (Nisina, Pediocina). Posteriormente reportamos la síntesis de 5 bacteriocinas (Bt-BLIS: Morricina 269, Kurstacina 287, Kenyacina 404, Entomocina 420, y Tolworthcina 524) por cepas mexicanas de *B. thuringiensis* las cuales tuvieron un espectro de actividad de moderado a amplio. Estas bacteriocinas fueron efectivas contra bacterias Gram-positivas y Gram-negativas, incluyendo agentes etiológicos de enfermedades humanas como infecciones de garganta, fiebre escarlatina, septicemia, neumonía, infecciones del tracto urinario y síndromes eméticos y gastrointestinales y también contra diversos hongos. Adicionalmente evaluamos la actividad de las 5 bacteriocinas sintetizadas por *Bacillus thuringiensis* contra aislados de *S. aureus* asociados a mastitis bovina. Todos los aislados de *S. aureus* mostraron susceptibilidad a las 5 bacteriocinas sintetizadas por *B. thuringiensis* principalmente a la Morricina 269 y Kurstacina 287, seguida por la Kenyacina 404, Entomocina 420 y Tolworthcina 524. Aunque la síntesis de las 5 Bt-BLIS fué independiente de la presencia de una bacteria inductora, demostramos por primera vez que los componentes proteínicos secretados por o liberados por el rompimiento proteolítico de *Bacillus cereus* 183 seguido del tratamiento con proteinasa K, incrementa la síntesis de las Bt-BLIS. Por otro lado, realizamos también una investigación preliminar con el propósito de obtener información que nos permitiera la clonación de genes que codifican bacteriocinas sintetizadas por *B. thuringiensis* ya que hasta el momento no existen reportes sobre la clonación de ningún gen que las codifique. Encontramos que *B. thuringiensis* subsp. *morrisoni* (LBIT 269), *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* (LBIT 287) y *B. thuringiensis* subsp. *kenyae* (LBIT 404), a pesar de pertenecer a diferente serovariedad, presentan de 5 a 6 plásmidos con pesos

moleculares muy similares. Se localizaron fragmentos *HindIII* con tamaños de entre 5 y 7 Kb en LBIT 269 y LBIT 287 los cuales pueden contener genes que codifican bacteriocinas.

ABSTRACT

In this work we describe a novel bacteriocin screening assay based on fluorescence emitted by berberine following its influx into compromised cells. This technique showed agreement with the conventional well-diffusion method, and results could be obtained within one hour. This assay facilitated the rapid identification of bacteriocinogenic bacterial isolates. With this method we were able to identify activity with bacteriocin synthesized by *Bacillus thuringiensis* and those showed by commercial bacteriocin (Nisin, Pediocin). Furthermore, we reported the synthesis of five bacteriocin-like inhibitor substances (Bt-BLIS: Morricin 269, Kurstacin 287, Kenyacin 404, Entomocin 420, and Tolworthcin 524) by Mexican strains of *B. thuringiensis*, which had a moderate to broad spectrum of antibacterial activity. These bacteriocins were toxic to Gram-positive and Gram-negative bacteria, including common etiological agents of human diseases, such as strep throat and scarlet fever, septicemia, pneumonia, urinary tract infection, and emetic and gastrointestinal síndromes, and also to different fungi. Additionally, we evaluated the activity of five bacteriocins synthesized by *B. thuringiensis* against *S. aureus* isolates associated to bovine mastitis. All *S. aureus* isolates showed susceptibility to the five bacteriocins synthesized by *B. thuringiensis*, mainly to Morricin 269 and Kurstacin 287 followed by Kenyacin 404, Entomocin 420 and Tolworthcin 524. Although synthesis of the five Bt-BLIS was independent of the presence of a target inducing bacterium, we demonstrated for the first time that a proteinaceous component(s) secreted by, or liberated by proteolytic cleavage of *B. cereus* 183 following treatment with proteinase K, enhanced Bt-BLIS synthesis. Alternatively, because no bacteriocin gene from *B. thuringiensis* has been cloned, we carried out preliminary experiments to generate information that allow the cloning of bacteriocin genes from Mexican strains of *B. thuringiensis*. In this regard, *B. thuringiensis* subsp. *morrisoni* (LBIT2 69), *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* (LBIT 287) and *B. thuringiensis* subsp. *kenyae* (LBIT 404) harbored 5 to 6 plasmids with similar molecular

weight. Southern hybridization studies by using degenerate probes showed that LBIT 269, LBIT 287 have fragments between 5 and 7 Kb that might harbor putative bacteriocin genes.

2 INTRODUCCIÓN

Dentro de la diversidad del asombroso metabolismo microbiano, existen bacterias capaces de sintetizar péptidos a nivel ribosómico que pueden sufrir modificaciones pos-traduccionales y tienen efecto antagónico contra microorganismos con o sin relación filogenética. En los últimos diez años las bacteriocinas se han mantenido dentro del grupo de moléculas biológicas que captaron gran interés de los grupos de investigadores, cuyos trabajos se han dirigido principalmente a cualquiera de las siguientes áreas: a) Estudio de la diversidad de microorganismos que las sintetizan, b) Conocimiento de las etapas de su síntesis durante el crecimiento de la bacteria productora; c) Metodologías para su aislamiento, purificación y producción, d) Características biológicas, bioquímicas y genéticas.

De los puntos anteriores, una de las áreas más importantes del estudio de las bacteriocinas es el conocimiento de su naturaleza química y genética debido a su potencial aplicación en diversas áreas tales como en la bioconservación de alimentos, en la medicina y en el cuidado del medio ambiente. Entre los microorganismos productores de bacteriocinas, las bacterias ácido lácticas (BAL) han sido las más ampliamente estudiadas. De las bacteriocinas sintetizadas por estas bacterias, la Nisina es la única aplicada a nivel commercial, se ha utilizado como bioconservador de alimentos en más de 50 países con una efectividad comprobada y además, es considerada como producto seguro con nivel GRAS (“Generally Recognized As Safe”) y con autorización para su aplicación por la FDA. La

adición de bacteriocinas en los alimentos representa una excelente estrategia para el control de bacterias patógenas perjudiciales para la salud humana como son *Listeria monocytogenes*, *Clostridium botulinum*, *Yersinia enterocolítica*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* y *Bacillus cereus*, entre otras.

Por otro lado, existen bacterias como *Bacillus thuringiensis* (Bt) cuyo potencial en la síntesis de bacteriocinas es relevante y no se habían estudiado a profundidad hasta hace pocos años. Lo anterior puede deberse a que probablemente la mayor parte de las investigaciones sobre esta bacteria han sido enfocadas a estudiar el efecto entomopatígeno de sus proteínas insecticidas (*Cry* y *Cyt*), el cual data desde los años 60 y ha generado un mercado de ganancias multimillonarias a nivel mundial a través del control biológico de plagas.

Pese al interés que pueden generar las proteínas antimicrobianas sintetizadas por *B. thuringiensis*, el conocimiento de su naturaleza y modo de acción todavía es mínimo y sólo se han reportado catorce bacteriocinas derivadas del metabolismo de diferentes especies de Bt. Sin embargo, es inminente su gran potencial como bioconservadores de alimentos para el control de microorganismos patógenos, debido a su amplia actividad antibacteriana y antifúngica, además de presentar características de resistencia a factores con valores extremos como el pH, la temperatura, la solubilidad y la actividad de agua (*aw*) que coinciden con los rangos utilizados en el procesamiento de los alimentos. En este trabajo desarrollamos un nuevo método para determinar la actividad de las bacteriocina en un tiempo corto, y evaluamos la actividad de las bacteriocinas producidas por cepas mexicanas de *B. thuringiensis* contra diversas bacterias de importancia en alimentos y salud pública así como también contra diversos hongos. También se determinaron algunas condiciones que permitieron incrementar la producción de las bacteriocinas. Finalmente, se obtuvo información que permitió ubicar los fragmentos donde pudieran localizarse genes que codifican bacteriocinas de *B. thuringiensis*.

3 JUSTIFICACIÓN

En la actualidad la gran mayoría de la población está interesada en consumir alimentos que además de ser sensorialmente aceptables y tengan un valor nutricional elevado, conjuntamente representen una alternativa en la prevención de enfermedades. Generalmente la causa del deterioro de los alimentos se debe al ataque de bacterias, hongos o levaduras, y esta alteración produce monumentales mermas económicas, tanto para los productores como para comerciantes y lo más importante, ocasionan el detrimento de la salud de los consumidores que han confiado en la calidad microbiológica del producto y lo han adquirido sin titubear.

Se ha reportado que más del 20% de todos los alimentos producidos a nivel mundial se deterioran por la acción de los microorganismos al grado de perderse y considerarse una merma total, lo que se considera una problemática que se incrementa a pasos agigantados.

Una alternativa se ha encontrado en la utilización de conservadores, que si bien no inhiben si logran retardar el crecimiento de microorganismos y por consecuencia el deterioro de los alimentos. Los conservadores aplicados son de naturaleza química o física, pero además, se han encontrado conservadores naturales como los péptidos antimicrobianos que son sintetizados por las bacterias ácido-lácticas, las bacteriocinas, que presentan la capacidad de inhibir el crecimiento de microorganismos relacionados o no filogenéticamente. La actividad antimicrobiana de las bacteriocinas representa un gran potencial para la industria alimenticia ya que se pueden utilizar como conservadores biológicos puros y al ser de naturaleza peptídica, al biodegradarse no forman compuestos secundarios y su aplicación puede contrarrestar el uso de conservadores químicos que llegan a perjudicar la salud de los consumidores.

Resulta interesante que bacterias utilizadas de manera tradicional como agentes de control biológico puedan sintetizar compuestos con actividad inhibitoria hacia bacterias patógenas de interés en alimentos. Entre estos microorganismos se ha reportado que el agente de biocontrol más exitoso a nivel mundial, es decir *B. thuringiensis* (Bt), produce bacteriocinas. De manera particular en México el estudio de las bacteriocinas sintetizadas por esta bacteria es escaso, y solamente se han reportado las propiedades físicas y bioquímicas de algunas bacteriocinas sintetizadas por cepas mexicanas, así como su actividad contra un número reducido de bacterias patógenas presentes en alimentos y de interés en salud pública (Barboza-Corona y col., 2007). Ya que las bacteriocinas sintetizadas por *B. thuringiensis* pueden ser una opción viable como bioconservadores en alimentos consideramos importante que se amplie el conocimiento de estos péptidos desde varios enfoques: su síntesis, forma de medirlos, modo de acción, producción, purificación y biología molecular. Este tipo de trabajos permitirían conocer mejor sus propiedades, su rango de acción y la forma de optimizar su producción. Además darían las bases para que en el futuro se clonen genes que codifican bacteriocinas y por Ingeniería Genética se incremente su síntesis para hacerlo práctico desde un punto de vista industrial.

4 HIPÓTESIS

Es posible estandarizar una nueva metodología para determinar eficaz y rápidamente la actividad de las bacteriocinas producidas por cepas mexicanas de *Bacillus thuringiensis* y determinar las condiciones que permitan incrementar su producción para evaluar su actividad contra diversas bacterias patógenas de interés en alimentos y salud pública.

5 OBJETIVOS

1. Desarrollar un nuevo método que permita determinar la actividad de bacteriocinas en un tiempo menor al empleado rutinariamente para su evaluación (difusión de pozos).
2. Investigar y evaluar el efecto ocasionado por la presencia de una bacteria susceptible o sus productos en la síntesis de las bacteriocinas de *B. thuringiensis*.
3. Determinar la actividad de las bacteriocinas de *B. thuringiensis* contra bacterias y hongos de importancia en alimentos, salud pública y ganadería.
4. Generar resultados preliminares que posibiliten el aislamiento de los genes que codifican las bacteriocinas de *B. thuringiensis*.

6 ANTECEDENTES

6.1 Bioconservación de alimentos

La Bioconservación puede ser definida como la extensión de la vida de anaquel y seguridad de un alimento a través del uso de microbiota natural o controlada y/o sus compuestos antimicrobianos (Stiles, 1996). Sin embargo, la bioconservación de alimentos es un término que en los últimos años se ha acuñado de manera diferente refiriéndose además de las técnicas utilizadas para obtener alimentos seguros a los alimentos mínimamente procesados y sin aditivos. Por lo anterior, la bioconservación ha tomado un auge basándose en el efecto de los llamados bioconservadores que aumentan la vida útil e incrementan la seguridad de los alimentos (www.madrimasd.org/biotecnologia).

La implementación de tecnologías modernas en el procesamiento y aseguramiento de la seguridad microbiológica de los alimentos han disminuído pero no eliminado los riesgos relacionados con las enfermedades relacionadas con el consumo de alimentos contaminados con microorganismos. En Europa la morbilidad relacionada con alimentos contaminados es la segunda causa de muerte solo superada por enfermedades respiratorias, estimándose de 50, 000 a 300, 000 de casos de gastroenteritis aguda por cada millón de personas al año (Luchansky, 1999). El 7º reporte del programa de sobrevivencia (1993-1998) de la Organización Mundial de la Salud (OMS) para el control de infecciones e intoxicaciones alimentarias documentó 5, 517 brotes por alimentos contaminados en España con 69, 553 personas afectadas en total y 6, 820 hospitalizadas (Schmidt y Tirado, 2001). En Estados Unidos la gastroenteritis aguda afecta de 250 a 350 millones de personas anualmente, y se estima que del 22% al 30% de estos casos se relacionan con muertes por consumo de alimentos contaminados, principalmente pollo, huevo, mariscos y lácteos (Mead y col., 1999).

De acuerdo a datos de los Centros para la Prevención y Control de Enfermedades Infecciosas se ha estimado que uno de cada cuatro norteamericanos ha experimentado

anualmente alguna enfermedad por alimentos contaminados (McCabe-Sellers y Beattie, 2004). Las bacterias patógenas encontradas en la mayoría de estos casos son *Salmonella*, *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, y *Clostridium botulinum* (Buzby y col., 1996).

El Servicio de Salud Pública de los Estados Unidos ha identificado a los siguientes microorganismos como principales causantes de enfermedades transmitidas por alimentos, ya sea por la severidad de la enfermedad o por el número de casos que produce:

Campylobacter jejuni. Es la causa más común de diarrea. Origen: Carnes y pollos crudos o mal cocinados, leche cruda y agua sin tratamiento.

Clostridium botulinum. Este organismo produce la toxina que causa el botulismo, una enfermedad caracterizada por parálisis muscular. Origen: Alimentos preparados en el hogar y aceite de hierbas.

***E. coli* O157:H7**. Esta bacteria puede producir una toxina mortal. Origen: carnes mal cocidas, especialmente hamburguesas, leche cruda y productos agrícolas.

Listeria monocytogenes. Causa listeriosis, una enfermedad grave en mujeres embarazadas, recién nacidos y adultos con un sistema inmune débil. Origen: suelo y agua. Se ha encontrado en productos lácteos incluyendo quesos blandos así como también en carne cruda y mal cocida, en pollos y productos del mar frescos o en conserva.

Salmonella. Es el segundo agente etiológico más común transmitido por alimentos. Es el responsable de millones de casos de enfermedades ocasionados por alimentos contaminados. Origen: huevos crudos y mal cocidos, pollos y carnes mal cocidas, productos lácteos, mariscos, frutas y vegetales.

Staphylococcus aureus. Esta bacteria produce una toxina que causa vómitos al poco tiempo de ser ingerida. Origen: alimentos cocinados con alto contenido en proteínas (ejemplos: jamón cocido, ensaladas, productos de pastelería, productos lácteos).

Shigella. Produce aproximadamente 300,000 casos de enfermedades diarreicas. La falta de higiene hace que *Shigella* sea fácilmente transmitida de persona en persona. Origen: ensaladas, leche, productos lácteos y agua sucia.

Vibrio vulnificus. Causa gastroenteritis o el síndrome conocido como septicemia primaria. Las personas con enfermedades en el hígado son especialmente de alto riesgo. Origen: mariscos crudos o mal cocidos.

Yersinia enterocolitica. Causa yersiniosis, una enfermedad caracterizada por diarrea y/o vómitos Origen: cerdo, productos lácteos y agrícolas.

Toxoplasma gondii. Es un parásito que causa toxoplasmosis, una enfermedad muy severa que puede producir desórdenes del sistema nervioso central, particularmente retardo mental y deterioro visual en niños. Origen: carnes, principalmente de cerdo (www.cfsan.fda.gov/~mow/intro.html).

Hasta ahora una aproximación en la investigación para mejorar la seguridad en los alimentos se enfoca en la búsqueda de nuevos conservadores químicos o en la aplicación de tratamientos físicos más drásticos (altas temperaturas), sin embargo, este tipo de estrategias muestran muchas desventajas como la toxicidad de los conservadores químicos comunes (nitritos), la alteración de las propiedades organolépticas y nutricionales de los alimentos, y especialmente contra las nuevas tendencias de compra y consumo de los compradores que demandan alimentos más seguros pero a la vez mínimamente procesados y sin aditivos.

Es importante comentar que la conservación de alimentos es una condición de seguridad para los humanos. El secado, el salado y la fermentación han sido los métodos tradicionales de conservación, hasta que aparecieron posteriormente el enlatado y la

congelación antes de la época Napoleónica y la década de los 20s respectivamente. En las sociedades desarrolladas la conservación de alimentos se ha considerado como una “conveniencia” (o comodidad) de un eficiente sistema de alimentos y consideran que la conservación de alimentos es la clave para asegurar la disponibilidad de alimentos como un beneficio vital. La fermentación de alimentos se desarrolló más por una necesidad de aprovechar los alimentos “contaminados” no dañinos a los seres humanos que por un diseño bien elaborado, siendo de esta forma la base para el desarrollo de los alimentos fermentados. Actualmente las bacterias ácido lácticas (BAL) juegan un papel muy importante en los alimentos fermentados ya que les confieren el sabor característico y ejercen un efecto de conservación en los productos fermentados. Se ha estimado que los productos alimenticios fermentados comprenden un 25% de la dieta en los Europeos y hasta un 60 % de la dieta en países desarrollados (Holzapfel y col., 1995).

Para conciliar las demandas de los consumidores con los estándares de seguridad necesarios, se ha empezado a sustituir los métodos tradicionales para controlar la descomposición y los riesgos microbiológicos en los alimentos a partir de las combinaciones de tecnologías innovadoras que incluyen sistemas biológicos antimicrobianos como las bacterias ácido lácticas (BAL) y/o sus bacteriocinas. El uso de BAL o sus bacteriocinas ya sea aisladas o en combinación con tratamientos fisicoquímicos suaves o bien, con bajas concentraciones de conservadores químicos naturales o tradicionales, representan una alternativa eficiente para alargar la vida de anaquel y al mismo tiempo incrementar la seguridad de los alimentos a través de la inhibición de bacterias saprófitas y patógenas presentes, pero sin alterar las cualidades nutricionales y sensoriales tanto de materias primas como de los productos alimenticios (Montville y Wikowski, 1997; Hugas y col., 2002; O’Sullivan y col., 2002; Ross y col., 2002).

En las últimas dos décadas se ha incrementado notablemente la investigación sobre las cepas de BAL, sus productos antimicrobianos (bacteriocinas) y sus posibles aplicaciones en la bioconservación de alimentos, dando un nuevo giro a la conservación de alimentos a partir del empleo de productos naturales.

Por otro lado, recientes investigaciones en el área de los carbohidratos como ingredientes de alimentos han demostrado la eficiencia de los oligosacáridos como prebióticos o como bioconservadores. Los oligosacáridos de acuerdo a su origen tienen diversas formas y estructuras pero en su mayoría se definen como oligoquitosanos o como quitosanos de bajo peso molecular (Barreteau y col., 2006), los oligosacáridos son polímeros de 2 a 25 subunidades de azúcares que pueden combinarse con otras biomoléculas y se ha incrementado el interés en producirlos a gran escala para aplicarse en la industria de los alimentos (Barboza-Corona y col., 2008). Actualmente la generación de alimentos funcionales representa un mercado global de 33 billones de dólares (Sangeetha y col., 2005) y los oligosacáridos pueden tomar un papel más importante como ingredientes funcionales comparados con la fibra dietética, péptidos, alcoholes de azúcares, probióticos, ácidos grasos poliinsaturados y antioxidantes. Estas moléculas pueden tener un gran desarrollo a futuro dependiendo de su viabilidad y su producción a gran escala. Las investigaciones más recientes se enfocan en las aplicaciones de oligosacáridos como nutraceúticos y sus procesos productivos.

6.2 Bacteriocinas

Las bacteriocinas fueron descubiertas en 1925 por Gratia quién inicialmente llamó “principio V” a la sustancia productora de antagonismo entre cepas de *Escherichia coli*, para la cuál posteriormente se acuñó el término de “colicina” (Gratia y Fredericq, 1946). En este momento el término colicina implicaba a las proteínas bactericidas producidas por *E. coli* y cepas de Enterobacterias relacionadas (Konisky, 1982).

Las bacteriocinas se definieron como proteínas bactericidas caracterizadas por un estrecho rango de actividad que son adsorbidas por receptores presentes en la envoltura externa de las células (Jacob y col., 1953). Sin embargo, al descubrirse la asociación entre la biosíntesis de las bacteriocinas con la presencia de plásmidos y las propiedades de las bacteriocinas producidas por bacterias Gram-positivas el término nuevamente se modificó (Tagg y col., 1976). Actualmente las bacteriocinas son definidas como péptidos naturales sintetizados y secretados por las bacterias, particularmente bacterias Gram-negativas que 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 (Kaletta y Entian, 1989; Jack y col., 1995; Paik y col., 1997; Simon y col., 2002; Matthewes, 2004).

Las bacterias Gram-positivas también tienen la capacidad de producir estos péptidos y para nombrarlos se acepta indistintamente el término de BLIS (Bacteriocin-like inhibitor substances) o término de bacteriocinas. Se ha considerado que las bacteriocinas representan al grupo más abundante de compuestos antimicrobianos sintetizados facultativamente por las bacterias (Riley y Wertz, 2002). Las cepas productoras de bacteriocinas están autoprotegidas contra la acción de estos péptidos por proteínas de inmunidad específicas para sus propias bacteriocinas (Quadri y col., 1995).

Las bacteriocinas muestran un espectro de inhibición muy variable, solo pocas como la bulgaricina o acidofilina son activas contra un amplio espectro de bacterias Gram-positivas o Gram-negativas, así como para levaduras y hongos (Klaenhammer, 1993; Jack y col., 1995; Nemcova, 1997). Las bacteriocinas con amplio espectro de inhibición son aditivos potencialmente útiles para inhibir la descomposición, deterioro y el ataque de bacterias patógenas en alimentos (Nettles y Barefoot, 1993; De Vuyst y Vandamme, 1994).

6.2.1 Definición y Clasificación de Bacteriocinas de Bacterias Ácido Lácticas

Durante milenios se han utilizado las bacterias ácido lácticas (BAL) en la fermentación de alimentos o como cultivos iniciadores, principalmente se han aplicado mundialmente en el desarrollo de productos lácteos fermentados como yogurt, queso, crema, mantequilla, kefir y koumiss. Además de proporcionar sabor y textura e incrementar el valor nutricional de los alimentos, las BAL se han empleado en la industria alimenticia como conservadores naturales (bioconservadores) debido a su capacidad de producir bacteriocinas y otros metabolitos que ejercen acción antibacteriana y que coadyuvan en la prevención de la descomposición de los alimentos (Campos, 2002). Además estas bacterias lácticas son generalmente reconocidas como GRAS, por sus siglas en inglés (Generally recognized as safe), y tienen un papel importante en la conservación y fermentación de

alimentos, además de mejorar la calidad higiénica en alimentos porque inhiben la flora competitiva la cuál incluye patógenos (Cintas y col., 2001).

Las bacteriocinas producidas por BAL son moléculas catiónicas, hidrofóbicas o anfifílicas compuestas de 20 a 60 residuos de amino ácidos (Nes y Holo, 2000). Estas bacteriocinas generalmente se clasifican en tres grupos que además incluyen bacteriocinas de otras bacterias Gram-positivas (Klaenhammer, 1993; Nes y col., 1996).

Algunos ejemplos representativos de las bacteriocinas de los tres grupos se observan en la Tabla I.

Tabla I

Bacteriocinas de Bacterias Acido Lácticas (BAL)

Bacteriocina	Microorganismo productor	Referencia
Clase I Tipo A Lantibióticos		
Nisina	<i>Lactococcus lactis</i>	Hurst, 1981
Lactocina S	<i>Lactobacillus sake</i>	Mortvedt y col., 1991
Epidermina	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	Allgaier y col., 1986
Gallidermina	<i>Staphylococcus gallinarum</i>	Kellner y col., 1988
Lacticina 481	<i>L. lactis</i>	Piard y col., 1992
Clase I Tipo B Lantibióticos		
Mersacidina	<i>Bacillus subtilis</i>	Altena y col., 2000
Cinnamycina	<i>Streptomyces cinnamoneus</i>	Sahl y col., 1998
Ancovenina	<i>Streptomyces ssp.</i>	Sahl y Bierbaum 1998
Duramycina	<i>S. cinnamoneus</i>	Sahl y Bierbaum 1998
Actagardina	<i>Actinoplanes ssp.</i>	Sahl y Bierbaum 1998
Clase IIa		
Pediocina PA-1/AcH	<i>Pediococcus acidilactici</i>	Henderson y col., 1992; Motlagh y col., 1992
Sakacina A	<i>L. sake</i>	Holck y col., 1992
Sakacina P	<i>L. sake</i>	Tichaczek y col., 1992
Leucocina A-UAL 187	<i>Leuconostoc gelidum</i>	Hastings y col., 1991
Mesentericina Y105	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	Hechard y col., 1992
Enterocina A	<i>Enterococcus faecium</i>	Aymerich y col., 1996
Divercina V41	<i>Carnobacterium divergens</i>	Metivier y col., 1998
Lactococcina MMFII	<i>L. lactis</i>	Ferchichi y col., 2001
Clase IIb		
Lactococcina G	<i>L. lactis</i>	Nissen-Meyer y col., 1992
Lactococcina M	<i>L. lactis</i>	van Belkum y col., 1991
Lactacina F	<i>Lactobacillus johnsonii</i>	Allison y col., 1994
Plantaricina A	<i>Lactobacillus plantarum</i>	Nissen-Meyer y col., 1993a
Plantaricina S	<i>L. plantarum</i>	Jimenez-Diaz y col., 1995
Plantaricina EF	<i>L. plantarum</i>	Anderssen y col., 1998
Plantaricina JK	<i>L. plantarum</i>	Anderssen y col., 1998
Clase IIc		
Acidocina B	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	Leer y col., 1995
Carnobacteriocina A	<i>C. arnobacterium piscicola</i>	Worobo y col., 1994
Divergicina A	<i>C. divergens</i>	Worobo y col., 1995
Enterocina P	<i>E. faecium</i>	Cintas y col., 1997
Enterocina B	<i>E. faecium</i>	Nes y Holo 2000
Clase III		
Helveticina J	<i>Lactobacillus helveticus</i>	Joerger y Klaenhammer 1986
Helveticina V-1829	<i>L. helveticus</i>	Vaughan y col., 1992

Modificado de Chen y Hoover, 2003.

Las bacteriocinas agrupadas en la Clase I se conocen como lantibióticos, son péptidos pequeños de <5 kDa (kilo Daltones) que contienen un amino ácido poco común, la lantionina (Lan), metillantionina (MeLan), dehidroalalnina y dehidrobutirina. La Clase I

se subdivide en lantibióticos Tipo A y Tipo B de acuerdo a su estructura química y actividad antimicrobiana (Moll y col., 1999; van Kraaij y col., 1999; Guder y col., 2000). Los lantibióticos Tipo A son péptidos largos con carga neta positiva que ejercen su actividad formando poros en las membranas bacterianas. Los lantibióticos Tipo B son péptidos globulares más pequeños sin carga o con carga neta negativa y su actividad antimicrobiana se relaciona con la inhibición de enzimas específicas.

En la Clase II se encuentran péptidos que no contienen lantionina, son termoestables y pequeños (<10 kDa), representan al grupo más grande de bacteriocinas que se subdivide en tres subgrupos: Clase IIa, Clase IIb y Clase IIc. En la Clase IIa se encuentran péptidos como la pediocina que contienen una secuencia consenso -Tyr-Gly-Asn-Gly-Val-Xaa-Cys-, y es uno de los grupos que abarca más atención por su actividad anti-*Listeria* (Ennahar y col., 2000b). La Clase IIb incluye bacteriocinas que requieren un sistema de dos péptidos diferentes para ejercer actividad antimicrobiana. La Clase IIc contiene los péptidos restantes de esta Clase y corresponden a bacteriocinas secretadas por el sistema sec-dependiente.

La Clase III de bacteriocinas no se encuentra bien caracterizada, incluye proteínas grandes (30 kDa) y termolábiles, y por esta característica tienen menor interés para su aplicación en alimentos.

La Clase IV corresponde a las bacteriocinas complejas que requieren carbohidratos o lípidos para su actividad (Klaenhammer, 1993), sin embargo desde un punto de vista bioquímico no han sido profundamente caracterizadas y se requiere mayor información descriptiva (Jiménez-Díaz y col., 1995; McAuliffe y col., 2001).

6.2.2 Síntesis de Bacteriocinas.

Tal como se mencionó anteriormente, las bacteriocinas son sintetizadas a nivel ribosómico, y los genes que las codifican así como aquellos responsable de los factores de inmunidad se encuentran generalmente organizados en grupos (“clusters”) y localizados en DNA cromosómico como en la subtilisina y mersacidina (Banerjee y Hansen 1988; Altena y col., 2000). Sin embargo, también es posible localizar a genes que codifican

bacteriocinas en plásmidos (DNA extracromosómico) y transposones, tales como aquellos que sintetizan a la Divergicina A, Sakacina (Worobo y col., 1995; Axelsson y Holck 1995) y la Nisina, lactacina 481 (Rauch y de Vos 1992; Dufour y col., 2000), respectivamente.

Los genes para la biosíntesis, regulación y transporte de las bacteriocinas de la clase I (Epidermina, Nisina, Subtilina, Lacticina 481, Mersacidina) se encuentra organizados en operones. En estos se localizan los genes necesarios para codificar diversas proteínas tales como: la bacteriocina (pre-peptido denominado) LanA (Lan por lantionina), las enzimas necesarias para las reacciones de modificación (LanB, C, LanM), las proteasas que hidrolizan el péptido líder (LanP), las proteínas del sistema de transporte ABC (ATP-binding cassette), las proteínas de translocación (LanP), las proteínas regulatorias (LanR, K) y las proteínas de inmunidad útiles en su autoprotección (LanI, FEG) (Schnell y col., 1992; Bierbaum y col., 1996; Geissler y col., 1996; Buchmann y col., 1988; Mulders y col., 1991; de Vos y col., 1995; Banerjee y Hansen 1988; Klein y col., 1992; Klein y col., 1993, Klein y Entian 1994; Rince y col., 1997; Uguen y col., 2000; Bierbaum y col., 1995; Altena y col., 2000).

Las bacteriocinas de la Clase II no lantibióticos presentan una gran similitud en su organización genética que requiere al menos de cuatro componentes: un gen estructural que codifica el peptido precursor de la bacteriocina, un gen de inmunidad que codifica una proteína de inmunidad que protege a la cepa productora de su propia bacteriocina, un gene que codifica un transportador ABC necesario para la secreción y un gene que codifica una proteína accesoria (Ennahar, y col., 2000). Ejemplos de bacteriocinas de esta clase son la Lactococcina A, B, y M, Pediocina PA-1/AcH, Plantaricina A (Holo y col., 1991; van Belkum y col., 1991; Stoddard y col., 1992; Venema y col., 1995b; Marugg y col., 1992; Bukhtiyarova y col., 1994; Venema y col., 1995a; Diep y col., 1994).

La mayoría de las bacteriocinas no lantibióticos se sintetizan como precursores peptídicos es decir, como pre-probacteriocinas que poseen un péptido señal con un grupo N-terminal con doble glicina que se rompe concomitantemente con la secreción de la bacteriocina activa a través del transportador ABC y su proteína accesoria. Sin embargo, se

han identificado diversas bacteriocinas que se transportan directamente a través de la ruta general de secreción (GSP, sec-dependientes) (Leer y col., 1995; Worobo y col., 1995).

Para las bacteriocinas no modificadas como Plantaricinas, Sakacina y Carnobacteriocina, se ha descrito la inducción de péptidos específicos o feromonas proteicas cuya función es estimular la síntesis de bacteriocinas ubicadas en el mismo grupo de genes (Quadri y col., 1997; Brurberg y col., 1997; Anderssen y col., 1998).

La regulación de la biosíntesis de las bacteriocinas Clase I y II se realiza generalmente a través de los sistemas de regulación de dos componentes. Estos sistemas constan de una proteína de membrana llamada Histidín-Proteín-Kinasa (HPK) y un regulador de respuesta citoplasmática (RR) (Stock y col., 1989; Parkinson 1993; Nes y col., 1996). En esta ruta metabólica de transducción de señal, la HPK se autofosforila en su residuo de histidina y cuando detecta cierta concentración de bacteriocina en el medio ambiente, transfiere el grupo fosforilo al residuo de ácido aspártico en el receptor RR, produciendo cambios intramoleculares que causan el inicio de la transcripción de los genes regulados ya sean estructurales, de secreción, de inmunidad, y en algunos casos los mismos genes reguladores (Kuipers y col., 1998).

Particularmente en la Nisina y Subtilina la molécula de bacteriocina actúa por sí misma como una señal externa que regula su propia síntesis vía transducción de señal (Kuipers y col., 1995; Guder y col., 2000). Contrario a lo anterior las bacteriocinas Clase II producen péptidos BLIS sin actividad antimicrobiana pero que son útiles como factores de inducción (IF) que actúa como señales externas para activar la transcripción de los genes reguladores. Estos IF son péptidos catiónicos o hidrofóbicos, pequeños, termoestables y se sintetizan como prepéptidos con una secuencia líder con doble glicina, que posteriormente se corta al mismo tiempo que secreta el péptido maduro de la célula por el sistema transportador ABC (Nes y col., 1996; Ennahar y col., 2000b). Ejemplos del mecanismo anterior se presentan en *Lactobacillus sake* que requiere la síntesis de un componente peptídico no antibacteriano de 19 residuos de aminoácidos como factor de inducción que funciona presumiblemente como una señal de quórum-sensing para producir la Sakacina P (Nes, et al, 1996), además la inducción de la síntesis de las bacteriocinas de *L. acidophilus*

(Barefoot y col., 1994) y *L. plantarum* (Diep y col., 1995) se debe también a la presencia de péptidos sin actividad antibacteriana que ellos mismos fabrican.

6.2.3 Inducción de la síntesis de bacteriocinas

En los párrafos anteriores podemos evidenciar que no es sencillo identificar y describir la biosíntesis de bacteriocinas producidas por aislados naturales bacterianos, debido principalmente a que 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 (Biswas y col., 1991; Yang y Ray 1994; Diep y col., 2000; Maldonado 2004; Barboza-Corona y col., 2007). Por otro lado, es conveniente mencionar que también el tipo y concentración de diversas bacteriocinas puede estar sujeto a otras condiciones ambientales (deVuyst, 1996, Nilsen, 1998, Demain, 1998) generadas por los parámetros que intervienen en el proceso como son la sensibilidad a temperatura (Diep y col., 2000) la influencia y rango del pH (Kaiser y Montville, 1993, Barboza-Corona y col., 2007) y la capacidad de crecimiento óptimo en diferentes medios de cultivo (Barefoot y Klaenhammer, 1983; Fricourt y col., 1994; Yang y Ray, 1994; Biswas y col., 1991).

En general, las bacteriocinas pertenecen al grupo de metabolitos secundarios microbianos codificados por grupos de genes (“clusters”) que se sintetizan en condiciones de agotamiento de algún nutriente, por la biosíntesis o adición de algún inductor y/o por el descenso de la velocidad de crecimiento (Demain, 1989). Por lo anterior, el mecanismo biosintético es por lo tanto muy heterogéneo y la producción de estas proteínas puede requerir o no la presencia de una cepa sensible que actúa como inductor (Maldonado y col., 2004). También se ha reportado que la síntesis y producción de las bacteriocinas se puede realizar por diversos mecanismos por ejemplo, la síntesis de las Enterocinas A y B en *Enterococcus faecium* dependen de la presencia de un péptido extracelular sintetizado por la misma bacteria (Nilsen y col., 1998), la Nisina al ser excretada al medio por *Lactococcus lactis* induce su propia síntesis y la controla a través de un mecanismo de autorregulación

(Kuipers y col., 1995), en *Lactobacillus sake* se requiere la síntesis de un componente peptídico no antibacteriano de 19 residuos de aminoácidos denominado factor de inducción que funciona presumiblemente como una señal de quórum-sensing para producir la Sakacina P (Nes y col., 1996; Nes y col., 1999). La inducción de la síntesis de las bacteriocinas de *Lactobacillus acidophilus* (Barefoot y col., 1994) y *Lactobacillus plantarum* (Diep y col., 1996) se debe también a la presencia de péptidos sin actividad antibacteriana que ellos mismos sintetizan.

6.2.4 Producción de bacteriocinas

Las bacteriocinas generalmente son aisladas de los cultivos productores bajo condiciones de laboratorio, sin embargo, el proceso de extracción, aislamiento y purificación está expuesto a contaminación por otras bacterias y microorganismos en general. Igual que otros compuestos utilizados en investigación las bacteriocinas se almacenan antes de aplicarlas en los experimentos y por lo tanto, deben estar libres de bacterias y otros contaminantes para evitar que pierdan su estabilidad y actividad (Jung y col., 2008). Lo anterior se puede lograr siguiendo estrictas medidas de control de calidad en el laboratorio que aseguren eficientes condiciones de esterilidad de materiales, reactivos y medio ambiente en general.

Las bacteriocinas de bacterias Gram positivas son no inducibles o solamente poco inducibles (Hasdy, 1982), en la mayoría de los casos se obtiene bajos títulos de actividad en los caldos de cultivo. Para la producción de bacteriocinas es recomendable empezar con grandes lotes de cultivo, se requiere conocimientos sobre las condiciones de incubación y la influencia del pH y temperatura sobre el rendimiento de la bacteriocina activa (Laukova, 1992; Carolissen-Mackay y col., 1997). La formulación del medio de cultivo tiene un enorme efecto sobre la producción de las bacteriocinas (Tagg y col., 1976), y en general medios de cultivo complejos como MRS, M17 y ATP son los más utilizados para las BAL, siendo altamente ricos en proteínas con un rango de peso molecular semejante al de la mayoría de las bacteriocinas (3,000-6,000 Da) (Parente y Hill, 1992), lo cuál posteriormente produce interferencias durante el proceso de purificación (Barefoot y Klaenhammer, 1984). Por otro lado el tween 80 que se utiliza como surfactante en medios

complejos puede llegar a incrementar o interferir con la producción y purificación de bacteriocinas (Mortvedt y col., 1991; Muriana y Klaenhammer, 1991b; vanLaack y col., 1992), y se ha comprobado que disminuye la actividad antimicrobina de bacteriocinas como la Pediocina y Lactocina S (Piva y Headon, 1994; Mørtvedt y col., 1991). Por otro lado, la adición de ciertos compuestos al medio pueden incrementar la actividad de algunas bacteriocinas, como el caso del SDS (Dodecil-lauril-sulfato de sodio) que incrementa significativamente la actividad de la Mesentericina 5, o como el NaCl al 4 % (peso/volumen) que incrementa la actividad de la Plantaricina S y permite la detección de una segunda bacteriocina, la Plantaricina T (Daba y col., 1991; Jiménez-Díaz y col., 1993).

6.2.5 Regulación de la producción de bacteriocinas

La inducción para producción de las bacteriocinas en muchas Gram positivas se realiza a través de un mecanismo de quorum sensing, un tipo de comunicación de célula a célula en el cuál la expresión de los genes y la síntesis de varias proteínas dependen de la densidad celular en el medio de cultivo (Kuipers y col., 1998). Los microorganismos obtienen la información de la densidad celular en el medio por la presencia de un péptido señal situado dentro del operón y que autoregulan la biosíntesis. El mecanismo de quorum sensing se regula por un sistema de transducción de señales conformado de dos componentes: un sensor proteico y un regulador de la respuesta (Stock y col., 1990) que funciona primero sintetizando una pequeña molécula señal, la transforma en el interior celular y la secreta a través de un sistema de transporte ATP-dependiente. La molécula posteriormente es detectada por una proteína histidín kinasa localizada en la membrana celular, y al unirse al péptido se fosforila y transmite una señal al regulador intracelular. El regulador del sistema de respuesta se une repetidamente en una región situada arriba (en dirección 5') del promotor del operón, activando la transcripción de los genes blanco (Guder y col., 2000) y regulando la expresión de varios genes, incluyendo los genes que codifican el péptido precursor de la molécula señal (Kotelnikova y Gelfand, 2002).

6.2.6 Purificación de bacteriocinas

Las bacteriocinas se producen de manera natural durante la fermentación de los alimentos, pero además se pueden producir en mayor cantidad por fermentación *in vitro*

bajo óptimas condiciones fisicoquímicas (Leroy y De Vuyst, 2005). Esta mayor producción de bacteriocinas se debe a la ausencia de factores limitantes como son la fuerte restricción de la difusión en el medio, la inactivación por proteasas y la adsorción a partículas del alimento (Schmidt y Tirado, 2001). Sin embargo, aún realizándose la fermentación controlada puede haber diferencias en la actividad en las bacteriocinas producidas debido a la influencia del medio ambiente sobre el proceso, por ejemplo, una variación en el pH del medio puede provocar menor liberación de la bacteriocina de la célula productora y menor disponibilidad (Yang, 1992; Lejeune, 1998). En resumidas cuentas, las variaciones en pH, temperatura, y la disponibilidad de nutrientes interfieren de manera crucial en la bacteriocinogénesis e indirectamente en la producción de biomasa (Leroy y De Vuyst 1999, Verluyten y col., 2004). Lo anterior se debe a que la síntesis de bacteriocinas es una característica fisiológica dependiente del crecimiento celular, por lo que presenta una cinética de primer orden (De Vuyst y col., 1996; Leroy y De Vuyst, 1999).

Con respecto a la purificación de bacteriocinas, especialmente de las BAL, se han establecidos tres métodos principales. En el primero, la purificación se realiza por el método convencional iniciando con una serie subsecuente de pasos de precipitación con sulfato de amonio, el intercambio iónico, la interacción hidrofóbica, la filtración en gel y la cromatografía líquida de alta presión en fase reversa (Mørtvedt, 1991; Parente y Ricciardi, 1994). El segundo es un método simple de tres etapas que incluye a) la precipitación del sulfato del amonio, b) la extracción/precipitación con cloroformo/metanol, c) cromatografía líquida de alta presión en fase reversa, única etapa de cromatografía involucrada. En el tercero, las bacteriocinas se pueden aislar por una sola operación unitaria, la adsorción en un lecho expandido, utilizando un gel de interacción hidrofóbica, después de maximizar la disponibilidad de la bacteriocina por ajuste de pH del medio de producción (Callewaert y Vuyst 1999; Foulquié, 2001). La utilización de los dos últimos métodos ha permitido purificar algunas bacteriocinas de la clase II con potencial aplicación industrial, por ejemplo la amylovorina L producida por *Lactobacillus amylovorus* DCE 471, además de algunas enterocinas producidas por cepas de *Enterococcus faecium* RZS C5, RZS C13 y FAIR-E 406, y la mecedocina del tipo lantibiótico producida por *Streptococcus macedonicus* ACA-DC 198) (Callewaert y col., 1999; Foulquié y col., 2002;

Georgalaki y col., 2002). Con la finalidad de obtener preparaciones de bacteriocinas con la máxima actividad antimicrobiana, se han desarrollado metodologías que permiten concentrar su actividad, siendo la desecación una meta que puede proporcionar bacteriocinas más estables. Los métodos modernos más utilizados para este fin, son la ultrafiltración o filtración tangencial que permite obtener concentrados de bacteriocinas de cultivos de BAL utilizando membranas de poros de tamaño medio y menor al de la bacteriocina; esta técnica es muy reciente y se ha aplicado para concentrar proteínas de lactosuero y para purificar la halocina C8 (Atra y col., 2005; Li y col., 2003). Otro método aplicado a nivel industrial es el secado por electrospray que consiste en la evaporación para aumentar el contenido de sólidos del medio y liofilizar la muestra obteniendo un compuesto en polvo con pocas células y alta actividad, que además se puede almacenar por meses. Este procedimiento permitió obtener preparados activos de la lacticina 3147 (Morgan y col., 1999 y 2001)(patente 6833150 en EUA), y además un preparado activo de una mezcla de bacteriocinas producidas por *Lactobacillus sakei*, *L. salivarius* y *Carnobacterium divergens* (Silva y col., 2002).

La aplicación de intercambio iónico es otro de los métodos más comúnmente utilizados debido al carácter mayoritariamente catiónico de las bacteriocinas de las BAL, siendo la adsorción sobre matrices catiónicas seguidas de elución la práctica más común, por ejemplo, la Enterocina AS-48 purificada con carbocimetilcelulosa (CM25) (Abriouel, y col., 2003), la Enterocina P purificada con geles de sefarosa (Gutiérrez, 2005), la Enterocina F58 mediante CM25 (Achemchem, 2005) y Enterocinas A y B con sefarosa (Ennahar y col., 2001).

Como podemos evidenciar, la diversidad de las bacteriocinas reportadas no permite establecer un protocolo general para su purificación, sin embargo, es conveniente mencionar que las etapas básicas para su purificación, como es el caso de la precipitación de proteínas con sulfato de amonio para concentrarlas a partir de sobrenadantes de medios de cultivos (Carolissen-Mackay, V. y col., 1997), no siempre es eficiente para todas las clases de bacteriocinas como la Lacticina F (Muriana y col., 1991, Van Laack y col., 1992). Otra etapa que no se ha podido generalizar para concentrar preparados de

bacteriocinas es la extracción con solventes como el cloroformo, seguido del método de la doble capa de agar (Schripsema, J. y col., 1996). La eficiencia de la purificación debe medirse en cada etapa del proceso y determinar la capacidad inhibitoria de la bacteriocina estudiada para estar seguros de la ruta idónea para la máxima purificación (Parente y col., 1994; Parente y Hill, 1994).

6.2.7 Modo de acción de las bacteriocinas

El modo de acción de las bacteriocinas es complejo. En la clase I, la Nisina, y en la clase II, la Pediocina, son las bacteriocinas más estudiadas y comparten algunas características en común. Básicamente 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 ácidos nucleicos (Montville y Chen, 1998; Chikindas, y col., 1993; Sablón y col., 2000).

Las bacterias Gram-positivas se caracterizan por poseer un alto contenido en lípidos aniónicos en su membrana. El modo de acción propuesto para las bacteriocinas es una unión inicial a la membrana bacteriana por atracción electrostática entre los lípidos cargados negativamente y las bacteriocinas con su carga neta positiva localizada fundamentalmente en uno de sus extremos (extremo C-terminal de la Nisina, extremo N-terminal de la Pediocina). Luego 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 (Moll y col., 1999) y en el caso de la Pediocina, a través de su α -hélice transmembranal del extremo C-terminal (Ennahar y col., 2000). Así se forman poros en la membrana bacteriana quedando permeabilizada y la célula empieza a perder iones y metabolitos fundamentales para su supervivencia y eventualmente se produce la muerte bacteriana (Figura 1).

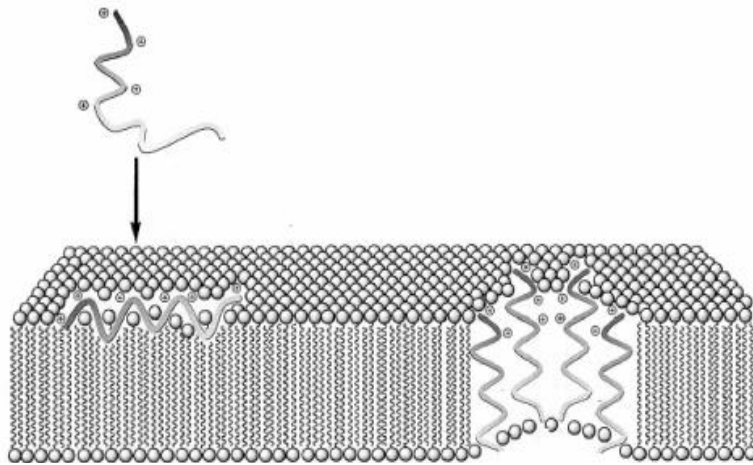


Figura 1 Mecanismo de acción de las bacteriocinas por formación de poros en la membrana bacteriana (Moll y col., 1999).

Con lo anterior se observa que las bacteriocinas comparten mecanismos de acción semejantes (Montville y col., 2001) caracterizados por la formación de poros y la disipación de la fuerza motriz de protones esencial para la síntesis de ATP, sin embargo existen algunas particularidades en el modo de acción de cada clase (Figura 2).

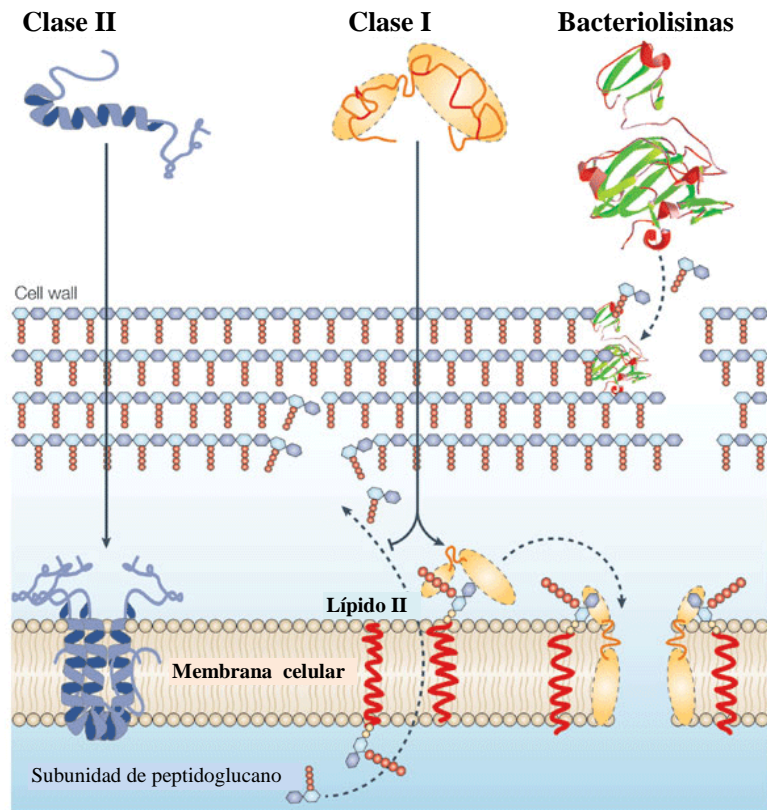


Figura 2 Modo de acción de diversas bacteriocinas (Cotter y col., 2005. Nature Reviews /Microbiology)

De la clase I, la Nisina no requiere de un receptor unido a la membrana de la célula blanco ya que reconoce la composición fosfolipídica de la célula (Abee y col., 1995), caso contrario a la acción de la Lactococina A y la Lactoestrepcina donde se requiere de la unión a receptores membranales (Kok y col., 1993). La mayoría de las bacteriocinas de la clase II afectan la fuerza motriz de protones (FMP) de las células blanco (suseptibles) a través de la formación de poros. La actividad de las bacteriocinas de la clase IIa probablemente depende de una manosa permeasa del sistema fosfotransferasa como blanco específico. Para las bacteriocinas de la clase IIa se ha sugerido que la región consenso amino-terminal tiene un papel importante en la capacidad de reconocimiento de la membrana de la célula blanco (Bruno y Montville 1993; Eijsink y col., 1998). Un ejemplo es la formación de poros por la Piscicocina CS526 causando una rápida liberación de moléculas pequeñas como K^+ de la célula indicadora y la disipación de la fuerza motriz de protones (FMP), provocando la muerte celular (Suzuki y col., 2005). La subclase IIb de las bacteriocinas de dos componentes también inducen la disipación de la FMP pero por la formación de poros

específicos catiónicos o aniónicos, sin embargo los blancos específicos no están bien identificados. Ejemplo de esta clase IIb, las Plantaricinas EF y JK dependen de la acción de dos péptidos a y b para la formación de poros y la consecutiva disipación del potencial de membrana (Moll y col., 1999). La subclase IIc que comprende péptidos diversos como la Acidocina B (Leer y col., 1995) y la Carnobacteriocina (Worobo y col., 1994) presentan varios modos de acción como la permeabilización de la membrana, inhibición específica de la formación del septo y actividad de feromona. En la clase III, que son bacteriocinas de alto peso molecular, el mecanismo de acción se desconoce y requiere ser más ampliamente estudiado.

En años recientes se han descubierto un cierto número de bacteriocinas que tienen una estructura cíclica cabeza-cola, como la Enterocina AS-48 producida por *Enterococcus faecalis*, la Gassericina A de *Lactobacillus gasseri* LA39, la Circularina A de *Clostridium beijerinckii* (Mulvenna y col., 2006). Estas bacteriocinas tienen una longitud de 50 a 70 aminoácidos y se encuentran entre las proteínas más grandes con estructura cíclicas sintetizadas ribosomalmente descubiertas hasta ahora. El blanco celular de la AS-48 es la membrana citoplasmática donde forma canales, causando la interrupción gradual de todas las rutas biosintéticas (proteínas, ADN, ARN), así como la captación de precursores, el consumo de oxígeno y el crecimiento celular. Igualmente altera los niveles intracelulares de Na^+ y K^+ y genera el colapso del potencial de membrana (Gálvez y col., 1990: Galvez y col, 1991).

6.2.8 Determinación de la actividad de las bacteriocinas

Los métodos para determinar la actividad de las bacteriocinas se basan en procedimientos enzimáticos y no-enzimáticos. En los métodos enzimáticos se mide rápidamente las enzimas liberadas del interior celular después de la lisis producida por la acción de las bacteriocinas, por ejemplo, se han observado elevados niveles de lactato deshidrogenasa después de la lisis de células susceptibles a la lactococcina (Morgan y col., 1995). Estos métodos son muy rápidos pero su precisión se ve comprometida por la calidad de las preparaciones crudas de las bacteriocinas que pueden estar contaminadas con otras enzimas antes de analizarse y pueden generar resultados falsos positivos. En los métodos no

enzimáticos las técnicas convencionales son la difusión en pozos o en discos, en los que se adiciona la bacteriocina en un pocillo realizado en un medio de cultivo sólido o sobre discos de papel que se colocan sobre agar pre-inoculado con una cepa indicadora (Tagg y McGiven, 1971; Bhunia y col., 1988). En el método de la sobrecapa la cepa bacteriocinogénica se esparce sobre placas agar previamente inoculado con la cepa indicadora (Barefoot y Klaenhammer, 1983; Venema y col., 1993; Schillinger y Lücke, 1989). También se ha reportado el ensayo en placa del antagonismo diferido dónde la cepa bacteriocinogénica se inocula sobre agar en una línea recta y la cepa indicadora crece perpendicularmente induciendo la aparición de una zona de inhibición en la intersección de las dos cepas cuya distancia puede utilizarse en análisis cuantitativos (Mélançon y Grenier, 2003). Con todas estas metodologías los resultados se obtienen en dos o tres días y su precisión es dudosa debido a las medidas subjetivas de los halos de inhibición, o en la determinación de la última dilución (crítica) que produce halos alrededor de los pocillos o los discos (Delgado y col., 2005; Barboza-Corona y col., 2007). Estas técnicas además de ser tardadas pueden proporcionar errores en los análisis cuantitativos y generar inconsistencias en la progresión geométrica de los halos al incrementarse las concentraciones de la bacteriocina (Delgado y col., 2005). Otros métodos no enzimáticos utilizan medios de cultivo líquidos y espectrofotometría, o recuento de colonias de la bacteria indicadora, pero también presentan limitaciones que pueden afectar significativamente la precisión de los resultados (Kumazaki e Ishii, 1982; Mayr-Harting y col., 1972). Estos métodos pueden eliminar los problemas asociados con los métodos de difusión en agar, sin embargo, la exactitud de sus resultados se ve influenciada adversamente por la sedimentación celular en los cultivos líquidos, por la interferencia del color de la muestra y la relación entre la concentración de la bacteriocina y su respuesta inhibitoria con la curva sigmoide (Delgado y col., 2005).

6.2.9 Aplicaciones de las bacteriocinas

La actividad antimicrobiana de las bacteriocinas representa un gran potencial para la industria alimenticia pues se pueden utilizar como conservadores biológicos puros que en

un momento dado podrían reemplazar a los conservadores químicos porque tienen la ventaja de ser proteínas que al biodegradarse no forman compuestos secundarios.

Las aplicaciones de las bacteriocinas como bioconservadores de alimentos se ven influenciadas por sus propiedades particulares como su espectro de inhibición, estabilidad de acuerdo a su rango de pH y temperatura, sensibilidad a enzimas y solubilidad. De acuerdo con Holzalpfelp y col., (1995), para que una bacteriocina sea aplicada en alimentos debe cumplir varios requisitos: 1) ser reconocida como GRAS, 2) la bacteriocina debe tener un amplio rango de inhibición contra los principales patógenos transmitidos por alimentos o ser altamente específica contra alguno en particular, 3) la bacteriocina debe ser termoestable, 4) no debe presentar riesgo alguno contra la salud, 5) debe tener efecto benéfico sobre el producto alimenticio, mejorando su inocuidad sin alterar sus propiedades organolépticas y su calidad nutricional.

Para que una bacteriocina pueda ser considerada y aplicada como un aditivo alimentario, deben haberse realizado ciertas investigaciones para establecer su rango de actividad, conocer las características bioquímicas y genéticas tanto de la cepa productora como de la bacteriocina, conocer la sensibilidad de la bacteriocina frente a los cambios de pH y temperatura, los factores que afectan su producción, técnicas que se involucran en el proceso de su purificación y el costo de su aplicación en el alimento (Yang y Ray, 1994). Además de lo anterior, para que la aplicación de las bacteriocinas sea efectiva y segura, estas deben de conservar sus propiedades aún después de recibir el procesado que requieren los alimentos, y para saber si esto se cumple se debe establecer el comportamiento de las bacteriocinas de acuerdo a los siguientes parámetros:

- a) Sensibilidad a pH: La industria alimentaria demanda bacteriocinas que sean estables a pHs neutros porque una gran variedad de bacterias patógenas se desarrollan bajo esas condiciones, y la mayoría de los alimentos que requieren de conservadores tienen un pH cercano a la neutralidad.
- b) Sensibilidad a proteasas: Por su naturaleza proteica, las bacteriocinas son susceptibles a estas enzimas, facilitando su degradación después de ser ingeridas y evitando trastornos intestinales.

c) Tolerancia al calor: Una característica de las bacteriocinas producidas por BAL es su termotolerancia, por lo que no sufren alteraciones con los tratamientos térmicos que deben aplicarse a ciertos alimentos.

El empleo de las bacteriocinas encierra una serie de beneficios en comparación con el uso de los conservadores químicos tradicionales (Ruiz-Larrea, F., y col., 2007) ya que:

- a) Demostraron un uso seguro en la cadena alimentaria humana y con menos limitaciones que los conservadores químicos, ya que son moléculas producidas de forma natural por microorganismos fermentativos endógenos de alimentos tradicionales.
- b) No existen resistencias conocidas, ni impacto medioambiental puesto que son rápidamente degradadas en la cadena alimentaria humana.
- c) Poseen un espectro de acción muy definido.
- d) Las bacteriocinas en si, presentan un impacto sensorial nulo en el producto final.
- e) Su actividad se ve potenciada con el pH y poseen efecto complementario al de otros agentes antimicrobianos.
- f) Su aplicación es compatible con el etiquetado de producto ecológico sin conservantes químicos ni de síntesis.

Sin embargo, el empleo de bacteriocinas también tiene inconvenientes, tales como:

- a) Son menos conocidas que los conservantes químicos, puesto que la nisina fue la primera bacteriocina conocida, y se descubrió en 1933.
- b) No son indestructibles y se degradan rápidamente por las enzimas proteolíticas.
- c) Se necesitan conocimientos técnicos especializados para prepararlas y utilizarlas correctamente, lo cual encarece su empleo.
- d) Son eficaces sólo frente a un tipo determinado de bacterias.
- e) Existen limitaciones legales en su empleo como aditivos alimentarios que exigen validaciones específicas y su aprobación antes de ser empleadas de forma purificada o semipurificada.

Existen tres formas comúnmente utilizadas para aplicar las bacteriocinas en la bioconservación de alimentos (Schillinger y col., 1996):

- 1) Inoculación del alimento con BAL productoras de bacteriocinas en el alimento. La capacidad de las BAL para producir bacteriocinas es crucial para una aplicación exitosa.
- 2) Adición de bacteriocinas purificadas o semi-purificadas como conservadores del alimento.
- 3) Uso de un producto previamente fermentado con una cepa bacteriocinogénica como un ingrediente más del alimento procesado.

Es conveniente mencionar que la nisina y su aplicación tiene una larga historia y actualmente es utilizada como conservador seguro de alimentos en alrededor de 48 países diferentes siendo la única aprobada por la FDA (Food and Drug Administration) desde 1988 (Ross y col., 1999).

6.2.9.1. Bioconservación de productos lácteos

Los principales patógenos relacionados con la industria de productos lácteos son *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* (De Buyser y col., 2001), además el deterioro en quesos como el Kasserli, Emmentaler, Gruyère, Grana, Edam, Gouda se debe a la formación de gas a partir del *Clostridium tyrobutyricum* (Bergère y Lenoir, 2000). *L. monocytogenes* también es la causante de brotes asociados con el consumo de leche pasteurizada (Fleming y col., 1985) y quesos (James y col., 1985). La bacteriocina Nisina en su presentación comercial (Nisaplin[®]) ha demostrado ser efectiva en el control de *C. tyrobutyricum* (De Vuyst y Vandamme, 1994; Hirsch y col., 1951). En el procesamiento de quesos y productos de quesos como el queso suave, rebanado, dips y salsas de queso la nisina se aplica como control del desarrollo de microbios esporulados y productores de gas como los clostridios, incluso *C. botulinum*, además de controlar otros contaminantes comunes después del procesamiento como *L. monocytogenes* (Davies y Delves-Broughton, 1999; Thomas y Delves-Broughton, 2001). Esta bacteriocina también se ha utilizado en otros productos lácteos pasteurizados como postres frescos y leches saborizadas, crema o leches evaporadas (Thomas y col., 2000). En crema la Nisina incluso en bajas concentraciones inhibe el crecimiento de *Bacillus cereus* durante el almacenamiento (Nissen y col., 2001). La vida de anaquel de quesos pasteurizados adicionados con 301 y 387 UI/gr de Nisina en proceso es mucho mayor que la de quesos

donde se aplicó la Nisina después del proceso. En quesos para untar empacados en frío, 100 y 300 UI/gr de Nisina reducen significativamente las cuentas microbianas de *L. monocytogenes*, *S. aureus*, y esporas de *C. sporogenes* (Zottola y col., 1994). Adicionar Nisina en leche está permitido en ciertos países para evitar la descomposición en tiempos de mucho calor, durante el transporte a largas distancias o en sistemas refrigeración inadecuada (Davies y Delves-Broughton, 1999; Thomas y col., 2000). En leche descremada, suero o leche ultrafiltrada, se ha combinado la nisina con campos de pulsos eléctricos para inhibir diversos microbios como *L. monocytogenes*, *S. aureus*, *B. cereus*, y *E. coli* (Calderón-Miranda y col., 1999b; Pol y col., 2001; Sobrino-Lopez y Belloso, 2006; Terebiznik y col., 2002). Otra bacteriocina de amplio espectro y de dos componentes la Lactacina 314, producida por *L. lactis* subsp. *Lactis* DPC 3147, se utiliza en el control de calidad de queso cheddar para reducir poblaciones de cepas no BAL durante el proceso de maduración (Ross y col., 1999).

Existen muchas investigaciones de las bacteriocinas enterococicas para aplicarse en productos lácteos (Moreno y col., 2006; Giraffa, 1995), por ejemplo las bacteriocinas de *E. faecium* DPC1146 inhiben a *L. monocytogenes* en leche (Parente y Hill, 1992), la Enterocina CCM 4231 reduce las cuentas viables de *S. aureus* SA1 en leche descremada y leche para formulas infantiles y yogurt (Lauková y col., 1999a, 1999b). La Enterocina 226 NWC producida por *E. faecalis* 226, inhibe a *L. monocytogenes* por co-cultivo a 30°C en la leche descremada (Villani y col., 1993). La Enterocina A producida por *E. faecium* DPC 1146 se produce durante la manufactura de queso cheddar (Foulquié Moreno y col., 2003). Enterocinas A, B, y P producidas por *E. faecium* RZS C5 en la manufactura de queso cheddar presentan actividad anti-listeria por co-cultivo (Leroy y col., 2003, Foulquié Moreno y col., 2003).

6.2.9.2 Bioconservación de productos cárnicos

Los productos cárnicos dependiendo de sus condiciones de almacenamiento representan un excelente medio para el crecimiento microbiano, aún en refrigeración llegan a crecer bacterias gram-negativas aerobias como *Pseudomonas*, BAL anaerobias como *Carnobacterium*, *Lactobacillus* y *Leuconostoc* (Borch y col., 1996; Gram y col., 2002),

incluso bacterias tolerantes al CO₂, como los lactobacilos principalmente *Lactobacillus sakei* y *L. curvatus*, *Leuconostoc carnosum*, *L. gasicomitatum*, *L. mesenteroides*, *Weissella* spp. y *Carnobacterium* spp. Estos microorganismos representan la causa principal de deterioro en productos cárnicos provocando acidez, decoloración, producción de gas, formación de baba y cambios de pH (Aznar y Chenoll, 2006; Chenoll y col., 2007). También *Brochothrix thermosphacta* puede desarrollarse en cárnicos produciendo olores a fermentado (Borch y col., 1996; Gram y col., 2002; Samelis y col., 2000). Además, bajo ciertas condiciones se desarrollan patógenos, siendo los más comunes *E.coli* enterohemorrágica y *L. monocytogenes* (Grau y Vanderlinde, 1992; Johnson y col., 1990). Esta última tiene capacidad de crecer en refrigeración y anaerobiosis, está implicada en brotes por alimentos contaminados y para la cuál existe cero tolerancia en Estados Unidos (Jay 1996; Ryser y Marth, 1999).

La bacteriocina más aplicada para bioconservar estos productos y protegerlos de *L. monocytogenes*, es la Nisina en concentraciones de 400 a 800 UI/gr, o bien combinada con 2% de NaCl (Pawar y col., 2000), sin embargo al bajar las temperaturas de refrigeración, la efectividad de la nisina es baja. También evaluó la actividad anti-listeria de la Nisina A y la Pediocina AcH en carne de cerdo cruda, considerando a la nisina A más efectiva (Murray y Richard, 1997). Una cepa productora de Pediodicina se adicionó en embutidos y reduce el número de bacterias patógenas unas 10, 000 veces más que en embutidos no tratados y permanece activa después de dos meses en refrigeración. Otro ejemplo, la Piscicolina se patentó y pronto será aplicada en productos cárnicos y como desinfectante para lavar ensaladas verdes (Ralof, 1998). En carne de cerdo picada y paté de hígado de cerdo, jamón y pechuga de pollo, la adición de Enterocinas A y B muestran elevados efectos anti-listeria (Aymerich y col., 2000). En jamón horneado se aplicó una mezcla modelo de varias bacteriocinas: Enterocinas A y B, Sakacina K, Pediocina AcH o Nisina, y demostraron que actúan sinérgicamente en combinación con alta presión hidrostática para reducir o inhibir bacterias (Garriga y col., 2002). En el deterioro de carne empacada al vacío causado por *L. sake* se probó la Leucocina A para evitar la descomposición (Leisner y col., 1996). La Leucocina 410 responde satisfactoriamente ante la inhibición de *L. monocytogenes* en productos cárnicos en rebanadas (Jacobsen y col., 2003). En la carne de puerco empacada

al vacío se aplica una combinación de Nisina y lisozima muy efectiva para inhibir *B. thermosphacta* y LAB (Nattress y Baker, 2003; Nattress y col., 2001).

6.2.9.3 Bioconservación de productos marinos

En los productos marinos preservados con bajos niveles de NaCl, ligera acidificación y empacados a vacío en refrigeración (pescado ahumado), la microflora contaminante está compuesta de LAB, principalmente *Lactobacillus* y *Carnobacterium* y algunos gram-negativos como *Photobacterium phosphoreum* y psicrófilos como *Enterobacteriaceae*. Algunas bacterias como *L. sakei*, *B. thermosphacta*, *Serratia liquefaciens*, y *P. phosphoreum* causan olores desagradables (Stohr y col., 2001). El control microbiano inadecuado de productos marinos ahumados, empacados al vacío, puede ocasionar su descomposición. Otro patógeno de interés en la industria de los mariscos es *L. monocytogenes* (Ben Embarek, 1994; Rocourt y col., 2000; Rørvik, 2000). El efecto de la Sakacina P y/o cultivos de *L. sake* en salmón ahumado es solamente bacteriostático (Katla y col., 2001). La adición de Nisina en cantidades de 500 a 1 000 UI/g en salmón ahumado y contaminado con *L. monocytogenes* solo retrasa, pero no reduce su crecimiento (Nilsson y col., 1997). En productos de sardina contaminados ha sido efectivo el uso combinado de Nisina y el sistema lactoperoxidasa (Elotmani y col., 2004). También se probaron la Nisina Z, la carnocina UI49 y bavaricina A para extender la vida de anaquel de langostinos; la carnocina no surtió efecto comparada con el control (10 días), la Bavaricina A aumentó la vida de anaquel en 16 días y la Nisina Z en 31 días (Einarsson y Lauzon, 1995). Cepas de *C. piscicola* A9 productora de la Carnobacteriocina B2 y *C. piscicola* CS526 productora de Piscicolina CS526 se adicionaron en jugo de salmón y salmón ahumado, mostrando un efecto anti-listeria (Nilsson y col., 2004; Yamazaki y col., 2003).

6.2.9.4 Bioconservación de productos vegetales y bebidas

Los microorganismos contaminantes de vegetales capaces de causar enfermedades son *C. botulinum*, *B. cereus* y *L. monocytogenes*, puesto que se encuentran en la mayoría de los suelos, además *Salmonella*, *Shigella*, *E. coli* y *Campylobacter* pueden llegar a contaminar las frutas y vegetales a través de desechos fecales, aguas residuales, agua de irrigación contaminada o agua superficial (Cliver, 1997; Speer, 1997). Varios casos de

listeriosis se han asociado con vegetales frescos como apio, tomates y lechuga (Beuchat, 1996). La Nisina reduce significativamente los niveles de *L. monocytogenes* en judías en refrigeración (Cai y col., 1997). La mundticina producida por *Enterococcus mundtii* inhibe a *L. monocytogenes* en vegetales mínimamente procesados pero no en judías frescas (Bennik y col., 1999). La Nisina y la Pediocina individualmente o en combinación con lactato de sodio, sorbato de potasio, ácido pítico y ácido cítrico se probaron en tratamientos de sanitización para reducir niveles de *L. monocytogenes* en broccoli, repollo y frijol germinado (Bari y col., 2005). La Enterocina AS-48 puede ser de mucha utilidad en la desinfección de vegetales crudos, como la fuerte inhibición de *S. aureus* y la total inactivación de *L. monocitogenes* y *B. cereus* en lechugas (Grande y col., 2005b). En jugos y bebidas de frutas, la Nisina previene la descomposición causada por *Alicyclobacillus acidoterrestris* (Komitopoulou y col., 1999; Yamazaki y col., 2000). Éste microorganismo también se inhibe totalmente por la Enterocina AS-48 (Grande y col., 2005a). La Nisina y Enterocina AS-48 son capaces de inactivar endosporas de *A. acidoterrestris* (Grande y col., 2005a; Komitopoulou y col., 1999; Yamazaki y col., 2000).

6.2.9.5 Aplicaciones biomédicas

En la medicina veterinaria se aplican tradicionalmente los antibióticos para el tratamiento profiláctico y terapéutico, pero las bacteriocinas representan una alternativa real y efectiva con la ventaja de no conferir resistencia como los antibióticos utilizados tradicionalmente (Ross y col., 1999).

En la década de los 40s se evaluó la Nisina como una alternativa en el tratamiento de la mastitis, y proporcionó buenos resultados, sin embargo fueron detectados problemas de irritación debidos posiblemente a impurezas en las preparaciones de nisina (Taylor y col., 1949). Recientemente esta bacteriocina es reportada como efectiva contra los principales patógenos Gram-positivos involucrados en la mastitis como cepas de *Streptococcus* y *Staphylococcus* (Broadbente y col, 1989). Las formulaciones a base de Nisina se han reportado como efectivas contra el tratamiento de mastitis en vacas lactantes cuando se aplican en infisiones con una dosis de 2, 500, 000 UI, proporcionando un alivio del 90.2% de las vacas tratadas (Cao y col., 2007).

Otras bacteriocinas como la Lacticina 3147 ha probado que posee actividad bactericida contra la mayoría de las bacterias responsables de la mastitis (Rayn y col., 1998). Las bacteriocinas Pep5, Epilancina K7, Epicidina 280 y la Epidermina también se han probado efectivamente contra cepas de *S. epidermidis* y *S. aureus* aisladas de infecciones en una dosis de 640 UI/ml, y se cree que actúan inhibiendo la adhesión de *S. epidermidis* a los catéteres de silicón y se reduce significativamente el número de células y definitivamente representan una novedosa estrategia para control de las infecciones (Fontana y col., 2006). Las bacteriocinas producidas por *S. aureus* (Aureocinas A70, A53 y 215FN) se han probado efectivamente contra cepas del mismo *S. aureus* y *Streptococcus agalactiae* aisladas de mastitis bovina (Varella-Cohelo y col., 2007). También la Macedocina ST91KM producida por *S. gallolyticus* muestra actividad contra diversas especies de *Staphylococcus* y *Streptococcus* asociadas a mastitis (Pieterse y col., 2008).

6.2.10 Tecnologías de barrera

La susceptibilidad de los microbios hacia agentes antimicrobianos puede incrementarse o mejorarse si aplicamos el concepto de barrera, el cuál establece que dos o más agentes antimicrobianos en niveles sub-óptimos pueden actuar mejor sinérgicamente que cada uno por separado aún niveles óptimos (Leistner y Gorris, 1995). Las células subletalmente tratadas por diferentes condiciones de estrés pueden llegar a ser sensibles a agentes físicos y químicos a los que son resistentes en condiciones normales (Ray, 1992). Diversas investigaciones han tratado de vencer las barreras de penetración en bacterias Gram-negativas para sensibilizarlas al efecto de las bacteriocinas a través de métodos físicos, químicos o genéticos. Por ejemplo, la *Salmonella* y otras 22 bacterias Gram-negativas se han sensibilizado a la nisina y a otras bacteriocinas después de exponerlas a tratamientos que modifican su permeabilidad en la membrana externa como la combinación de tratamientos físicos con presión hidrostática, calentamiento, congelación y secado (Stevens y col., 1991). También se han combinado tratamientos químicos adicionando ácido etilen-diamino tera-acético (EDTA) o etil maltol (Stevens y col., 1991; Kalchayanand y col., 1992; 1994; Hauben y col., 1996; Schved y col., 1996).

El mencionado "efecto barrera" es de fundamental importancia para la conservación de **alimentos** dado que las barreras en un **producto** estable controlan los **procesos** de deterioro, intoxicación y **fermentación** no deseados. Además, el **concepto** de barrera ilustra el hecho de que las complejas interacciones entre **temperatura**, actividad de **agua**, **pH**, potencial redox, etc., son significativas para la estabilidad microbiana de los **alimentos**. La **tecnología** de barreras o **tecnología** de obstáculos o **métodos** combinados, permite mejoras en la **seguridad** y **calidad**, y en las propiedades económicas de los alimentos, por ejemplo, cuánta **agua** en un **producto** es compatible con su estabilidad, mediante una combinación inteligente de barreras que aseguran la estabilidad y **seguridad** microbiana, así como propiedades nutritivas y económicas satisfactorias.

Las tecnologías de barrera cada día avanzan en su aplicación para el diseño de alimentos, tanto en los países industrializados como en los países en desarrollo, con varios objetivos de acuerdo a cada necesidad (Alzamora y col., 1993, 1998). Por ejemplo, en las distintas etapas de la cadena de distribución, durante el almacenamiento, procesamiento y/o envasado, como una medida de soporte en los productos mínimamente procesados de corta vida útil para disminuir el riesgo de contener patógenos y/o aumentar su vida de anaquel a través del uso de agentes antimicrobianos y la reducción de la actividad de agua (a_w) y pH además de la refrigeración. También son una herramienta para mejorar la calidad de productos de larga vida de anaquel sin disminuir su estabilidad microbiológica, como es el uso de coadyuvantes al calor para reducir la severidad de los tratamientos térmicos en los procesos de esterilización. Además son novedosas técnicas de conservación para obtener alimentos nuevos, por ejemplo combinando innovadoramente los factores de conservación.

En los países industrializados, el concepto de barrera se dirige principalmente al desarrollo de una gran variedad de alimentos con procesamiento térmico suave y distribuidos en forma refrigerada o congelada. Las aplicaciones típicas son para desinfección de materias primas (carnes, frutas, hortalizas), para carnes fermentadas como jamones crudos, embutidos crudos fermentados y para carnes con tratamiento térmico suave (productos «listos para consumir»), en frutas y hortalizas frescas troceadas, en

alimentos empacados al vacío y cocidos-refrigerados. También se aplican en alimentos de bajo contenido de calórico, bajos en grasas y sales y alimentos funcionales.

El efecto barrera se utiliza en alimentos procesados por las técnicas emergentes que incluyen altas presiones hidrostáticas, pulsos eléctricos de alto voltaje, radiación ultravioleta, etc., o como tecnología “invisible” que incorpora barreras adicionales que doblemente aseguran la calidad de alimentos refrigerados expuestos a abusos de temperatura (Leitsner y Gould, 2002; Ahvenainen, 1996; Wiley, 1994). En muchos países en desarrollo, enfoque del efecto barrera se aplica en el desarrollo de alimentos estables a temperatura ambiente, con requerimientos energéticos de equipamiento y de infraestructura mínimos, tanto para el procesamiento como para la distribución y el almacenamiento (Leitsner y Gould, 2002). Comúnmente se aplica en alimentos con baja a_w como la deshidratación parcial o por agregar sales o azúcares combinadas con acidificación y antimicrobianos, en alimentos fermentados, en alimentos con bajo pH y antimicrobianos naturales y en alimentos envasados con exclusión de oxígeno ya sea envasados al vacío o cubiertos con una capa de aceite.

6.3 *Bacillus thuringiensis*

6.3.1 Generalidades

Bacillus thuringiensis (Bt) se descubrió en 1901 en Japón por Ishiwata en los gusanos de seda llamándolo *Bacillus sotto* y en 1911 fué aislado por Ernest Berliner en Alemania de la polilla de la harina. Bt está relacionado a *B. cereus* patógeno oportunista en alimentos y *B. anthracis* causante del anthrax (Helgason y col., 2000; Madigan, 2005). *B. thuringiensis* pertenece a la familia *Bacillaceae*, presenta células vegetativas en forma de bastón, flageladas, de 1-1.2 μm de ancho y 3-5 μm de largo, agrupadas en cadenas de 2 a 3 células, es Gram positiva, aerobia estricta y esporógena que durante su cultivo y asociada a la formación de esporas o cuerpos parasporales, sintetiza cristales de naturaleza protéica y con propiedades insecticidas llamadas δ -endotoxinas o proteínas Cry y Cyt activas contra insectos lepidópteros (mariposas), coleópteros (escarabajos), dípteros (mosquitos), himenópteros (hormigas), ácaros y a otros invertebrados como nemátodos, gusanos planos y protozoarios; precisamente este cristal es lo que la diferencia de *B. cereus* y *B. anthracis*

(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.

A partir del análisis serológico de los antígenos flagelares “H” se clasifican fenotípicamente las sub-especies de Bt, hasta 1998 se habían descrito 67 sub-especies y 58 serovariedades diferentes (Schnepf y col., 1998). Los genes que codifican las proteínas insecticidas están principalmente en plásmidos, y por lo general cada una es el producto de un solo gen. La mayoría de los plásmidos con genes de proteínas insecticidas fácilmente son transferibles por conjugación entre cepas de Bt u otras especies bacterianas.

Actualmente esta clasificación se complementa con la caracterización por biología molecular basada en la secuencia de los genes *cry* y *cyt*, principales genes codificadores de las proteínas de los cristales. Diferentes dominios de las proteínas Cry son responsables de la susceptibilidad del hésped (reconocimiento del receptor) y la toxicidad (formación del poros). Comúnmente la caracterización de cepas de Bt o su cristal incluye el análisis de ácidos grasos de pared celular, anticuerpos monoclonales, la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), perfiles plasmídicos, estudios del DNA (huella genética) y perfiles de electroforesis en geles de poliacrilamida bajo condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE).

Algunas cepas de Bt durante su crecimiento vegetativo sintetizan un diverso grupo de compuestos o factores de virulencia (www.microbiologia.org.mx/microbiosonlinea) contra los insectos blanco. Este grupo incluye fosfolipasas (Vadlamudi y col., 1995), proteasas (Lee y col., 1996), quitinasas, α -exotoxinas o exotoxinas termolabiles (Parker y Pattus, 1993), las β -exotoxinas (análogos de ATP) (Knowles y Ellar, 1987) y las proteínas VIP, que son proteínas insecticidas que se producen en la fase vegetativa del crecimiento (Ebersold, 1978). Los recuentos de esporas no reflejan con exactitud la actividad insecticida de una cepa o un preparado de Bt, se mide la potencia en unidades tóxicas internacionales (UTI/mg) de cada producto mediante ensayos biológicos para los que se utiliza un patrón internacional basado en un insecto concreto. Se ha reportado que en algunos casos la mezcla esporas/cristales mata mucho más eficientemente que los cristales solos, indicando que las esporas son importantes para aumentar la toxicidad de la bacteria.

En la tabla II se observan los productos de *Bt* subsp *israeliensis* disponibles en el mercado a nivel mundial (Maldonado-Blanco, 2005).

Tabla II

Productos a base de <i>B. thuringiensis israelensis</i> en el mercado mundial	
Producto	Compañía productora
Vectobac g y cg	Valent Biosciences Co.
ABG	Valent biosciences Co.
Teknar HP-D	Valent biosciences Co.
Vectobac WDG	Valent biosciences Co.
Vectobac 200g	Valent biosciences Co.
Vectobac 1200l	Valent biosciences Co.
Bacti San	Summit Chem. Co.
Bactimos briquets	Summit Chem. Co
Bactimos pellets	Summit Chem. Co
Mosquito dunks	Summit Chem. Co
Skeetal	Novo
Bactis	C. di Ricerca Chim.
Mosquitocid	Radonja
ABG 6185 (<i>B. sphaericus</i>)	Valent Biosciences Co.
Vectolex (<i>B. sphaericus</i>)	Valent Biosciences Co.

6.3.2 δ -endotoxinas (proteínas Cry y Cyt)

Las proteínas Cry polipéptidos que forma inclusiones paraesporales proteínicas con efectos tóxicos verificables experimentalmente sobre un organismo susceptible, o bien una proteína que posee una obvia similitud de secuencia con alguna proteína Cry conocida. Similarmente las proteínas Cyt se encuentran formando parte de cristales sintetizados por diversas especies de *Bt*, tales como la *israeliensis*. Este tipo de proteínas presentan actividad hemolítica, y no poseen similitud con las proteínas Cry (Crickmore y col., 1998).

Las proteínas Cry poseen 3 dominios, el dominio I consiste en un paquete de 7 α -hélices antiparalelas, donde la hélice 5 esta rodeada por las demás; el dominio II consta de 3 láminas antiparalelas β distribuidas en una típica topología de “llave griega”, acomodada en lo que se ha llamado un β -prisma; el dominio III consiste de 2 laminas β antiparalelas dobladas formando un β sándwich (deMaagd y col., 2003b; Galitsky y col., 2001; Grochulski y col., 1995; Li y col., 1991; Morse y col., 2001; Sankaranarayanan, 1996; Shimizu y Morikawa, 1996). La proteína Cyt consiste de un dominio sencillo en que 2 horquillas externas de α -hélices (hélices A-B y C-D) envuelven un núcleo de láminas β (cadenas 1 a 7) (Li y col., 1996).

La primera secuencia nucleotídica de un gen *cry* (1Ac) fue deducida en 1981 por el grupo de la Dra. Whiteley (Schnepf y col., 1985). La secuencia de *cry1Ac* demostró que éste codifica un polipéptido de 1176 aminoácidos y una masa molecular deducida de 133.5 kDa. Para 1989 se conocían la secuencia de 42 genes y la nomenclatura de las δ -endotoxinas era arbitraria. Hofte y Whiteley (1989) presentaron una clasificación con cuatro clases:

Cry I activas contra lepidópteros

Cry II activas contra lepidópteros y dípteros

Cry III activas contra coleópteros

Cry IV activas contra dípteros y una clase no relacionada de proteína Cyt con actividad mosquitocidal y citolítica.

Sin embargo, el descubrimiento de 29 nuevos genes que codifican para proteínas tóxicas de Bt originó la adición de dos clases CryV y Cry VI contra nemátodos (Feitelson y col., 1992). En 1998 Crickmore y col., propusieron una nomenclatura basada en el grado de divergencia evolutiva y de secuencia de aminoácidos determinantes de su actividad sin la exigencia de realizar múltiples y complejos bioensayos. Actualmente se registran 332 δ -endotoxinas clasificadas dentro de 47 grupos de proteínas Cry, 22 proteínas Cyt en 2 grupos, y 6 proteínas de Bt a las que se les ha dado un nombre ambiguo debido a datos insuficientes o inciertos de su secuencia y por lo tanto no ha sido posible clasificarlas dentro de un grupo específico (Crickmore y col., 2005).

En la página de la Sociedad para Patología de Invertebrados (Society for Invertebrate Pathology: www.sipweb.org) se encuentran registradas las diferentes proteínas Cry y sus números de acceso al banco de genes.

6.3.3 El genoma de Bt

El genoma de Bt varía entre 2.4 a 5.7 millones de pares de bases (pb) (Carlson y Kolsto, 1994). El mapa físico ha sido construido para 2 cepas de Bt (Carlson y Kolsto, 1993; Carlson y col., 1996). La comparación con mapas cromosómicos de *B. cereus* sugiere que el cromosoma de Bt tiene una organización similar en el extremo cercano al origen de replicación, y una gran variabilidad en el extremo terminal. Se ha encontrado secuencias homologas a los genes *cry* localizadas en el cromosoma de Bt, y en algunas cepas las mismas secuencias están en el cromosoma y en los plásmidos (Carlson y Kolsto, 1993). No es claro hasta que punto inciden estos genes cromosomales en la producción del cristal (Schnepf y col., 1998). Existe diversidad en el genoma de Bt y algunos genes le confieren mayor potencial para obtener cepas con mayor eficiencia insecticida, con nuevas actividades biológicas y más seguras. Ejemplo de lo anterior son los genes codificantes de quitinasas activas contra fibras de quitina de la membrana del insecto (Thamthiankul y col., 2001; Barboza y col., 2003), los genes *nprA* para proteasa neutral A. La ausencia de ésta última proteína Bt incrementa la producción de las proteínas Cry1Bb y Cry3Bb (Donovan y Slaney, 1997).

Otros genes codifican para factores de virulencia (Agaisse y col., 1999), por ejemplo los genes *inhA* e *inhA2* en Bt 407 Cry-B codifican una proteasa extracelular que hidroliza péptidos antibacteriales de *Hyalophora cecropia*, el gen *aiiA* codifica una enzima degradadora de la N-acyl homoserina lactona capaz de controlar microorganismos patógenos de plantas, además los genes de zwittermicina A, principalmente *zmaR* codifica productos con actividad antifúngica (Dalhammar y Steiner, 1984; Lee y col., 2002; Nair et al., 2004).

Se han detectado también bacteriocinas sintetizadas por diferentes cepas de *B. thuringiensis* (Cherif y col., 2008; Chehimi y col., 2007; Barboza-Corona y col., 2007;

Gray y col., 2006; Kamoun y col., 2005; Cherif y col., 2003; Ahern y colab., 2003; Cherif y col., 2001; Paik y col., 1997; Favret y Yousten, 1989) con actividad antimicrobiana contra otras cepas de Bt, cepas patógenas y hongos fitopatógenos (De la Fuente-Salcido y col., 2008).

6.3.4 Los plásmidos de Bt

Podemos encontrar de 2 a 12 plásmidos cuyos tamaños varían entre 2 a más de 200 kilobases (kb) (1.5 a 150 mDa) según la cepa de Bt (Jarret, 1983). Los plásmidos de gran tamaño (>40 kb) contienen los genes *cry*, y puede haber una o varias copias de un mismo gen de δ -endotoxina en cada plásmido (Bravo y Cerón, 2004; Sanchis et al., 1988). Los plásmidos de Bt son conjugativos no solo intraespecie sino también interespecie. Estos se replican y mantienen por generaciones con una gran eficacia lo que sugiere que estos replicones pueden presentar una ventaja evolutiva y que por consiguiente justifican su papel dentro del mecanismo de replicación de la bacteria (Bravo y Cerón, 2004). Se ha secuenciado en su totalidad el plásmido pBtoxis codificante para toxinas de *Bt* subsp. *israelensis* (Berry y col., 2002). En este plásmido las secuencias pBt025 y pBt026 codifican 2 fragmentos con homologías a la región central de la toxina Cry28Aa, además pBt053 presenta homología en el extremo C-terminal de Cry26Aa. La secuencia de aminoácidos codificada por pBt055 es similar al C-terminal para proteínas codificadas corriente arriba de los genes de toxinas. Lo anterior sugiere que en el proceso evolutivo de pBtoxis sus ancestros fueron hospederos de otras toxinas ahora perdidas. Esto, además de similitudes con transposones y secuencias de inserción, sugiere que la composición de la toxina es un factor dinámico y puede explicar la gran diversidad en la estructura de las toxinas observada en los aislamientos de Bt. Este plásmido contiene un conjunto de genes pBt136-140 involucrados en la síntesis y exportación de péptidos antibióticos como bacteriocinas.

Transcritos en forma divergente a estos genes están pBt133 a pBt130, que codifican los componentes de un sistema transportador ABC: una proteína de unión al soluto exportado (pBt133), una proteína de unión al ATP (pBt132), una permeasa (pBt131) y una proteína integral de membrana (pBt130). Los primeros 3 componentes (pBt133-131) presentan

similitud con genes bac de *E. faecalis* necesarios para la expresión del péptido antibiótico bacteriocina 21 (Tomita y col., 1996).

Actualmente el Centro Nacional para Información en Biotecnología (NCBI:

serovar *konkukian* serotipo H34 cepa 97-27 y

pBMBt1, pGI3, pBMB9741, pTX14-3, pUIBI-1 y pBMB2062.

6.3.5 Genes *cry* en México

La distribución de los genes *cry* en México se determinó en un estudio realizado por Bravo y col., en 1998 donde se aislaron cepas mexicanas de Bt de 503 suelos de las cinco macroregiones y se identificaron los genes *cry* través de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). De acuerdo a sus resultados estos genes se distribuyen de la siguiente manera: las genes *cry1*, *cry 3* se encontraban distribuidos en un 49 y 22%, respectivamente; mientras que los *cry11* y *cyt* en un 8%. Las cepas con genes *cry7*, *cry8*, y *cry9* se encontraban en un número reducido y solo representaron el 7% del total. El 14 % de las cepas no dieron ningún producto de PCR a pesar de que producían cristales proteicos, por lo que estas cepas son candidatas para portar genes *cry* nuevos y con la potencial insecticida.

6.3.6 Bacteriocinas de *B. thuringiensis* (Bt-BLIS)

Como se mencionó anteriormente Bt es capaz de producir factores de virulencia como las bacteriocinas o Bt-BLIS que muestran actividad antimicrobiana contra otras cepas de *Bacillus*, cepas patógenas y hongos fitopatógenos, sin embargo, son relativamente pocas las reportadas hasta la fecha.

La mayoría de estas bacteriocinas son producidas por cepas aisladas de suelos y alimentos, como la Thuricina (950 Da) (Favret y Younsten 1989), la tochicina (10.5 kDa) (Paik y col., 1997), la Thuricina 7 (11.6 kDa) (Cherif y col., 2001), la Thuricina 439A y thuricin 439B (2.9 y 2.8 kDa, respectivamente) (Ahern y col., 2003), la Entomocina 9 (Cherif et al. 2003), la Bacthuricina F4 (3160 Da) (Kamoun et al. 2005), la Thuricina 17 (3162 Da) que peculiarmente se aisló de tejidos de raíz de frijol de soya y se considera una cepa promotora del crecimiento en plantas (Gray et al. 2006*b*), la Thuricina S (3137.61 Da) (Chehimi y col., 2007), las bacteriocinas Morricina 269, Kustacina 287, Kenyacina 404, Entomocina 420 y Tolworthcina 524 que se sintetizan por cepas aisladas de polvos de sorgo, frijol arroz y telaraña (Barboza y col., 2007), y la entomocina 110 (Cherif y col., 2008).

La tabla III muestra las Bt-BLIS que a la fecha se encuentran referenciadas en revistas de investigación, las diversas cepas de *B. thuringiensis* que las producen, su peso molecular y las bacterias que inhiben con su espectro de actividad.

Tabla III

Características de Bacteriocinas sintetizadas por diversas cepas de *Bacillus thuringiensis*

BACTERIOCINA	MASA MOLECULAR	BACTERIAS SENSIBLES	REFERENCIA
Entomocina 110	4.8 kDa	Diversas especies de <i>Bacillus</i> , <i>Listeria monocytogenes</i> , <i>Paenibacillus larvae</i> .	Cherif y col., 2008
Thuricina S	3.137 kDa	<i>Listeria monocytogenes</i> , <i>B. cereus</i> , <i>B. thuringiensis</i> , <i>B. subtilis</i> , <i>B. megaterium</i> , <i>Pediococcus acidolactici</i> , <i>Streptococcus thermophilus</i> , <i>Enterococcus cloacae</i> .	Chehimi y col., 2007
Morricina 269 Kurstacina 287 Kenyacina 404 Entomocina 420 Tolworthcina 524	~10.0 kDa	Diversas especies de <i>B. thuringiensis</i> , <i>B. cereus</i> , <i>Listeria innocua</i> , <i>Vibrio cholerae</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>S. xylosus</i> , <i>Shigella flexneri</i> , <i>Salmonella sp.</i> , <i>Str. pyogenes</i> , <i>E. coli</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Proteus vulgaris</i> , <i>Enterobacter cloacae</i> , <i>Enterococcus faecium</i> , <i>Rizophus sp.</i> , <i>Fusarium oxysporum</i> , <i>Mucor rouxii</i> IM80, <i>Trichoderma sp. SH1</i> , <i>Trichoderma sp. SD3</i> .	Barboza-Corona y col., 2007
Thuricina 17	3.172 kDa	Diversas especies de <i>Bacillus thuringiensis</i> , <i>B. cereus</i> , <i>E. coli</i> MM294.	Gray y col., 2006
Bacthuricina F4	3.160 kDa	Diversas especies de <i>Bacillus</i>	Kamoun y col., 2005
Entomocina 9	12.4 kDa	<i>B. thuringiensis</i> , <i>L. monocytogenes</i> , <i>Pseudomona aeurogenosa</i>	Cherif y col., 2003
Thuricina 439	~3.0 kDa	<i>B. thuringiensis</i> , <i>B. cereus</i> , <i>L. innocua 4202</i>	Ahern y col., 2003
Thuricina 7	11.6 kDa	<i>B. thuringiensis</i> , <i>B. cereus</i> , <i>B. micoides</i> , <i>Str. pyogenes</i> , <i>L.monocytogenes</i> , <i>B. weihenstephanensis</i> .	Cherif y col., 2001
Tochicina	10.5 kDa	Diversas especies de <i>B. thuringiensis</i> y <i>B. cereus</i> , <i>Leuconostoc mesenteroides</i> .	Paik y col., 1997
Thuricina	950,0 Da**	Diversas especies de <i>Bacillus</i> .	Favret y Younsten, 1989

**Forma polimérica

Como podemos observar, las Bt-BLIS presentan una masa molecular muy diversa en un rango desde ~3.0 kDa hasta 12.4 kDa determinado en su mayoría por electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (PAGE) (Laemmli, 1970). Otro método utilizado para determinar la masa molecular de las bacteriocinas de Bt es la espectroscopia de masas a través de la ionización suave con matriz asistida por láser de desorción/ionización (MALDI). Con esta técnica se ha determinado la masa molecular de la Thuricina 439, Thuricina S, Bacthuricina F4 y Thuricina 17 (Chehimi y col., 2007). En la tabla IV registramos las propiedades de las bacteriocinas sintetizadas por cepas de *B. thuringiensis*.

Tabla IV

Propiedades de Bacteriocinas sintetizadas por diversas cepas de *Bacillus thuringiensis*

BACTERIOCINA	RANGO pH	RANGO TEMPERATURA °C	SENSIBILIDAD A ENZIMAS	EFEECTO DE SOLVENTES	DETERMINANTES GENETICOS	SECUENCIA N-TERMINAL	REFERENCIA
Entomocina 110	pH 3-9	Termoestable 121 °C	Proteinasa K Papaina Tripsina	Acetona Etanol Butanol Tolueno Metanol	Cromosoma	ND	Cherif y col., 2008
Thuricina S	pH 3-10.5	Termoestable	Proteinasa K Papaina Tripsina Pepsina	ND	ND	ND	Chehimi y col., 2007
Morricina 269 Kurstacina 287 Kenyacina 404 Entomocina 420 Tolworthcina 524	Grupo A pH 5-9 Grupo B pH 5-11	Termotolerante 80°C Termorresistente 121 °C	Proteinasa K Tripsina Pepsina Lisozima Rnasa α -amilasa Proteinasa K Tripsina Pepsina Lisozima Rnasa α -amilasa	ND	ND	ND	Barboza-Corona y col., 2007
Thuricina 17	pH 1-9.25	Termorresistente 100°C	Proteinasa K Proteasa α -amilasa catalasa	ND	ND	DWTXWSXL	Gray y col., 2006
Bacthuricina F4	pH 3-7	Termoestable 70°C	Proteinasa K	ND	ND	DWTXWSXL	Kamoun y col., 2005
Entomocina 9	pH 3-9	Termoestable 85-95°C	Proteinasa K Cerolisina A Cerolisina B Fosfolipasa C Haemolisina III Citotoxina K Proteasa neutra Proteína choque termico 16rDNA Zwittermicina A	ND	ND	ND	Cherif y col., 2003
Thuricina 439	pH 2-9	Termoestable 80°C	Proteinasa K Pronasa E Catalasa	ND	ND	GWVAXVGAXGTV VLASGGVV	Ahern y col., 2003
Thuricina 7	pH 3-9	Termoestable 90-98°C	Proteinasa K Pepsina Papaina Treipsina Quimiotripsina Lisozima Catalasa Dnasa Rnasa	ND	ND	ND	Cherif y col., 2001
Tochicina	pH 3-9	Termoestable 90°C	Proteinasa K Tripsina Quimiotripsina α -amilasa Lipasa II Lipasa VII Dnasa Rnasa Lisozima Catalasa	ND	ND	ND	Paik y col., 1997
Thuricina	NR	96°C	Quimiotripsina Pronasa Subtilisina Tripsina Quimiotripsina Peptidasa Papaina Fosfolipasa C Lisozima	Etanol Cloroformo	Plásmido 150 mDa	ND	Favret y Younsten, 1989

ND: No determinado; NR: No reportado

En la tabla IV encontramos los valores de pH y temperatura determinados para las Bt-BLIS reportadas, observándose que tienen actividad a rangos amplios en los dos parámetros, ubicándolas como moléculas con un gran potencial para su aplicación en alimentos y como bioterapéuticos. También se ha establecido el efecto a las proteasas sobre la actividad antimicrobiana.

Hasta el momento no se ha reportado la clonación de ningún gen que codifique una bacteriocina de Bt y solamente se ha descrito la ubicación de los probables genes que las codifican para la Thuricina y la Entomocina 110, siendo en un megaplásmido y en el cromosoma, respectivamente (Battisti y col., 1985; Cheriff y col. 2008).

Por otro lado, se ha reportado la secuencias N-terminal de la Thuricina 439, Bacthuricina F4 y Thuricina 17 (Tabla IV), sin embargo podríamos decir que realmente son dos, pues existe similitud entre las secuencias de la Bacthuricina F4 y la Thuricina 17. En la thuricina 439 fue determinado un peso aproximado de 3 kDa a través de SDS-PAGE, sin embargo, después de la elución de la columna de HPLC se obtuvieron dos fracciones activas que se sometieron a espectroscopía de masa, determinando dos péptidos denominados Thuricina 439A y Thuricina 439B que presentan diferente masa molecular (2.9199 y 2.8038 kDa respectivamente) pero con la misma secuencia N-terminal de 20 amino ácidos: GWVAXVGAXGTVVLASGGVV, en la cuál X corresponde a un amino ácido no determinado concluyentemente que podría ser cisteína. Lo anterior se puede explicar si el mismo gen codifica para un solo producto peptídico que sufre una o más modificaciones post-transduccionales produciendo dos péptidos activos. La fracción purificada por HPLC de la Bacthuricina F4 fué sometida a espectroscopía de masas revelando una masa molecular de 3.16005 kDa. Esta fracción fué sometida al análisis de secuencia de amino ácidos y secuencia N-terminal exhibiendo una secuencia de solamente 22 amino ácidos y con una secuencia clara de ocho amino ácidos: DWTXWSXL donde X representa un residuo no especificado. Esta misma secuencia se obtuvo en la Thuricina 17, bacteriocina purificada por HPLC en la cuál inicialmente se reportó una masa molecular de 3.061 kDa (Gray y col., 2006) y con un análisis espectroscopía de masas asistida por ionización (MALDI-MS/MS) se estableció un nuevo valor de 3.162 kDa para su masa

molecular, no muy diferente al inicial. Posteriormente, el análisis proteómico revela una secuencia N-terminal DWTXWSXL homóloga a la secuencia reportada para la Bacthuricina F4, siendo la primera vez que se reporta que dos bacteriocinas producidas por cepas diferentes de *B. thuringiensis* comparten una misma identidad en la secuencia N-terminal. Por otro lado, realizando una comparación de secuencias de amino ácidos de las Bt-BLIS mencionadas podríamos decir que son simialres, sin embargo, la Thuricina 17 contiene cuatro histidinas no encontradas en Bacthuricina F4, además la estabilidad a pH, temperatura y espectro de inhibición son diferentes. En conclusión estas dos Bt-BLIS son similares pero no son la misma y por otro lado, la misma secuencia N-terminal de estas dos bacteriocinas sugiere la existencia de otras bacteriocinas con esta característica.

Teniendo claras todas las características fisicoquímicas de una bacteriocina, la caracterización genética es indispensable para su óptima producción y posterior aplicación comercial, además identificar el gen codificante permite establecer las condiciones necesarias para la aplicación efectiva del producto final (Elegado y col., 2005).

6.3.6.1 Síntesis y producción de Bt-BLIS

En general las cepas bacteriocinogénicas de *B. thuringiensis* se reproducen fácilmente en medios líquidos superficiales donde predomina la utilización de caldo de soya tripticasa y en casos muy particulares se utilizan medios especiales como el medio King's B para la producción de la Thuricina 17, puesto que esta bacteria se encuentra registrada como promotora de crecimiento. Las condiciones de medio ambiente varían moderadamente en la producción de cada Bt-BLIS, en cuanto a temperaturas de incubación se ubican en un rango de 28 a 37 °C, además se considera de manera importante el suministro de oxígeno requerido en un alto nivel especialmente durante la fase de crecimiento exponencial y se logra por agitación en un rango de 150 a 200 rpm, mateniendo un rango de pH entre 6.8 y 7.2 por períodos de tiempo desde 24 hasta 48-50 y en el caso de la cepa *B. thuringiensis* NEB 17 hasta 96 horas después de iniciado el cultivo; durante la de incubación se toman alícuotas del medio de cultivo a diferentes intervalos de tiempo para monitorear el crecimiento espectrofotométricamente y determinar la síntesis y actividad de la bacteriocina (Gray y col., 2006).

En algunos casos de producción de bacteriocinas como la Thuricina se han ensayado diversos medios de cultivo complejos como caldo de infusión cerebro corazón, caldo de peptonado, caldo de caseína y caldo de tripticasa y además, se variaron las condiciones de pH, temperatura y aereación pero sin éxito en el incremento de la producción de la bacteriocina (Favret y Younsten 1988). También probaron el caldo de soya tripticasa modificado adicionado con 4% de triptona, 1% de soya y mezcla de sales minerales, observando un incremento del doble en la actividad, detectando los primeros niveles a las 6 horas de crecimiento y alcanzando su máximo a las 10 horas de producción.

La caracterización de las bacteriocinas sintetizadas por aislados naturales o cepas productoras no es sencilla porque su óptima producción depende de diferentes estímulos incluyendo la presencia de bacterias blanco o susceptibles, composición química de medios de cultivo y condiciones físicas (temperatura, estrés óxico y anóxico, pH) (Biswas y col., 1991; Yang y Ray 1994; Diep y col., 2000; Maldonado, 2004; Barboza-Corona y col., 2007). Por lo anterior, los reportes sobre la producción de bacteriocinas de *B. thuringiensis* es escasa y existe limitada la información sobre su espectro de actividad y propiedades biofísicas (Favret y Younsten 1989; Paik y col., 1997; Cherif y col., 2001, 2003; Ahern y col., 2003; Kamoun y col., 2005; Gray y col., 2006a, b; Barboza-Corona y col., 2007; de la Fuente-Salcido y col., 2008; Chehimi y col., 2007; Cherif y col., 2008).

De acuerdo a la información anterior, las bacteriocinas sintetizadas en la fase estacionaria pueden ser productos de su metabolismo secundario (Demain, 1998) iniciando su producción en la fase de crecimiento exponencial y continuando en la fase estacionaria, lo que indica que podrían ser considerados metabolitos secundarios. Lo anterior puede ser el caso de las Bt-BLIS Thuricina 7, Thuricina 439, Morricina 269, kursticina 287 y Entomocina 110, mismas que difieren en la producción característica de las demás Bt-BLIS que se producen durante la fase de crecimiento exponencial y su síntesis decae en el inicio de la fase estacionaria: la Thuricina, Bacthuricina F4, Thuricina 17, Kenyacina 404, Entomocina 420, Tolworthicina 524 y Thuricina S. La fase de producción de las bacteriocinas sintetizadas por diversas cepas de *B. thuringiensis* así como el efecto inhibitorio que ejercen sobre las cepas susceptibles se pueden observar en la Tabla V.

Tabla V**Producción de bacteriocinas sintetizadas por diversas cepas de *Bacillus thuringiensis***

BACTERIOCINA	INICIO DE PRODUCCION DE BACTERIOCINA	MAYOR PRODUCCION DE BACTERIOCINA	EFECTO INHIBITORIO	REFERENCIA
Entomocina 110	Mitad de fase Log	Fase estacionaria	Bactericida Bacteriolítico	Cherif y col., 2008
Thuricina S	Mitad de fase Log	Inicio fase estacionaria	Bactericida	Chehimi y col., 2007
Morricina 269 Kurstacina 287 Kenyacina 404 Entomocina 420 Tolworthcina 524	Grupo A Inicio de fase estacionaria Grupo B Mitad de fase Log	Final fase estacionaria Inicio fase estacionaria	No determinado	Barboza-Corona y col., 2007
Thuricina 17			Bactericida Bacteriostático	Gray y col., 2006
Bacthuricina F4	Final de fase Log	Inicio fase estacionaria	Bactericida	Kamoun y col., 2005
Entomocina 9	Mitad de fase Log	Inicio fase estacionaria	Bactericida	Cherif y col., 2003
Thuricina 439	Final de fase Log	Fase estacionaria	Bactericida	Ahern y col., 2003
Thuricina 7	Fase Log	Final fase Log	Bactericida Bacteriolítico	Cherif y col., 2001
Tochicina	Mitad de fase Log	Inicio fase estacionaria	Bactericida	Paik y col., 1997
Thuricina	Inicio de fase Log	Inicio fase estacionaria	Bactericida Bacteriolítico	Favret y Younsten, 1989

6.3.6.2 Modo de acción de Bt-BLIS

El modo de acción de una sustancia inhibitoria frente a una célula sensible puede ser bacteriolítico, bacteriostático o bactericida. El primero implica la muerte celular seguida de lisis con la concomitante disminución de la densidad óptica. La acción bactericida produce también la muerte celular que se manifiesta en la disminución en el recuento de colonias pero sin lisis y por consiguiente la densidad óptica se mantiene constante. En el modo de

acción bacteriostático no se produce la muerte celular pero se detiene el crecimiento, por lo cuál el recuento de colonias y la densidad óptica se mantienen constantes. Teóricamente los efectos son muy distintos, sin embargo en la práctica una población de bacterias sin capacidad de reproducción o con capacidad disminuida para la misma es una población destinada a desaparecer, de hecho los agentes antimicrobianos tan importantes como los antibióticos basan su poder en una acción bacteriostática.

El modo de acción en la mayoría de las Bt-BLIS se ha determinado como bactericida (Tabla V) causando la muerte en las cepas indicadoras o sensibles sin llegar a la lisis, pero también produciendo efecto bacteriolítico causando muerte y lisis celular. En el caso de la Thuricina el modo de acción es bactericida y bacteriolítico. Cuando la thuricina se agrega a al cultivo en crecimiento de la cepa sensible MF4 causa su muerte en la primera hora de la fase de latencia y el efecto bactericida es paralelo a la lisis celular conforme indican los registros de la disminución de la absorbencia, además la microscopía de contraste de fases de las células dañadas confirman la lisis celular, células que han perdido integridad (“ghost”) y células deformes. La microscopía de células tratadas después de 150 minutos revela una superficie celular rasgada y sin capas, con la presencia de múltiples septos. A los 210 minutos de tratamiento con Thuricina muchas células se han lisado y muchas otras perdido su forma característica, mostrando una apariencia redondeada o irregular (Favret y Yousten, 1989).

Para determinar el efecto bactericida de la Toxocina, se probaron dos concentraciones (100 y 200 UA/ml) de la bacteriocina parcialmente purificada adicionándola a las células de la cepa sensible H522 crecida hasta la fase logarítmica y resuspendida en buffer de fosfato 10 mM a pH 7.0, y se verificó la disminución del recuento de las unidades formadoras de colonia por mililitro (ufc/ml) (Paik y col., 1997).

El modo de acción de la Thuricina 7 se determinó añadiéndose diferentes cantidades (20 y 100 UA/ml) que se adicionaron a la cepa sensible *B. thuringiensis* serotipo 10 crecida hasta la mitad de la fase logarítmica en caldo de soya tripticasa, se incubó a 30°C y se monitoreó a diferentes intervalos de tiempo la densidad óptica a 600 nm y por cuenta viable en agar. Se confirmó el modo de acción bactericida de la Thuricina 7 por la disminución de

células sobrevivientes (ufc/ml) de la cepa sensible, y se verificó además un efecto bacteriolítico cuando la bacteriocina se agrega en cantidades más altas (100 UA/ml) y se observa la disminución de la densidad óptica (Cherif y col., 2001).

La Thuricina 439 parcialmente purificada en cantidades variables (640 UA/ml) se añadió a cuatro cultivos de la cepa sensible *B. cereus* 6AI crecida exponencialmente hasta una densidad óptica (OD_{600nm}) de 0.25, se monitoreo la absorbencia y la cantidad de células viables. La evaluación de la adición de cantidades ascendentes de la Thuricina 439 sobre el crecimiento y viabilidad de la cepa indicadora muestran un efecto bactericida, confirmándose con la disminución de hasta 100 veces en la cuenta viable y obviamente la lisis celular (Ahern y col., 2003).

Para precisar el modo de acción de la Entomocina 9 se creció la cepa sensible *B. thuringiensis* ssp. *darmstadiensis* Bt 10 hasta la mitad de la fase logarítmica y se agregó 100 UA/ml de la bacteriocina y a diferentes intervalos de tiempo se determinó la densidad óptica (OD_{600nm}) y la cuenta viable (ufc/ml). Los resultados mostraron un decremento en el número de células viables a las tres horas y una disminución de la OD a las 4 horas, mostrando un modo de acción bactericida confirmado por la disminución de células sobrevivientes o viables de la cepa indicadora, además la disminución de la OD demuestra un efecto bacteriolítico (Cherif y col., 2003). Comparando estos resultados con los efectos de la Thuricina y tochicina son similares en modo de acción, pues solo la Thuricina 7 causa lisis celular, y este comportamiento es muy semejante al observado en las bacteriocinas de las BAL.

En el caso de la Bacthuricina F4 se realizó la determinación del modo de acción utilizando un cultivo de la cepa sensible *B. cereus* crecido hasta la fase logarítmica del cuál se obtuvieron 10^6 células para resuspenderlas en buffer de fosfatos 10 mM a pH 7.0. La Bacthuricina F4 (400 UA) se agregó en el cultivo de *B. cereus*, se incubó a 37°C y se determinó a diferentes tiempos la cuenta de células viables por placa vertida, realizando el recuento de las ufc después de incubar a 30°C durante toda la noche. Los resultados indicaron una rápida disminución en la viabilidad celular durante el primer minuto, la pérdida de actividad ocurrió lentamente hasta los 180 minutos y una total inhibición del *B.*

cereus a los 200 minutos de incubación causada por la Bacthuricina F4. Lo anterior confirmó un modo de acción bactericida para la Bacthuricina F4, activa contra especies de *Bacillus*, contra otros Gram positivos y menos activa contra Gram negativos (Kamound y col., 2005).

La Thuricina 17 mostró un modo de acción bactericida y bacteriostático demostrado por la misma metodología utilizada para la thuricina 439 (Ahern y col., 2003). Se utilizaron las cepas *B. thuringiensis* ssp *thuringiensis* Bt1627 y *B. cereus* ATCC 45679 se sembraron en medio King's hasta una OD_{600nm} de 0.35-0.40 y se diluyeron con medio fresco hasta una OD_{600nm} de 0.27-0.30 y se le añadió volúmenes de 0, 100, 300 y 600 µl de bacteriocina parcialmente purificada. La cepa productora *B. thuringiensis* NBEB 17 se trató en las mismas condiciones como control negativo. Se determinó la densidad celular espectrofotométricamente y el recuento de unidades formadoras de colonia viables. Al inicio de la exposición a la Thuricina 17 en ambas cepas *B. thuringiensis* ssp *thuringiensis* Bt1627 y *B. cereus* ATCC 14579 la densidad óptica descendió continuamente y ocurrió la lisis celular. Se observó un efecto estático en *B. cereus* mientras que *B. thuringiensis* ssp *thuringiensis* Bt1627 fue capaz de recuperarse al final del crecimiento. Lo anterior sugiere que la cepa *B. thuringiensis* ssp *thuringiensis* Bt1627 posee un mecanismo que le permite degradar la bacteriocina o modificó su expresión genética para proseguir su crecimiento (Gray y col., 2006).

Se determinó la concentración mínima inhibitoria (CMI) y la concentración mínima bactericida (CMB) en la Thuricina S purificada para establecer su modo de acción sobre la cepa sensible *B. thuringiensis* subsp. *darmastadiensis* 10T. La CMI se determinó utilizando el método estándar de macrodilución en caldo (Sahm y Washington, 1991) y para la CMB se subcultivaron tubos con crecimiento no visible en caldo de soya tripticasa en placas de agar de soya tripticasa y se incubaron a 30°C por 24 horas, definiendo la CMB como la concentración más baja que no muestra crecimiento en agar de soya tripticasa. La CMB de la Thuricina S sobre *B. thuringiensis* subsp *darmastadiensis* 10T fueron de 1.43 y 2.86 µmol/litro respectivamente, resultados que permitieron concluir que esta bacteriocina muestra un elevado efecto bactericida (Chehimi y col., 2007).

La Entomocina 110 presentó un modo de acción bactericida y bacteriostático. Esto se demostró creciendo la cepa indicadora *B. thuringiensis* subsp *kurstaki* HD1 en caldo de soya tripticasa a 30°C hasta la fase de crecimiento exponencial (6 horas) y se adicionó 200 UA de la bacteriocina parcialmente purificada, monitoreando a diferentes tiempos la OD_{600nm} y la cuenta de células viables en agar de soya tripticasa. Después de una hora de incubación se registró una disminución del número de células viables (ufc/ml) y en la densidad óptica, sugiriendo que la Entomocina 110 tiene un modo de acción bactericida y bacteriolítico. Esto indica que la bacteriocina induce la autólisis de las cepas sensibles produciendo una degradación masiva de la pared celular y lisis celular. Esta acción se ha reportado previamente para bacteriocinas de la clase I como la Nisina y Pep5 (Bierbaum y Sahl, 1985; Bierbaum y Sahl, 1987). Un rasgo interesante en Thuricina 110 es la actividad mostrada contra *Paenibacillus larvae*, agente causal de la más seria y fatal enfermedad bacteriana de larvas de abeja productoras de miel a nivel mundial (Neuendorf y col., 2004), lo que puede representar una nueva herramienta de terapia antimicrobiana para la urgente solución del problema de resistencia que ha adquirido *P. larvae* contra casi todos los antibióticos conocidos. La actividad antimicrobiana determinada en la Entomocina 110 le confiere a *B. thuringiensis* serovar *thuringiensis* HD2 una interesante y potencial aplicación para mejorar el biocontrol de bacterias y/o insectos acoplándose a otros factores antagonísticos como compuestos antifúngicos o delta endotoxinas (Cherif y col., 2008).

6.3.6.3 Determinación de la actividad de Bt-BLIS

La detección de bacteriocinas y la actividad antibacteriana en *B. thuringiensis* involucra el uso de una gran variedad de métodos utilizados rutinariamente para determinar la actividad de bacteriocinas de las BAL y otras sustancias inhibidoras (Kekessy y Piguet 1970; Tagg y McGiven 1971; Toba y col., 1991; Kawai y col., 1997). Como podemos observar en la Tabla VI, para el ensayo de la actividad antibacteriana y la determinación de la actividad de las Bt-BLIS predomina la aplicación práctica de los métodos del agar de Kekessy y Piguet (1970) o método de la sobrecapa y el método de difusión en pozos. El método de la sobrecapa es conocido con este nombre porque las cepas a ensayar se inoculan en placas de agar y se dejan creciendo toda la noche con una sobre capa de agar

inoculado con la cepa indicadora. Este método se utilizó en los ensayos de la actividad antibacteriana de la Thuricina S, la Morricina 269, la Kurstacina 287, la Kenyacina 404, la Entomocina 420, la Tolworthcina 524 y Thuricina, verificando la producción de las bacteriocinas por la formación de halos de inhibición circundantes a las colonias de la cepa ensayada. También se utilizó el método de difusión en pozos (Jack y col., 1995) que se considera una modificación al método de la sobrecapa y se realiza depositando alícuotas del sobrenadante de los cultivos a ensayar en pozos del agar inoculado con la cepa indicadora. El desarrollo de halos de inhibición después de incubar indica la producción de actividad inhibitoria de las cepas probadas o sus sobrenadantes. Con este método también se detectó la actividad antibacteriana de la Entomocina 110.

Otro método aplicado con el mismo propósito fue el de difusión con discos en agar en el cuál una suspensión de la bacteria en estudio se inocular en la superficie de una placa de agar Mueller-Hinton y posteriormente se colocan sobre la superficie del agar discos de papel de filtro impregnados con cantidades estandarizadas de la bacteriocina. Después de la incubación se mide el diámetro de la zona de inhibición alrededor de los discos. Este método se utilizó en el ensayo de la actividad antibacteriana de la Thuricina 17 (Kimura y col., 1998) aplicando 15 μ l de la bacteriocina parcialmente purificada en discos estériles de 6 mm y dejándolos secar antes de depositarlos en placas de agar para posteriormente incubarlas a 27°C por 48 horas, tiempo suficiente para medir los halos de inhibición producidos (Gray y col., 2006).

Para la determinación de la actividad antibacteriana de la mayoría de las Bt-BLIs se utiliza también el método de difusión en pozos como es en el caso de la Entomocina 110, la Morricina 269, la Kurstacina 287, la Kenyacina 404, la Entomocina 420, la Tolworthcina 524, Bacthuricina F4, Entomocina 9, y se han efectuado modificaciones en la técnica de difusión en pozos (Paik y Glatz, 1995) para determinar la actividad de la Tochicina. También se ha utilizado el método de la sobre capa para la Thuricina y el método de sobre capa modificado (Mayr-Harting y col., 1972) en la cuál se inoculan y dejan crecer las bacterias indicadoras en placas de agar y se agrega una sobrecapa con el sobrenadante libre de células que contiene la bacteriocina, en este caso la Thuricina 17. Particularmente

para la Thuricina 439 se ha empleado el método de antagonismo diferido (Ahern y col., 2003) calculando la actividad específica como el recíproco de la más alta dilución de la muestra que contiene la bacteriocina y que proporciona inhibición claramente visible con las cepas indicadoras (*L. innocua* 4202 o *B. cereus* 6 A1).

Sin embargo pese a la diversidad de los métodos reportados, en su mayoría son dependientes del tiempo de incubación requerido para el desarrollo de los cultivos productores de bacteriocinas y/o los cultivos indicadores, y no se contaba con un método para una cuantificación inmediata y a la vez eficaz para la determinación de la actividad.

Tabla VI

Actividad de bacteriocinas producidas por cepas de *Bacillus thuringiensis*

BACTERIOCINA	CEPA PRODUCTORA	CEPA INDICADORA	ENSAYO DE ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA	DETERMINACION DE ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA	REFERENCIA
Entomocina 110	<i>B. thuringiensis</i> serovar <i>thuringiensis</i> HD 2	<i>B. thuringiensis</i> subsp <i>kurstaki</i> HD 1	Método difusión en pozos Jack y col., 1995	Método difusión en pozos Jack y col., 1995	Cherif y col., 2008
Thuricina S	<i>B. thuringiensis</i> subsp <i>entomocidus</i> HD 198	<i>B. thuringiensis</i> subsp <i>darmastadiensis</i> 10T	Método de la sobrecapa Cherif y col. 2001	Método Difusión en pozos Jack y col., 1995	Chehimi y col., 2007
Morricina 269 Kurstacina 287	Grupo A <i>B. thuringiensis</i> subsp. <i>morrisoni</i> LBIT 269 <i>B. thuringiensis</i> subsp. <i>kurstaki</i> LBIT 287	<i>B. cereus</i> 183	Método de la sobrecapa Calderón y col., 2001	Método difusión en pozos Roger y Montville, 1991	Barboza-Corona y col., 2007
Kenyacina 404 Entomocina 420	Grupo B <i>B. thuringiensis</i> subsp. <i>kenyae</i> LBIT 404				
Tolworthicina 524	<i>B. thuringiensis</i> subsp. <i>Entomocidus</i> LBIT 420 <i>B. thuringiensis</i> subsp <i>tolworthi</i> LBIT 524				
Thuricina 17	<i>B. thuringiensis</i> NBEB 17*	<i>B. cereus</i> ATCC 14579	Método de difusión con discos en agar Kimura y col., 1998	Método de la sobrecapa modificado Mayr-Harting y col., 1972	Gray y col., 2006
Bacthuricina F4	<i>B. thuringiensis</i> subsp <i>kurstaki</i> BUPM4	<i>B. cereus</i>	-	Método difusión en pozos Jack y col., 1995	Kamoun y col., 2005
Entomocina 9	<i>B. thuringiensis</i> ssp <i>entomocidus</i> HD9	<i>B. thuringiensis</i> subsp <i>darmastadiensis</i> Bt10	Método de la sobrecapa Cherif y col., 2001	Método difusión en pozos Jack y col., 1995	Cherif y col., 2003
Thuricina 439	<i>B. thuringiensis</i> B 439	<i>Listeria innocua</i> 4202 <i>B. cereus</i> 6A1	-	Método de antagonismo diferido Ahern y col., 2003	Ahern y col., 2003
Thuricina 7	<i>B. thuringiensis</i> BMG 1.7	<i>B. thuringiensis</i> subsp <i>darmastadiensis</i> serotipo 10	Método de la sobrecapa Paik y col., 1997	Método difusión en pozos Jack y col., 995	Cherif y col., 2001
Tochicina	<i>B. thuringiensis</i> subsp <i>tochigiensis</i> HD868	<i>B. thuringiensis</i> subsp <i>tompsoni</i> HD 522	Método de la sobrecapa Paik y col., 1997	Método difusión en pozos modificado Paik y Glatz, 1995	Paik y col., 1997
Thuricina	<i>B. thuringiensis</i> serovar <i>thuringiensis</i> HD2	<i>B. thuringiensis</i> serovar <i>canadiensis</i> MF4	Método de la sobrecapa Kekessy y Piquet, 1970	Método de la sobrecapa Mayr-Harting y col., 1972	Favret y Younsten, 1989

6.3.6.4 Purificación de de Bt-BLIS

Las bacteriocinas pueden tener aplicaciones diversas una vez que han sido purificadas o parcialmente purificadas, y como sabemos existe una gran diversidad de bacteriocinas de naturaleza heterogénea y no existe un patrón específico para su purificación. Con respecto a las Bt-BLIS sucede lo mismo y para purificarlas no existe reporte de algún protocolo general (ver Tabla VII). No obstante se consideran algunas etapas generales como plataforma para su purificación parcial o total.

Tabla VII

Etapas para la purificación de bacteriocinas de *B. thuringiensis*

ETAPAS	I	II	III	IV	V	VI	REFERENCIA
BACTERIOCINA							
Entomocina 110	Precipitación (NH ₄) ₂ SO ₄ 80%	Centrifugación	Resuspensión Tris-HCl pH 7.5	Diálisis Tris HCl pH 7.5	Extracción Butanol		Cherif y col., 2008
Thuricina S	Filtración Membrana 0.22 µm	Cartucho Sep-Pak C ₁₈	Elución Etanol/H ₂ O	HPLC* Columna simetría analítica C ₁₈	Elución Gradiente AcN/ATF		Chehimi y col., 2007
Morricina 269 Kurstacina 287 Kenyacina 404 Entomocina 420 Tolworthcina 524	Precipitación (NH ₄) ₂ SO ₄ 80%	Centrifugación	Resuspensión Buffer de fosfatos 100mM pH 7.0	Diálisis Buffer de fosfatos 100mM pH 7.0			Barboza-Corona y col., 2007
Thuricina 17	Partición en fases butanol	Evaporación rotavapor	Resuspension AcN/H ₂ O (v/v)	Centrifugación	HPLC* Columna Vydac C ₁₈ de fase reversa	Elución AcN 18%	Gray y col., 2006
Bacthuricina F4	Precipitación fraccionada (NH ₄) ₂ SO ₄	Centrifugación	Diálisis Buffer de fosfatos 10mM pH 7.0	Filtración Membrana 0.45µm	HPLC* Columna µ-Bondapack C ₁₈	Elución ATF-H ₂ O/AcN Dialisis	Kamoun y col., 2005
Entomocina 9	Precipitación (NH ₄) ₂ SO ₄ 80%	Centrifugación	Diálisis Buffer salino-fosfato pH 6.8	Filtración en gel Columna sefacyrl S-200	Elución Acetato de sodio 25mM pH 5.0	Cromatografía de intercambio iónico DEAE Sefarosa Elución Tris-HCl 50mM pH 7.0	Cherif y col., 2003
Thuricina 439	Precipitación (NH ₄) ₂ SO ₄ 80%	Centrifugación	Columna Sp-Sefarosa Columna Octil-sefarosa	Elución Etanol/H ₂ O/ATF	HPLC* Cromatografía líquida de alta resolución fase reversa	Elución Gradiente AcN/H ₂ O	Ahern y col., 2003
Thuricina 7	Precipitación (NH ₄) ₂ SO ₄ 80%	Centrifugación	Resuspensión Tris-HCL pH 7.5	Diálisis Tris-HCL pH 7.5			Cherif y col., 2001
Tochicina	Precipitación (NH ₄) ₂ SO ₄ 75%	Centrifugación	Resuspensión Buffer de fosfatos 10mM pH 7.0	Diálisis Buffer de fosfatos 10mM pH 7.0			Paik y col., 1997
Thuricina	Extracción cloroformo	Diálisis 10% polietilenglicol	Ultrafiltración (Amicon PM 30)	Diálisis Tris-HCl pH 7.2	Columna Ultrogel AcA	Elución Tris HCl pH 7.2	Favret y Yousten, 1989

El primer paso que se requiere para lograr la purificación de las bacteriocinas es su separación y posterior concentración del sobrenadante obtenido por la centrifugación del medio de cultivo en que se creció la cepa productora y asumiendo un proceso optimizado para la producción de bacteriocinas (Svetosla y col., 2004). Algunas bacteriocinas se encuentran en agregados moleculares, induciendo errores en la determinación exacta de su masa molecular y es necesario disgregarlas utilizando alguna etapa de ultra filtración, precipitación con sales de sulfito de amonio o eliminando material lipídico por la

extracción con solventes orgánicos como butanol, metanol-cloroformo o etanol-éter dietílico (Svetoslav y col., 2004).

Una de las etapas básicas más comunes es la precipitación con sulfato de amonio a diferentes porcentajes de saturación que permite la concentración de la mayoría de las Bt-BLIS y se ha utilizado al 75% de saturación para precipitar la thuricina, y al 80 % de saturación en la Thuricina 7, Thuricina 439, Entomocina 9, Bacturicina F4, Morricina 269, Kurstacina 287, Kenyacina 404, Entomocina 420, Tolworthcina 524 y Entomocina 110. Para las demás Bt-BLIS se utilizó la extracción con solventes comúnmente utilizada en las bacteriocinas de BAL, pero solo se aplicó la extracción con cloroformo para la Thuricina y la partición en fases con butanol para la Thuricina 17. La Thuricina S se sometió a filtración con membranas de 0.22 μm solamente como una etapa previa a la separación en un cartucho de sílica Sep-Pak para extracción en fase sólida con fuerte hidrofobicidad que permitió a la bacteriocina ser adsorbida del medio de cultivo para su posterior purificación. Una vez que la bacteriocina ha sido concentrada se lleva a un nivel de purificación mayor, que es diferente para cada Bt-BLIS, por ejemplo en la thuricina se dializa el concentrado, se somete a ultrafiltración y una segunda diálisis hasta terminar con una cromatografía de filtración en gel (Chehimi y col., 2007).

Con respecto a los concentrados de la Thochicina, Thuricina 7, Morricina 269, Kurstacina 287, Kenyacina 404, Entomocina 420, Tolworthcina 524, después de precipitarlas solamente se centrifugan y se recuperan en buffer Tris-HCl o buffer de fosfatos antes de dializarse como etapa final para obtener las bacteriocinas parcialmente purificadas. La anterior secuencia de etapas y además una etapa adicional de extracción con butanol, funciona para la parcial purificación de la Entomocina 110. Se ha utilizado también la secuencia etapas que incluyen la diálisis, filtración en gel con sefacryl y finalmente la cromatografía de intercambio iónico con sefarosa DEAE (dietilaminoetil) para lograr purificar la Entomocina 9.

Las Thuricina 439, Bacthuricina F4, Thuricina 17 y Thuricina S se sometieron a un proceso de purificación más sofisticado que consiste en una cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), un tipo de cromatografía en columna utilizada frecuentemente para

separar los componentes de una mezcla basándose en diferentes tipos de interacciones químicas entre las bacteriocinas analizadas y la columna cromatográfica. En dos de estas bacteriocinas, en la Thuricina 439 y Thuricina 17 se utilizó HPLC fase reversa, técnica perfeccionada al introducir una variación en la composición de la fase móvil durante el análisis, conocida como elución en gradiente, siendo común iniciar con un gradiente de fase reversa de un 5% de **acetonitrilo** y progresar linealmente hasta un 50% en 25 minutos para realizar la separación.

La eficiencia del proceso de purificación se mide en cada etapa corroborándose la actividad inhibitoria de la Bt-BLIS obtenida de cada cepa bacteriocinigénica sobre la cepa indicadora y se establece el proceso óptimo de purificación.

7 MATERIALES Y MÉTODOS

7.1 Material Biológico

Las cepas productoras de bacteriocinas fueron *Bacillus thuringiensis* subsp. *morrisoni* (LBIT 269), *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* (LBIT 287), *B. thuringiensis* subsp. *kenyae* (LBIT 404), *B. thuringiensis* subsp. *entomocidus* (LBIT 420) y *B. thuringiensis* subsp. *tolworthi* (LBIT 524), las cuales pertenecen a una colección de cepas mexicanas de *B. thuringiensis* del CINVESTAV, Irapuato, México y que fueron donadas por el Dr. Jorge E. Ibarra. Estas cepas producen la Morricina 269, Kurstacina 287, Kenyacina 404, Entomocina 420 y Tolworthcina 524 respectivamente. Como bacteria indicadora se utilizó *B. cereus* 183, la cual fue obtenida de una colección de cepas del Centro Internacional de *Bacillus* entomopatógenos del Instituto Pasteur localizado en París, Francia. Las bacterias patógenas de importancia en alimentos o en la salud pública que se emplearon para evaluar la actividad de las bacteriocinas fueron *Pseudomona aeruginosa* ATCC 27853, *Staphylococcus xylosum* ATCC 700404, *Staphylococcus aureus ssp aureus* ATCC 25923, *Enterobacter cloacae* ATCC 13047, *Proteus vulgaris* ATCC 13315, *Listeria innocua*, *B. cereus* 183, *Salmonella sp*, *Shigella flexneri*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus pneumoniae*, *Escherichia coli*. La actividad de las bacteriocinas también fue evaluada contra cepas de *S. aureus* (50) aisladas de leche extraída de vacas Holstein con mastitis bovina de un rebaño en Morelia, Michoacán y contra los hongos *Rhizopus sp*, *Trichoderma sp* SD3, *Trichoderma sp* SH1, *Mucor rouxii* y *Fusarium oxysporum* obtenidos de la colección de cepas del laboratorio de Biotecnología de la División de Ciencias de la Vida de la Universidad de Guanajuato. Todas las transformantes fueron obtenidas empleando *Escherichia* DH5 α F' ([*supE44*, Δ *lacU169* (F ϕ 80*lacZ* Δ *M15*) *hsdR17 recA1 end A1 gyrA96 thi-1 relA1*]. El vector pBluescript KS(+)(Stratagene) fue empleado como vector de clonación y contiene un origen de replicación para *E. coli*, codifica un gen de resistencia a ampicilina y por complementariedad codifique a la beta galactosidasa.

7.2 Producción de las bacteriocinas

Las cepas de *B. thuringiensis* se cultivaron en caldo de soya tripticasa (CST) a 28°C a 180 rpm por 24 horas y el crecimiento celular fue evaluado espectrofotométricamente con un espectro Smartspect (BioRad, Hercules California) hasta obtener una densidad óptica (OD) de 2.0 a 600 nm. Los cultivos fueron centrifugados a 4, 000 rpm a 4°C por 15

minutos, el sobrenadante se ajustó a pH 6.8 y se filtró a vacío con una membrana de 0.20 μm . El filtrado se precipitó toda la noche a 4°C con sulfato de amonio $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ al 80% de saturación, se centrifugó en las condiciones antes mencionadas y se resuspendió en buffer de fosfatos 100 mM pH 6.8. Finalmente las muestras fueron dializadas frente al mismo buffer toda la noche a 4°C utilizando el kit para mini diálisis con una membrana de 1 kDa (Amersham Biosciences). Las bacteriocinas concentradas fueron almacenadas a -20°C hasta su posterior aplicación.

7.2.1 Determinación del peso molecular y de la actividad directa de las bacteriocinas en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE)

Volumenes iguales de bacteriocinas concentradas fueron tratadas con buffer de carga sin β -mercaptoetanol y se calentaron a 55° C durante 5 minutos. Cada muestra se colocó (20 μl) en los carriles de los 2 geles de poliacrilamida al 12% bajo condiciones desnaturalizantes (Laemmli, 1970) utilizándose un marcador de peso molecular preteñido (BenchMark, Invitrogen) y la separación se realizó inicialmente a 50 V y después a 100 V durante ~30 minutos y 2 horas respectivamente. Un gel se tiñó con azul de Coomassie (2.5 g Azul Brillante Coomassie R-250, 450 mL metanol, 100 mL ácido acético glacial, aforado a 1 L con agua destilada estéril) por 12 horas en agitación continua. Posteriormente se le agregó la solución I [metanol 50% (v/v), ácido acético 10% (v/v)] para desteñirlo por una hora y posteriormente la solución II [metanol 5% (v/v), ácido acético 7% (v/v)] hasta hacer visibles las bandas de las proteínas.

El otro gel se fijó por 30 minutos con isopropanol (25% v/v)-ácido acético (10% v/v) a temperatura ambiente. Posteriormente se lavó con agua destilada estéril (ADES) en 6 ocasiones, por tiempos de 10 min cada uno. El gel se incubó 10 minutos con buffer de fosfatos pH 6.5-7.0, se transfirió a una caja petri estéril y se incubó a 37° C por 10 minutos. El gel fue cubierto con una capa delgada de agar para pozos (CST con agar 0.7% peso/volumen) conteniendo la bacteria indicadora ($\sim 1 \times 10^9$ células/ml) y se colocó en el extremo inferior derecho del gel 1 μl de bacteriocina concentrada. El gel se dejó solidificar y se incubó a 28 °C durante 24 horas. Para determinar el peso molecular de las proteínas

con actividad antibacteriana se compararon las zonas de inhibición con las del gel teñido con azul de Coomasie.

7.3 Estandarización de un nuevo método para la determinación rápida de la actividad de las Bt-BLIS

La bacteria indicadora (*B. cereus* 183) fué crecida en CST a 28°C toda la noche. A un volumen del cultivo se le añadieron 4 volúmenes de CST fresco y se dejó incubar a 28°C a 200 rpm por 2 horas. El cultivo se centrifugó a 4000 rpm a 4°C por 15 minutos y el paquete celular se resuspendió en buffer de fosfatos 50 mM con 5% (v/v) de glicerol, pH 6.8 (BFG) para ajustar la concentración celular a 2×10^8 o 4×10^8 cel/ml. A 200 μ l de estas células se les añadieron 20 μ l de tolueno:acetona (1:4), se agitaron en vortex. Inmediatamente después 20 μ l de esta muestra se mezclaron con (BFG) 50 mM y con diferentes volúmenes de sulfato de berberina 4 mM (Sigma) disuelta en etanol hasta un volumen final de 1000 μ l. Las mezclas se incubaron 1 minuto a temperatura ambiente y se midió la fluorescencia en un fluorómetro Turner modelo 450 (filtros 340-415 nm).

Posteriormente $\sim 4 \times 10^8$ cel/ml de *B. cereus* 183 se mezclaron con 0 a 50 μ l de cada bacteriocina y se ajustaron los volúmenes hasta 100 μ l con BPG, se incubaron 5 minutos a temperatura ambiente, se les agregó 6 μ l de berberina 4 mM y se ajustó a un volumen 1000 μ l con BFG para una concentración final de berberina de 24 μ M. Finalmente se determinó la actividad de las bacteriocinas al graficar los μ l de bacteriocina contra la fluorescencia emitida por la berberina.

7.3.1 Correlación entre el nuevo método fluorogénico y el método de difusión en pozos

Para determinar si existe una correlación entre el método de fluorescencia y el tradicional método de difusión en pozos, se realizó el experimento anteriormente mencionado y además la difusión en pozos con iguales cantidades de las Bt-BLIS.

En la determinación de la actividad de las Bt-BLIS por difusión en pozos se inoculó *B. cereus* 183 en CST y se incubó a 28°C y 200 rpm toda la noche. En campana de flujo laminar se mezclaron 25 ml de agar para pozos fundido y temperado con 175 μ l de cultivo de *B. cereus* 183 ($\sim 1 \times 10^9$ células/ml), se agitó suavemente, se plaquearon en cajas petri y se

dejaron solidificar. Se hicieron pozos de 8 mm de diámetro en el agar y se dejaron secar a 37°C por 2 horas. En cada pozo se depositaron diferentes volúmenes de las bacteriocinas (10, 20, 30, 40, 50 µl) correspondientes a las cantidades utilizadas en el ensayo de fluorescencia y un control. Las cajas se dejaron incubar a 4°C por 12 horas para la difusión de las bacteriocinas y se incubaron adicionalmente a 28°C por un día para la medición de los halos de inhibición producidos. Todas las pruebas se realizaron por duplicado. Una unidad de actividad se definió como 1 mm² de la zona de inhibición del crecimiento de la cepa indicadora (*B. cereus* 183). Finalmente se graficó la actividad en unidades arbitrarias en mm² del área de inhibición contra la actividad en unidades relativas de fluorescencia.

Adicionalmente con el propósito de determinar si el método fluorogénico es aplicable para determinar la actividad de otras bacteriocinas y no solamente las producidas por *B. thuringiensis* se realizaron pruebas empleando la Nisina (Sigma), bacteriocina producida por *Streptococcus lactis* y que es la única bacteriocina con el reconocimiento GRAS. También se determinó la actividad de la pediocina producida por *Pediococcus acidilactici* contra *L. innocua*. Ambos ensayos permitieron verificar la eficacia de la nueva metodología por su correlación con el método de difusión en pozos.

7.4 Efecto de la presencia de la bacteria susceptible en la producción de las Bt-BLIS

7.4.1 Determinación del número de células de *B. cereus* 183 necesarias para incrementar la síntesis de bacteriocinas de *B. thuringiensis*

Se co-cultivaron cantidades fijas (~1x10⁸ cel/ml) de cada cepa de *B. thuringiensis* con cantidades ascendentes (10³ a 10⁷ cel/ml) de la cepa *B. cereus* 183 en CST, y los cultivos se incubaron a 28°C y 180 rpm por un período de 8 horas. Se tomaron alícuotas cada dos horas, se centrifugación a 4000 rpm y 4°C por 15 minutos, el sobrenadante se ajustó a pH 6.8, se filtró con una membrana de 0.45 µl (Fisherbrand) y se determinó la actividad por el método de fluorescencia.

7.4.2 Caracterización parcial del inductor de la síntesis de bacteriocinas de *B. thuringiensis*

Para determinar si el inductor es un compuesto que se secreta o se queda intracelularmente en la cepa indicadora, *B. cereus* 183 fue cultivado en CST toda la noche a 28°C y 180 rpm, se separaron las células del sobrenadante por centrifugación y filtración en membrana de 0.45 µl (Fisherbrand). Se realizaron cuatro ensayos en CST de la siguiente manera: en el primer ensayo se inoculó 1% de *B. thuringiensis*, en el segundo 1% de *B. thuringiensis* y 5% de *B. cereus*, en el tercero 1% de *B. thuringiensis* más 50 µl de sobrenadante libre de células de *B. cereus*, y en el cuarto 1% de *B. thuringiensis* más 50 µl de células de *B. cereus* sometidas al calor (121°C/15 minutos). En todos los ensayos se tomaron muestras cada dos horas por duplicado durante 8 horas, para determinar la actividad con el método de fluorescencia.

Para estimar la susceptibilidad a enzimas proteolíticas del posible inductor, *B. cereus* 183 fue inoculado en CST toda la noche a 28°C y 180 rpm, se centrifugó y el paquete celular se resuspendió en buffer de fosfatos 50 mM pH 7.0. Después 50 µl del sobrenadante libre de células se mezcló con la misma cantidad de buffer de fosfatos 100 mM, pH 7.0 y 1 U/ml de proteinasa K (Invitrogen). Se repitió el mismo procedimiento con 50 µl de células de *B. cereus* calentadas a 55°C por 10 minutos, agregándose la misma cantidad de proteinasa K. Se realizaron controles con la misma cantidad de sobrenadante libre de células y células sin agregar proteinasa K. Las mezclas se incubaron a 37°C por una hora y se calentaron a 100°C por 10 minutos para detener la reacción. Todas las cepas de *B. thuringiensis* se sembraron en 50 ml de CST adicionado con los 4 tratamientos descritos anteriormente, se incubaron por 8 horas para finalmente determinar la actividad de las bacteriocinas por el método de fluorescencia.

7.5 Determinación de la actividad de las Bt-BLIS contra bacterias y hongos de importancia en alimentos, salud pública y ganadería.

7.5.1 Determinación de la actividad de las bacteriocinas contra bacterias patógenas

Se utilizó el método modificado de difusión en pozos para establecer la actividad antibacteriana de las bacteriocinas parcialmente purificadas contra las bacterias patógenas mencionadas en 7.1. Las cepas se incubaron toda la noche a 37°C a 180 rpm en medios de cultivo líquido como CST (*B. cereus* 183, *Listeria innocua*), caldo Luria (LB) (*E. coli*),

caldo nutritivo (CN) (*Staphylococcus aureus ssp aureus* ATCC 25923, *Staphylococcus xylosum* ATCC 700404, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus pneumoniae*) o caldo infusión cerebro corazón (BHI) (*Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Enterobacter cloacae* ATCC 13047, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus vulgaris* ATCC 13315, *Salmonella sp*, *Shigella flexneri*). 25 ml de agar para pozos fundido y temperado se mezclaron con 175 μ l de cada cultivo ($\sim 1 \times 10^9$ cel/ml) y se dejaron solidificar.

Se realizaron 6 pozos de 8 mm de diámetro por caja petri con agar y se dejaron secar a 37°C por 2 horas. Sobre cada pozo se depositaron 100 μ l de cada bacteriocina (morricina 269, kurstacina 287, kenyacina 404, entomocina 420 y tolworthicina 524) y un control. Las cajas se colocaron a 4°C por 12 horas para la difusión de las bacteriocinas y posteriormente se incubaron a 28°C por un día para la medición de los halos de inhibición. Todas las pruebas se realizaron por duplicado. Una unidad de actividad se definió como un mm^2 de la zona de inhibición del crecimiento de cada cepa ensayada.

7.5.2 Determinación de actividad de las bacteriocinas contra hongos.

Los hongos *Mucor rouxii*, *Rizophus nigricans*, *Trichoderma harzianum SH1*, *T. harzianum SH* y *Fusarium oxysporum* fueron inoculados en agar Papa-Dextrosa (PDA) a 28°C por un periodo de 5 a 7 días. De cada micelio se tomó una porción de 8 mm de diámetro con ayuda de un monohorador estéril y se depositaron en el centro de cajas petri con PDA solidificado y al cual previamente se le realizaron 5 pozos de 8 mm de diámetro y se secaron a 37°C por 2 hr. Posteriormente en cada pozo se depositaron 100 μ l de las bacteriocinas producidas tal y como se mencionó previamente. Las cajas fueron incubadas toda la noche a 4°C para permitir la difusión de las muestras en el agar. Posteriormente las placas fueron incubadas a 28°C por 5-7 días comparando periódicamente el aspecto macroscópico de las colonias, las características morfológicas de cada hongo y el efecto inhibitorio de las bacteriocinas. Como controles negativos fueron empleados los hongos crecidos en PDA pero sin confrontarlos contra bacteriocinas. Cada ensayo fue realizado por duplicado.

7.5.3 Determinación de la actividad de las bacteriocinas contra cepas de *Staphylococcus aureus* causantes de mastitis

La actividad antimicrobiana de las bacteriocinas se evaluó contra cepas de *S. aureus* obtenidas de la leche de 26 vacas Holstein infectadas con mastitis bovina mediante el método modificado de difusión en pozos. 50 cepas fueron cultivadas en LB a 37°C toda la noche y de cada cultivo se tomaron 105 µl (~ 1 x 10⁹ cel/ml) los cuales se mezclaron con 15 ml de CST con 0.7% de agar (peso/volumen) y se plaquearon en cajas petri.

Se realizaron pocillos de 8 mm de diámetro en el agar solidificado y se dejó secar a 37°C por 2 horas. En cada pozo se añadieron 100 µl de cada bacteriocina producida como se mencionó en el punto 7.2. Las cajas se incubaron a 4°C toda la noche y posteriormente a 37°C por 24 horas antes de medir los halos de las zonas de inhibición. La mínima zona detectable medida para propósitos analíticos fué de 1 mm² de distancia del diámetro de cada pozo. Los ensayos fueron realizados por triplicado y los resultados obtenidos se promediaron. Se definió una unidad (U) de actividad de las Bt-BLIS corresponde a 1 mm² de la zona inhibición del crecimiento de cada cepa (Delgado y col., 2005; Barboza-Corona y col., 2007).

Por otro lado, el grupo de Dr. Joel López Meza del Centro Multidisciplinario de Estudios en Biotecnología-FMVZ de la Universidad Michoacana de San Nicolás Hidalgo realizó el siguiente experimento. Se tomaron 200 µl de leche, se inocularon en placas de agar sangre (AS) y se incubaron a 37°C por 24 horas.

En los *S. aureus* aislados se determinó la susceptibilidad a antibióticos con el método de difusión en discos en placas de agar Muller-Hinton (AMH) utilizando los siguientes multidiscos para Gram-positivos (BioRad): ampicilina, 10 µg (≤28); cefalotina, 21 30 µg (≤14); cefotaxina, 30 µg (≤14); ceftazidina, 30 µg (≤14); cefuroxina, 30 µg (≤14); dicloxacilina, 1 µg (≤10); eritromicina, 15 µg (≤13); gentamicina, 10 µg (≤12); 23 pefloxacina, 5 µg (≤14); penicilina, 10 U (≤28); tetraciclina, 30 µg (≤14) y trimetoprim, 25 µg (≤10). In los parentesis se indican los diámetros (mm) de las zonas de inhibición utilizadas para considerar si un aislado es susceptible o resistente (BioRad).

7.6 Investigación preliminar para el aislamiento de genes que codifican las bacteriocinas

7.6.1 Extracción de plásmidos de *B. thuringiensis*

Las cepas de *B. thuringiensis* fueron cultivadas por separado en 150 ml de medio Spizizen en un matraz de 500 ml a 28 °C a 180 rpm ~16-18 horas. Las muestras fueron centrifugadas a 6 000 rpm a 4°C por 15 minutos y se eliminó el sobrenadante. El paquete celular fue resuspendido en 20 ml de buffer de TE (30 mM Tris base, 5 mM EDTA, 50 mM NaCl, pH 8.0), se centrifugó y se eliminó el sobrenadante. La pastilla fue resuspendida en 4.8 ml de Solución I fresca (Sacarosa 1M, EDTA 0.5 M, Tris-HCl 1M) y se le agregó 10 mg de lisozima por ml de solución antes de utilizarla. Las muestras fueron incubadas a 37 °C por 1 hora y después 20 minutos en hielo o a 4 °C en el refrigerador. Posteriormente se adicionaron 9.6 ml de solución II (NaOH 10N, 2 ml de SDS 10%) preparada antes de utilizarla y se mezcló suavemente. La presencia de viscosidad en la solución indicó una buena lisis celular. Se adicionaron 8 ml de solución III (acetato de sodio 3 M pH 4.8), se mezcló suavemente y se incubó por 30 minutos a -20°C. La presencia de un precipitado de color blanco indicó la presencia de restos celulares, DNA cromosómico y proteínas. Las muestras fueron centrifugadas y los sobrenadantes fueron vaciados en tubos estériles. A cada sobrenadante se le adicionó un volumen de alcohol isopropílico o dos volúmenes y se incubaron 1 h a -20°C o bien durante toda la noche. Las muestras fueron centrifugadas a 10,000 rpm y 4°C por 15 minutos, se eliminó el sobrenadante, la pastilla fue lavada con etanol absoluto al 70% (v/v) y se dejó secar a temperatura ambiente o a 28 °C por 30 minutos. La pastilla con el DNA plasmídico seca se disolvió con un volumen apropiado de Tris-HCl 10 mM. Las muestras se mezclaron con el buffer de carga [Azul de bromofenol 0,25% (p/v), xilen cianol 0,25% (p/v), glicerol 30% (v/v)] y fueron analizadas por electroforesis en geles de agarosa 0.8% (p/v)-bromuro de etidio (10mg/100ml) en TAE 1X (Tris-Acetato 0.04 M, EDTA 0.001 M) empleando una cámara BioRad MINI-SUB[®]CELL GT. Se observó el gel en un transiluminador de luz ultravioleta y se registraron los resultados en el sistema de foto documentación gel doc (Bio-Rad). Para la determinación del tamaño de los plásmidos de las dos cepas se empleó una escalera de DNA superenrollado de 2 a 16 Kb (Invitrogen).

7.6.2 Digestión y análisis tipo Southern Blot

7.6.2.1 Diseño y marcaje de la sonda

Se diseñaron 2 oligonucleótidos degenerados (Bact-1: 5'-AYTGGACNTGYTGGWSNTG-3' y Bact-2: 5'-GATTGGACWTGYTGGWSWTG-3') a partir de las regiones conservadas de la parte N-terminal de las bacteriocinas Bacthuricina F4 y Thuricina 17 (Gray y col., 2006).

La sonda degenerada Bact-2 fue marcada con digoxigenina mediante un método no radiactivo (Roche) (Figura 3) y empleada para la detección de un fragmento que contenga un probable gen que codifique alguna bacteriocina.

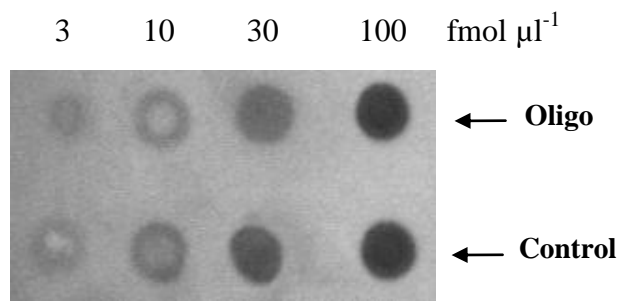


Figura 3. Marcaje de la sonda degenerada Bact-2 diseñada a partir de dos extremos N-terminales reportados para *B. thuringiensis*

7.6.2.2 Hibridación tipo Southern

Muestras de DNA sin digerir o digeridas con enzimas de restricción fueron separados en geles de agarosa al 0.8%. El gel se fue depurinó por 10 minutos con HCl 0.25M, se desnaturizó por 30 minutos con Tris -HCl 0.5M, NaCl 1.5M, pH 7.4 y se neutralizó por 30 minutos con NaCl 3M, citrato de sodio 300 mM, pH 7.0). El gel se equilibró con SSC 10X (3M NaCl. 150mM citrate de sodio, pH 7.0) durante 20 minutos antes de transferirlo a una membrana de nylon (Roche) utilizando un turboblotter (Schleicher & Schuell Bioscience). Una vez transferidos los geles, con un lápiz se señalaron los carriles y se lavó con 5XSSC por 5 minutos con agitación lenta. Las membranas de nylon se dejaron secar y se fijaron durante 3 minutos con luz ultravioleta a 312 nanómetros (nm). Las condiciones de prehibridación, hibridación y detección fueron realizadas como lo sugiere el proveedor (Roche). Para la prehibridación, las membranas fueron colocadas en solución estandar a

temperature de 45 °C por 2 horas mínimo. Después se adicionó la sonda desnaturalizada previamente marcada con digoxigenina. Las membranas junto con la sonda (oligo Bac-2) se dejaron hibridando durante toda la noche a 65°C. Después de la hibridación, la sonda se recuperó y las membranas se lavaron en 2X SSC-0.1% SDS dos veces durante 5 minutos a temperatura ambiente y agitación lenta. Se lavaron nuevamente con 1X SSC dos veces por 15 minutos a temperatura ambiente y agitación lenta. Las membranas se colocaron en un recipiente limpio y se equilibraron con la solución Genius 1 (150mM NaCl, 100mM Tris-HCl, pH 7.5) por 5 minutos. Se trataron con la solución Genius 2 (80 ml Genius I, 2g casein) por 45 minutos y se dejaron reaccionar con el anticuerpo (Anti-DIG) fosfatasa alcalina. Las membranas se lavaron con la solución Genius 1 por 30 minutos y agitación lenta, y después se equilibraron en la solución Genius 3 (100 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, ajustar a pH 9.5, 50mM MgCl₂) por 5 minutos. La detección fue realizada por un método colorimétrico utilizando como revelador 100µl de NBT/BCIP (cloruro de tetrazolio nitroazul/ sal *p*-toluidina de 5-bromo-4-cloro-3'-indolilfosfato) como lo recomienda el proveedor (Roche).

7.6.3 Obtención de un minibanco plasmídico

Fragmentos plasmídicos obtenidos de *B. thuringiensis* fueron digeridos con *HindIII* y puestos a ligar (16°C, 14 horas) con el pBluescript KS + previamente digerido con la misma enzima empleando la T4 DNA ligasa. Los productos de la ligación se dializaron en filtros de nitrocelulosa (Millipore 0.025 µm) con ADES (agua destilada estéril) por 1 hora a temperatura ambiente. Posteriormente se recuperó cada muestra en tubos eppendorff y se prosiguió a electroporar. Aproximadamente 8 µl del producto de ligación fueron mezclados con 70 µl de células electrocompetentes de *E. coli* DH5αF', se colocaron en celdillas de electroporación (Invitrogen) y se dió un choque eléctrico a 2.3 kilovolts en un electroporador Ecoli pulser (BioRad. Posteriormente el contenido de las celdas se vació en un tubo estéril con 1 ml de caldo LB y se incubaron a 37°C a 200 rpm por una hora. Las bacterias transformantes se sembraron por extensión (10, 50, 100 µl) en placas con agar LB adicionado ampicilina (100 µg/ml), el X-gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil-beta-D-

galactopiranososa) (64 µg/ml) e IPTG (isopropil-beta-D-thiogalactopiranososa) (100µg/ml). Las colonias blancas fueron seleccionadas, almacenadas y empleadas para posteriores estudios.

7.6.4 Detección de la actividad bacteriocinogénica de las transformantes

Las colonias transformantes (blancas) se inocularon en 2 ml de caldo LB suplementado con ampicilina y se crecieron a 37 °C y 150 rpm toda la noche. Los cultivos se centrifugaron y 50µl del sobrenadante se utilizaron para la determinación de actividad por fluorescencia. Se mezclaron los 50 µl de sobrenadante con 20 µl de *B. cereus* 183 (OD_{600nm}=0.8 a 1.0 y ~4×10⁸ cel/ml) se incubaron durante 5 minutos a temperatura ambiente y se añadieron 930 µl de sulfato de berberina (24 mM) y se determinó la fluorescencia en el fluorómetro Turner 450 (340 nm filtro de interferencia, 415 nm filtro de corte). Los resultados obtenidos por fluorometría fueron corroborados con la técnica de difusión en pozos. Las transformantes con la mayor actividad o que presentaron actividad tanto por fluorometria como por la prueba de difusión de pozos fueron inoculadas en LB con ampicilina a 37°C y 180 rpm durante toda la noche. Los cultivos fueron centrifugados y se extrajeron los plásmidos de las pastillas celulares empleando un kit commercial (QIAprep Spin miniprep Kit-microfuge, QIAGEN). Con el propósito de conocer el tamaño del fragmento clonado, los plasmidos fueron analizados sin digerir o digeridos con enzimas de restricción y visualizados en geles de agarosa. En caso de requerirse el o los fragmentos clonados fueron mandados secuenciar al Laboratorio Nacional de Genómica para la Biodiversidad (Langebio) ubicado en Irapuato, Guanajuato, México.

8. RESULTADOS

8.1 Producción de las bacteriocinas y determinación de su peso molecular

Para la producción de las Bt-BLIS las cepas de *Bacillus thuringiensis* y *B. cereus* 183 fueron sembradas en CST bajo las condiciones óptimas de propagación previamente determinadas (Barboza-Corona y col. 2007). Para corroborar su peso molecular y la actividad de las bacteriocinas, las muestras fueron colectadas, concentradas y analizadas por electroforesis en geles de poliacrilamida bajo condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE), pero sin incluir en el buffer de muestra el agente reductor β -mercaptoetanol. Las 5 cepas de *B. thuringiensis* (LBIT 269, LBIT 287, LBIT 404, LBIT 420, LBIT 524) secretaron diferentes proteínas, incluyendo aquellas de aproximadamente 10 kDa (Figura 4). Estas proteínas presentaron actividad inhibitoria contra *B. cereus* 183 (bacteria indicadora), confirmando su masa molecular (Figura 5). Después de esta confirmación las bacteriocinas producidas se utilizaron en las determinaciones de la actividad inhibitoria contra bacterias bacterias y hongos de importancia en alimentos, salud pública y ganadería.

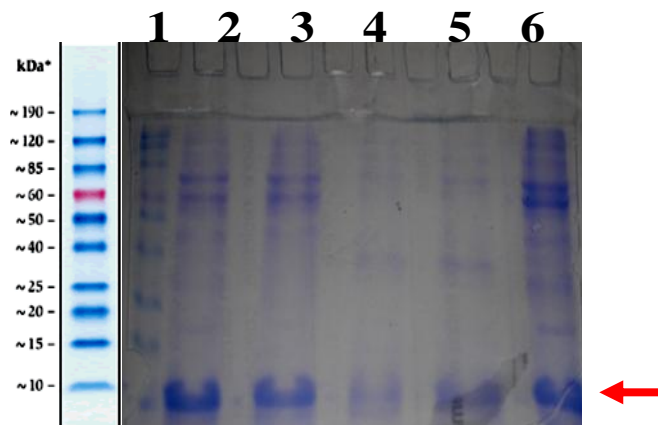


Figura 4. Determinación del peso molecular de las bacteriocinas producidas por cepas de *B. thuringiensis* por SDS-PAGE. Carril 1, marcador preteñido

(Invitrogen), carriles 2, 3, 4, 5 y 6 corresponden a la Morricina 269, Kurstacina 287, Kenyacina 404, Entomocina 420 y Tolworthcina 524 respectivamente. Al lado izquierdo se observan los pesos moleculares del marcador.

8.2 Desarrollo de un nuevo método para la determinación rápida de la actividad de las Bt-BLIS

Para demostrar que la berberina se puede utilizar efectivamente en la determinación rápida de bacteriocinas, primero comprobamos que este alcaloide es capaz de fluorescer en el interior celular de la cepa indicadora *B. cereus* 183 permeabilizada con tolueno:acetona. Células colectadas por centrifugación de la cepa indicadora se resuspendieron en BFG hasta obtener una concentración 2×10^8 o 4×10^8 cel/ml y se mezclaron con tolueno:acetona (1:4), y se les agregó BFG, sulfato de berberina 4 mM y se determinó la fluorescencia por triplicado en el fluorómetro Turner 450. Los valores promedio de la fluorescencia fueron graficados contra la concentración de la berberina. Se realizó un control sin sulfato de berberina (Figura 5). Los resultados indicaron una mínima fluorescencia en los controles, contrariamente a las células tratadas con tolueno:acetona que mostraron un marcado incremento en la fluorescencia, indicando que las células de *B. cereus* fueron perforadas y la berberina ingreso al interior de las células. La fluorescencia se incremento al aumentar la densidad celular o la concentración de la berberina. Para posteriores experimentos se seleccionó una concentración de la berberina de 24 μM y una densidad celular de 4×10^8 cel/ml de *B. cereus*, los cuales fueron seleccionados al tomar el punto medio de la gráfica (Figura 5).

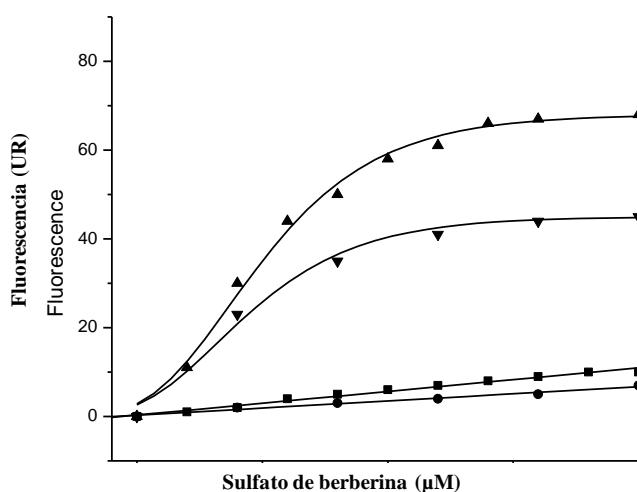


Figura 5. Fluorescencia emitida por la berberina (sulfato de berberina) localizada al interior de *Bacillus cereus*. \blacktriangledown 2×10^8 cel/ml de *B. cereus* tratadas con

tolueno:acetona. ▲ 4×10^8 cel/ml de *B. cereus* tratadas con tolueno:acetona. ● 4×10^8 cel/ml de *B. cereus*. ■ 50 mM Buffer de fosfatos-5% glicerol. Desviaciones estándar más pequeñas que los símbolos en cada punto.

Para demostrar que las bacteriocinas provocan en las células indicadoras una respuesta similar en fluorescencia a la respuesta de las células tratadas con tolueno:acetona y además que la actividad se correlaciona con la actividad determinada con el método estandar de difusión en pozos, se realizaron experimentos similares a los descritos arriba pero utilizando las bacteriocinas producidas por *B. thuringiensis*. Se mezclaron 20 μ l ($\sim 4 \times 10^8$ cel/ml) de *B. cereus* con diferentes volúmenes de cada bacteriocina (0 a 50 μ l) y se ajustó el volumen a 100 μ l con BFG, se incubó 5 minutos y se agregó la berberina a una concentración final de 24 μ M ajustando el volumen final a 1000 μ l. Se midió la fluorescencia y se observó un incremento lineal, (Figura 6a) con coeficientes de correlación (r) de 0.99 para la morricina 269, kustacina 287, keniacina 404 y tolworthcina 524 y de 0.97 para la entomocina 420.

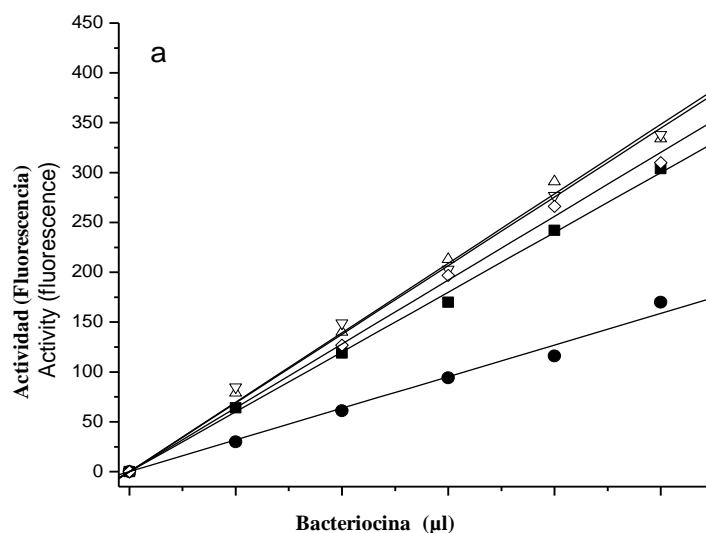


Figura 6a. Fluorescencia emitida por sulfato de berberina en interior celular de *Bacillus cereus* tratado con diferentes bacteriocinas. ■ Morricina 269; ● Kurstacina 287; ▲ Keniacina 404; ▼ Entomocina 420; ◇ Tolworthcina 524. Las desviaciones estándar fueron más pequeñas que los símbolos observados en cada punto.

Para comprobar que existe una correlación entre el método fluorogénico y el de difusión en pozos, volúmenes (0 a 50 μl) de las mismas muestras de bacteriocinas empleadas en el experimento anterior fueron colocadas en pocillos de 8 mm de diámetro de un medio de agar con *B. cereus* ($\sim 1 \times 10^9$ cel/ml), se incubaron a 4°C por 12 horas y adicionalmente a 28°C durante un día, midiendo posteriormente las áreas de inhibición de la cepa indicadora. En la la Figura 6b se puede observar un alto grado de correlación entre la fluorescencia emitida por la berberina y la actividad en mm^2 de inhibición de cada bacteriocina por separado. Analizando los resultados de todas las bacteriocinas juntas observamos una correlación de 0.93 (Figura 6b). En nuestros protocolos la máxima área de inhibición de 350 mm^2 correspondiente a una fluorescencia relativa de 340 aún proporciona una respuesta lineal.

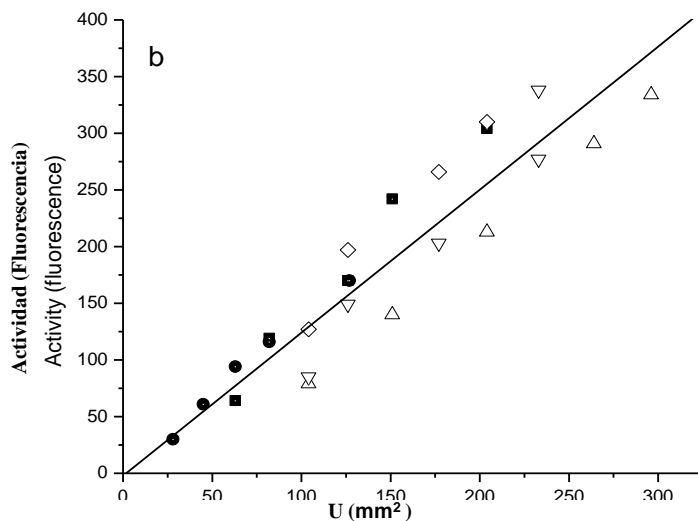


Figura 6b. Correlación entre la actividad en mm^2 de área de inhibición y fluorescencia. ■ Morricina 269; ● Kurstacina 287; △ Kenyacina 404; Entomocina 420; ◇ Tolworthcina 524. Las desviaciones estándar fueron más pequeñas que los símbolos observados en cada punto.

Utilizando el método fluorogénico se determinó la actividad de bacteriocinas comerciales como la nisina (Sigma) producida por *Streptococcus lactis*, cuya actividad fue evaluada contra *Listeria innocua* y *B. cereus* 183 (Figura 7). La nisina es reconocida como GRAS, es utilizada en la conservación de alimentos en más de 50 países y es una buena

referencia para probar la eficacia de la nueva metodología desarrollada. También se determinó la actividad de la pediocina producida por *Pediococcus acidilactici* contra *L. innocua*. Los ensayos adicionales con nisina y pediocina se realizaron tal y como se mencionó previamente.

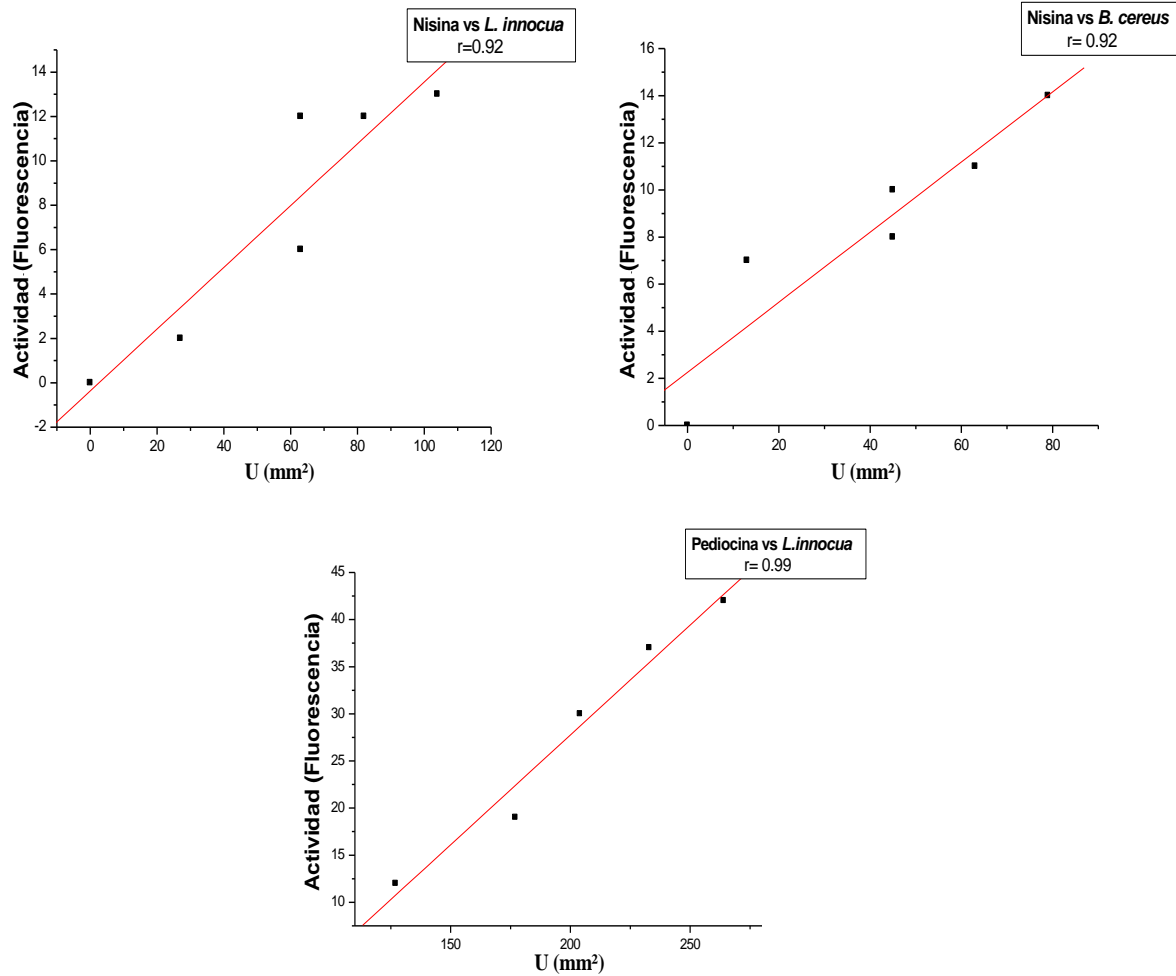


Figura 7. La determinación de la actividad de bacteriocinas comerciales muestra una amplia correlación entre la fluorescencia emitida por la berberina y el área de inhibición en mm^2 . Para la nisina se obtuvo una correlación de 0.92 utilizando *L. innocua* o *B. cereus* como cepas indicadoras. Para la pediocina se obtuvo una correlación de 0.99 contra *L. innocua*.

Con relación a la Nisina, se encontró una alta correlación ($r=0.92$) entre la fluorescencia emitida por la berberina y el área de inhibición en mm^2 utilizando *L. innocua* o *B. cereus* como cepas indicadoras. Cuando ensayamos la acción de la pediocina contra *L. innocua* la correlación fue de 0.99 (Figura 7). Estos resultados sugieren que el método fluorogénico

que hemos desarrollado es confiable y rápido para determinar en las preparaciones crudas la presencia de sustancias que desestabilizan las membranas bacterianas, particularmente las bacteriocinas en menos de una hora. El método puede sustituir a los protocolos tardados y tediosos, tales como el método de difusión en pozos.

8.3 Efecto de la presencia de la bacteria susceptible en la producción de las Bt-BLIS.

8.3.1 Determinación del número de células de *B. cereus* 183 necesarias para incrementar la síntesis de bacteriocinas de *B. thuringiensis*

Cuando se co-cultivo una cantidad fija de *B. thuringiensis* ($\sim 1 \times 10^9$ cel/ml) y cantidades ascendentes (10^3 a 10^7 cel/ml) de la cepa indicadora (*B. cereus* 183) en condiciones óptimas para su propagación (28°C y 180 rpm) por 8 horas, observamos que existe un aumento en la producción de las bacteriocinas medido por un incremento en la fluorescencia (Figura 8). Estos valores fueron comparados con muestras de *B. thuringiensis* cultivadas en las mismas condiciones de propagación pero sin adicionar la cepa indicadora. La máxima producción de la Morricina 269 se observó a las 6 horas con 1×10^6 cel/ml de la cepa indicadora, para la Kurstacina a las 4 horas y 1×10^3 cel/ml y la máxima producción de la Kenyacina, Entomocina y Tolworthcina ocurrió a las 8 horas con 1×10^3 cel/ml, 1×10^7 cel/ml y 1×10^6 cel/ml de la cepa indicadora respectivamente.

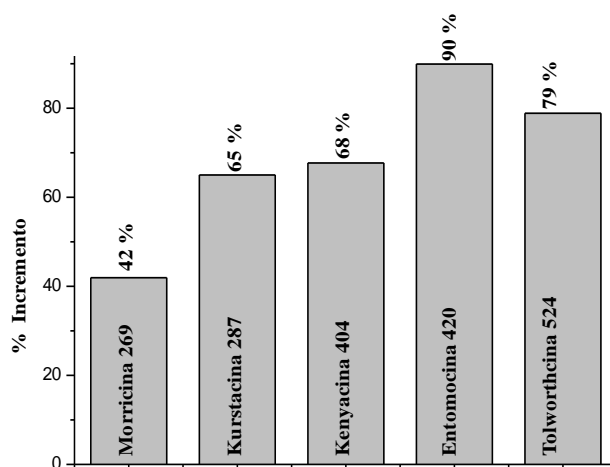


Figura 8. Incremento en la producción de las bacteriocinas de *B. thuringiensis* en presencia de la cepa indicadora *B. cereus* 183 (control), y la actividad por el método fluorogénico.

8.3.2 Detección de un inductor de la síntesis de bacteriocinas de *B. thuringiensis*

Cuando los cultivos de *B. thuringiensis* son suplementados con células de *B. cereus* 183 calentadas a 55°C (C) o con sobrenadante libre de células (SLC) se observa un incremento en la producción de bacteriocinas en todos los cultivos (Figura 9). Para determinar la naturaleza química y la termoestabilidad de la(s) molécula(s) sintetizadas por *B. cereus* 183 que incrementa la producción, se suplementaron todos los cultivos de *B. thuringiensis* con células de *B. cereus* 183 calentadas a 55°C o con sobrenadante libre de células y se trataron con y sin proteinasa K. Observamos en la Figura 10 que al utilizar SLC tratados con proteinasa K todos los cultivos mostraron un decremento en la síntesis de las bacteriocinas al compararlos con los controles. Además, al agregar células de *B. cereus* tratadas con proteinasa K a todos los cultivos de *B. thuringiensis* se observó una disminución de la producción de bacteriocinas en las cepas LBIT 287, LBIT 404, LBIT 420 y LBIT 524, contrario al incremento observado en la cepa LBIT 269.

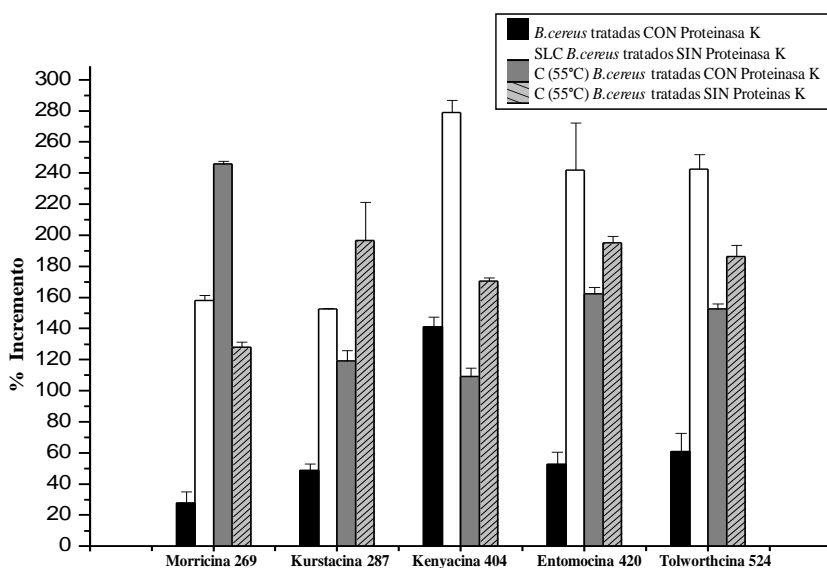


Figura 9. Incremento en la producción de bacteriocinas de *B. thuringiensis* tratadas con sobrenadante libre de células (SLC) o células (C) tratadas a 55 °C. La bacteria (células) indicadora fue *B. cereus* 183.

8.4 Determinación de la actividad de las bacteriocinas contra bacterias y hongos de importancia en alimentos, salud pública y ganadería.

8.4.1 Actividad contra bacterias patógenas de importancia en alimentos y salud pública

Para determinar el espectro de actividad de las bacteriocina, éstas fueron analizadas contra diversas bacterias patógenas (Tabla VIII) utilizando el método de difusión en pozos. Las bacteriocinas mostraron actividad contra bacterias Gram-positivas como *B. cereus*, *L. innocua*, *Staphylococcus aureus*, *S. xylosus* y *Streptococcus pneumoniae*. Además presentan actividad contra Gram-negativos como *Enterobacter cloacae*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumonia*, and *Pseudomona aeruginosa*, *Salmonella* sp y *Vibrio cholerae*. Es interesante considerar que *Streptococcus pyogenes* y *Shigella flexneri* son susceptible a la Morricina 269 y a la Kustacina 287, mientras *Enterococcus faecium* se inhibe por la Kenyacina 404, Entomocina 420 y Tolworthcina 524.

Tabla VIII
Actividad inhibitoria (U) de las Bt-BLIS determinada por difusión en pozos

	Bacteria indicadora	Medio de incubación (°C) ^b	Bacteriocinas				
			Moricina	Kurstacina	Kenyacina	Entomocina	Tolworthcina
			269	287	404	420	524
Gram-positivas	<i>B. cereus</i> 1 ^c	TSB, 28	291	397	299	330	330
	<i>B. cereus</i> 183	TSB, 28	402	481	365	63	45
	<i>E. faecium</i> ^c	TSB, 37	0	0	188	307	188
	<i>L. innocua</i>	TSB, 37	610	657	402	126	126
	<i>S. aureus</i> ^d	NA, 37	1040	204	82	63	63
	<i>S. xylosus</i>	NA, 37	610	610	481	45	264
	<i>Str. pneumoniae</i> ^d	NA, 37	0	28	104	104	0
	<i>Str. pyogenes</i>	NA, 37	104	233	13	13	0
Gram-negativas	<i>E. cloacae</i>	BHI, 37	441	441	441	63	151
	<i>Escherichia coli</i>	LB, 37	204	402	565	104	56
	<i>K. pneumoniae</i>	BHI, 37	610	441	522	104	151
	<i>P. aeruginosa</i>	BHI, 37	610	565	402	208	104
	<i>P. vulgaris</i>	BHI, 37	0	28	45	28	0
	<i>Salmonella sp</i> ^e	BHI, 37	264	28	82	28	402
	<i>Shigella flexneri</i>	BHI, 37	63	63	0	0	0
	<i>Vibrio cholerae</i> ^e		324	291	52	104	94

Una unidad se define como 1 mm² de la zona de inhibición determinado por difusión en pozos.

Un valor "0" indica no inhibición.

^a Indica el medio de cultivo y temperatura de crecimiento de las cepas.

^b Datos publicados en Barboza-Corona y col., 2007.

^c Halo de inhibición difuso.

Por otro lado, se evaluó la actividad contra 50 cepas de *S. aureus* aisladas de leche producidas por vacas infectadas con mastitis bovina criadas en el Estado de Michoacán México. En nuestro trabajo evaluamos la actividad de las bacteriocinas mientras que en el laboratorio del Dr. Joel López Meza del Centro de Estudios Multidisciplinarios en Biotecnología de la Universidad Michoacana de San Miguel Hidalgo se evaluó la susceptibilidad a antibióticos (Figura 10). En este laboratorio se encontró que las cepas de *S. aureus* aisladas fueron resistentes principalmente a la penicilina (92%), gentamicina

(92%), trimetoprim (88%) dicloxacilina (86%), ampicilina (74%) y eritromicina (74%), y tetraciclina (72%).

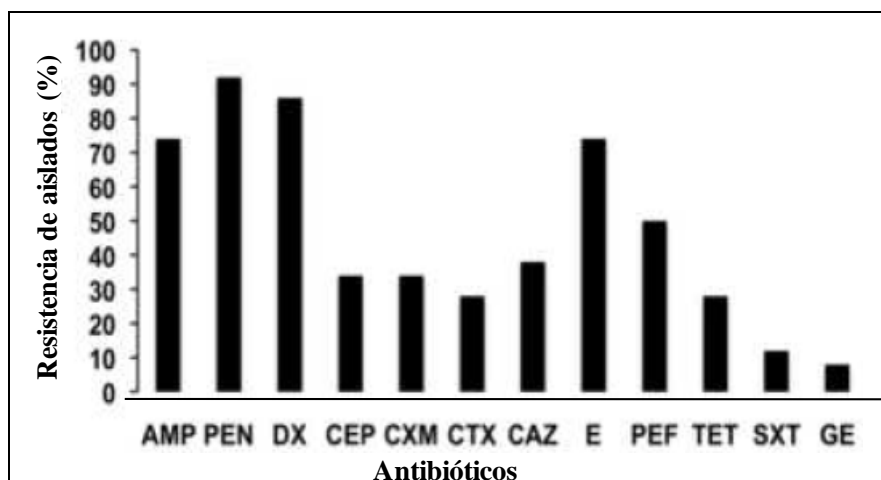


Figura 10. Resistencia antimicrobiana fenotípica de *S. aureus* aislados de vacas infectadas con mastitis bovina. AMP, ampicilina; CAZ, ceftazidina; DX, dicloxacilina; PEN, penicilina; CEP, cefalotina; CTX, cefotaxina; CXM, cefuroxina; E, eritromicina; PEF, pefloxacina; TET, tetraciclina; SXT, trimetoprim; GE, gentamicina (Barboza-Corona y col., 2009)

Además, para determinar la actividad antimicrobiana de las bacteriocinas producidas por *B. thuringiensis* contra los aislados de *S. aureus*, se tomaron 105 µl (~ 1 x 10⁹ cel/ml) de las 50 cepas y se mezclaron con 15 ml de agar y la actividad fue evaluada por difusión en pozos. En cada pozo se depositaron 100 µl de cada bacteriocina, se incubaron a 4°C toda la noche y posteriormente a 28°C por 24 horas y se determinó la presencia de halos de inhibición del crecimiento. Todos los aislados de *S. aureus* mostraron susceptibilidad a las cinco Bt-BLIS (Tabla IX), siendo la actividad más alta detectada para la Morricina 269 y Kurstacina 287, seguida por la Kenyacina 404, Entomocina 420 y Tolworthcina 524.

Tabla IX
Actividad inhibitoria (U^a) de las Bt-BLIS parcialmente purificadas contra aislados de *S. aureus* determinada por el método de diffusion de pozos^{bc}

<i>Staphylococcus aureus</i>	Morricina 269	Bacteriocinas Kurstacina 287	Kenyacina 404	Entomocina 420	Tolwothcina 524
STA 50	204	365	204	82	45
STA 51	151	269	104	45	63
STA 52	104	233	177	104	126
STA 53	151	233	151	28	28
STA 54	126	45	82	63	233
STA 55	151	233	151	82	45
STA 56	233	233	126	45	45
STA 57	204	233	204	104	63
STA 58	330	402	365	82	82
STA 59	151	104	126	63	63
STA 60	204	233	204	45	28
STA 61	177	233	104	28	28
STA 62	104	176	104	82	28
STA 63	126	264	151	104	28
STA 64	177	233	126	126	28
STA 65	126	176	104	104	28
STA 66	151	204	151	82	28
STA 67	63	204	126	82	28
STA 68	104	204	126	104	28
STA 69	126	233	126	104	45
STA 70	402	402	296	296	330
STA 71	296	402	264	63	82
STA 72	365	441	264	296	296
STA 73	233	330	151	63	45
STA 74	104	233	296	63	63
STA 75	204	177	151	45	28
STA 76	441	441	264	233	296
STA 77	296	365	233	28	63
STA 78	296	296	330	45	63
STA 79	28	82	126	45	45
STA 80	296	481	264	63	63
STA 81	441	481	441	402	441
STA 82	330	82	296	233	104
STA 83	104	126	151	45	45
STA 84	126	151	126	126	28
STA 85	441	296	402	402	441
STA 86	296	402	330	330	365
STA 87	296	365	296	63	45
STA 88	151	63	104	63	45
STA 89	330	330	204	63	63
STA 90	264	204	481	441	481
STA 91	330	441	63	45	63
STA 92	296	402	264	63	63
STA 93	204	233	204	63	28
STA 94	151	204	104	45	21
STA 95	291	269	296	63	63
STA 96	264	441	177	63	204
STA 97	402	233	330	365	151
STA 98	330	330	233	45	82
STA 99	126	264	177	45	45

^aUna unidad se define como 1 mm² de la zona de inhibición.

^bEn todos los casos, *S. aureus* se creció en LB y se utilizó AST para la difusión en pozos.

^c Los números en negritas señalan los aislados de *S. aureus* con la más baja susceptibilidad a las Bt-BLIS y los números con negritas e itálica indican los aislados de *S. aureus* con la mayor susceptibilidad en la misma columna.

8.4.2 Actividad contra hongos

Después de evaluar el efecto antibacteriano se determinó su actividad antagonista contra diversos hongos (Tabla X). Como se mencionó en materiales y métodos la prueba se realizó con discos de cultivos de cada hongo desarrollado por 7 días en PDA y se colocaron al centro de cajas con PDA fresco con pocillos de 8 mm de diámetro donde se depositaron cada una de las Bt-BLIS (100µl). Las cajas se incubaron de 5 a 7 días y se detectó la inhibición del crecimiento e inhibición de la esporulación en las dos especies de *Trichoderma* ensayadas, registrándose como un cambio en la coloración característica de verde a blanco (Figura 11). Sin embargo, no se observaron efectos inhibitorios de las Bt-BLIS contra *Rizopus sp.*, *Fusarium oxysporum* y *Mucor rouxii*.

TABLA X
Actividad antimicrobiana de Bt-BLIS parcialmente purificadas contra hongos^a

Hongo	Característica	Bacteriocinas				
		Morricina 269	Kurstacina 287	Kenyacina 404	Entomocina 420	Tolworthcina 524
<i>Rhizopus sp.</i>	Contamina alimento	-	-	-	-	-
<i>Fusarium oxysporum</i>	Fitopatógeno	-	-	-	-	-
<i>Mucor rouxii</i>	Hongo de suelo	-	-	-	-	-
<i>Trichoderma</i> sp. SH1	Micoparásito	+	+	+	+	+
<i>Trichoderma</i> SD3	Micoparásito	+	+	+	+	+

^a Símbolos (+) y (-) indican inhibición o no inhibición de la esporulación. La inhibición de la esporulación fue registrada como el cambio de color en las hifas de verde a blanco.

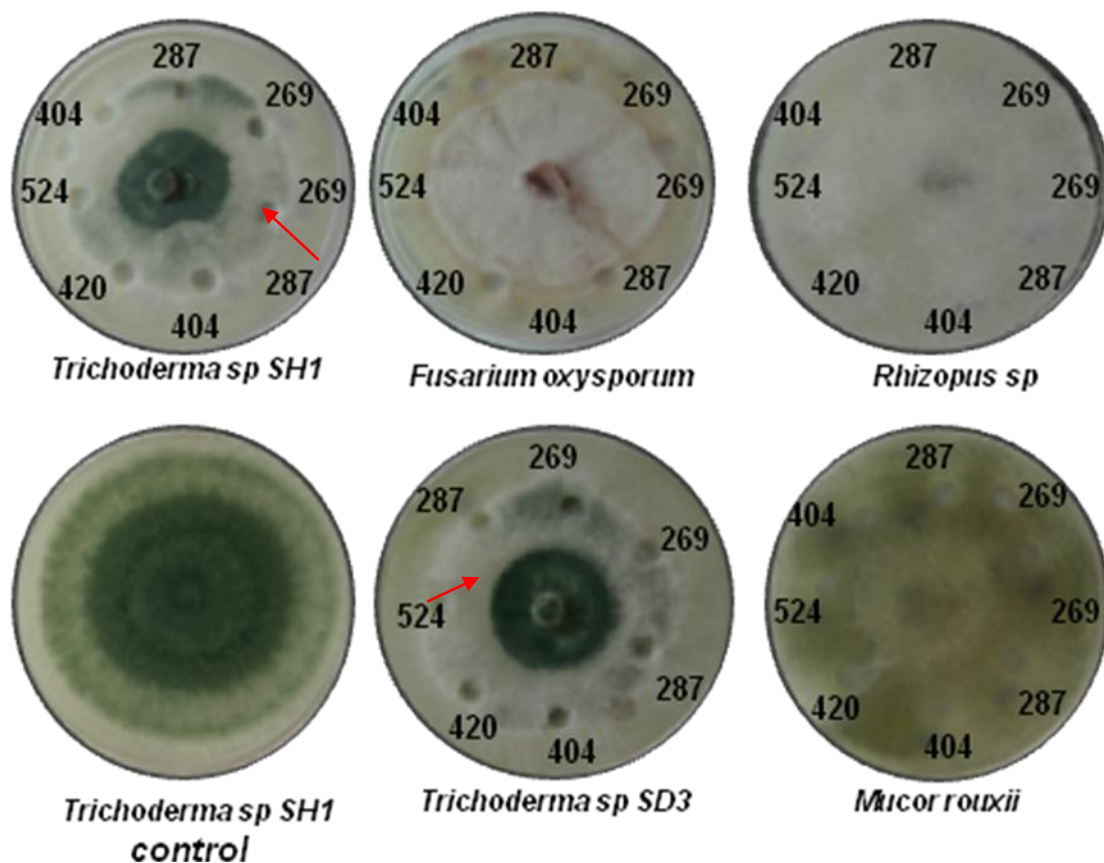


Figura 11. Inhibición de hongos de importancia en alimentos, fitopatógenos y microparásitos. En el sentido de las manecillas del reloj: Morricina 269, Kurstacina 287, Kenyacina 404, Entomocina 420, Tolworthcina 524. La inhibición de la esporulación se indica por el cambio de color hifal de verde a blanco en *Trichoderma* sp.

8.5 Datos preliminares en la clonación de genes que codifiquen bacteriocinas de *B. thuringiensis*

Se realizó la extracción de plásmidos de las cepas *B. thuringiensis* subsp. *morrisoni* (LBIT269), *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* (LBIT 287) y *B. thuringiensis* subsp. *kenyae* (LBIT 404) y las muestras fueron analizadas en geles de agarosa (Figura 12). Se observó que las tres cepas a pesar de pertenecer a diferente serovariedad presentan un patrón de plásmidos muy parecido. Por ejemplo LBIT 269 presenta al menos 5 plásmidos, con

tamaños de ~ 5, 6, 10, 14 Kb y uno mayor a 16 Kb, mientras que LBIT 287 y LBIT 404 tienen al menos 6 plásmidos, de ~5, 6, 10, 14, 16 Kb y uno mayor a 16 Kb. Es importante comentar que el patrón de plásmidos puede variar ligeramente dependiendo de su concentración, tiempo de almacenamiento y voltaje con que se separa la muestra.

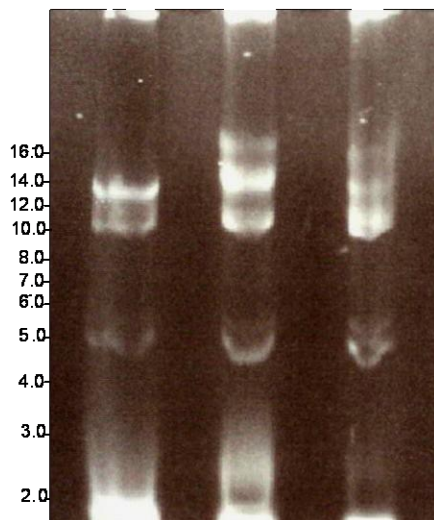


Figura 12. Patrón de plásmidos de diferentes cepas de *B. thuringiensis*. Carril 1, *B. thuringiensis* subsp *morrisoni* (LBIT269); carril 2, *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* (LBIT 287); carril 3, *B. thuringiensis* subsp. *kenya* (LBIT 404). Los tamaños de los plásmidos fueron determinados con un marcador de DNA superenrollado (Invitrogen).

8.6 Detección de fragmentos con probables genes de bacteriocinas de *B. thuringiensis*

Los plásmidos de *B. thuringiensis* subsp. *morrisoni* (LBIT 269) fueron digeridos con *HindIII* y su patrón comparado con los plásmidos sin digerir (Figura 13a). Una vez corroborada la digestión se procedió a transferirlo a una membrana de Nylon (Boehringer, Roche) y llevar a cabo una hibridación tipo Southern. Para realizar la hibridación se utilizó la sonda degenerada 5'-GATTGGACWTGYTGGWSWTG-3 la cual fue marcada con digoxigenina. Una vez realizada la detección por un método colorimétrico se observó la hibridación con dos fragmentos de tamaños entre 7 y 8 kb y con un plásmido de 16 kb (Figura 13b), sugiriendo la probable ubicación de genes que codifican bacteriocinas de *B. thuringiensis*.

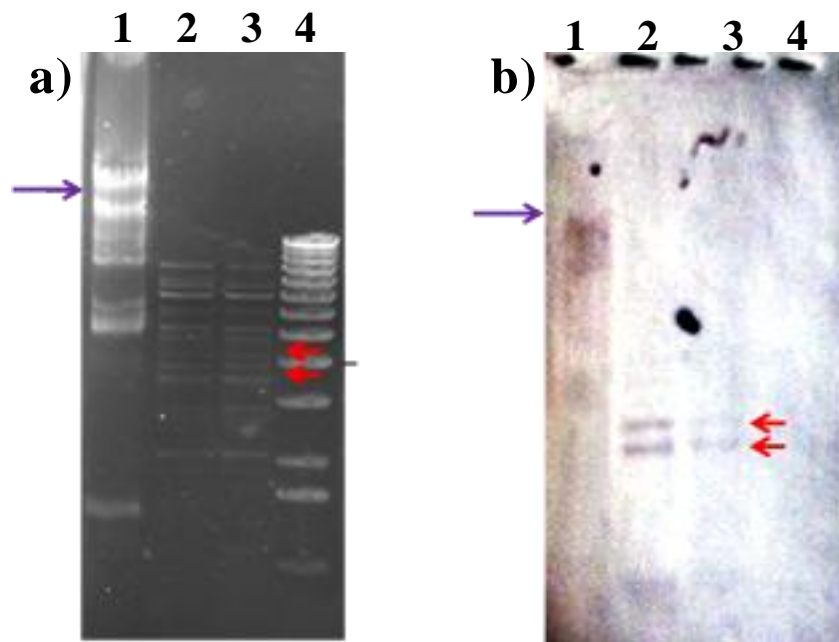


Figura 13. (a) Separación de plásmidos no digeridos y digeridos con *HindIII* de muestras obtenidas de *B. thuringiensis* subsp *morrisoni* (LBIT269). (b) hibridación tipo Southern. Carril 1, plásmidos sin digerir; carriles 2 y 3, plásmidos digeridos con *HindIII*; carril 4, marcador de peso molecular de 1 Kb (Invitrogen). Las flechas en la parte superior (dirigidas hacia la derecha) indican la posición de plásmidos que hibridaron con la sonda, mientras que las de la parte inferior (dirigidas hacia la izquierda) muestran la hibridación con fragmentos *HindIII* de ~ 7 y 8 Kb.

8.7 Búsqueda de una clona con actividad de bacteriocinas en un banco plásmídico

Los plásmidos de *B. thuringiensis* subsp. *morrisoni* (LBIT 269) y *B. thuringiensis* subsp *kurstaki* (LBIT 287) fueron digeridos con *HindIII*. Los fragmentos obtenidos fueron ligados al vector pBluescript KS+ e introducidos en *Escherichia coli* DH5 α F' para formar un minibanco plásmídico. Las colonias blancas fueron analizadas con base a su capacidad para producir proteínas de secreción capaces de inhibir el crecimiento de bacterias patógenas. Es importante comentar que *E. coli* DH5 α F' es incapaz de secretar algún compuesto que inhiba el crecimiento de las bacterias patógenas empleadas en este estudio. De esta forma las proteínas de secreción de cada transformantes fueron analizadas para

detectar su actividad antibacteriana inicialmente por el método fluorogénico empleando como bacteria indicadora a *B. cereus* y después por difusión en pozos contra otras bacterias. Cuando se realizó el método fluorogénico, para analizar de manera rápida diversas transformantes. Se seleccionaron tres transformantes, la T269 y T287-7, la primera fue obtenida del minibanco de *B. thuringiensis* subsp *morrisoni* 269 y la otra de *B. thuringiensis* subsp *kurstaki* 287. Las transformantes presentaron valores de fluorescencia relativas de 231 y 245 unidades de fluorescencia, respectivamente cuando fueron analizadas por el método fluorogénico desarrollado por De la Fuente y col. (2007). Estas transformantes fueron analizadas contra *B. cereus*, *L. innocua*, *S. xylosum*, *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae* y *Shigella flexneri* (Figura 14). Tal como puede observarse (Figura 14) la T269 presentó actividad inhibitoria contra *Shigella flexneri* y *S. xylosum* mientras que la T287-7 solamente contra *S. xylosum*.

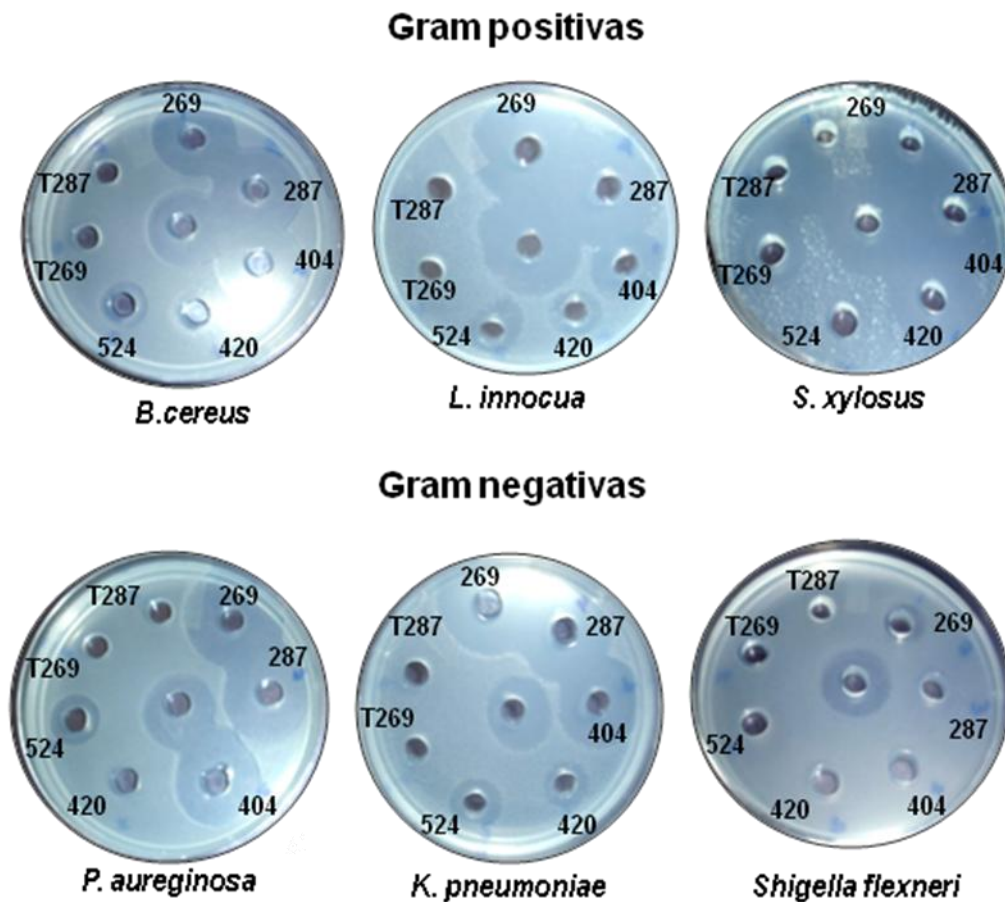


Figura 14. Actividad inhibitoria de las proteínas de secreción de dos transformantes comparada con aquella obtenida por las cepas silvestres. T269 y T287 (T287-1 o T287-7) son

transformantes obtenidas de un banco plasmídico de *B. thuringiensis* subsp *morrisoni* 269 y *B. thuringiensis* subsp *kurstaki* 287 (ver materiales y métodos). Los números 269, 287, 404, 420,524 indican muestras que contienen a la Morricina 269, Kurstacina 287, Kenyacina 404, Entomocina 420 y Tolworthcina 524, respectivamente. En el centro de cada una de las cajas se colocó la Morricina 269. En la parte inferior de las cajas Petri se indican las bacterias empleadas como bacterias indicadoras contra las cuales se realizaron las pruebas de actividad.

Con el propósito de determinar el tamaño del fragmento en la T287-7, se realizó una extracción de plásmidos y se digirió con *HindIII*, encontrándose que dicha cepa contiene un fragmento de ~ 5 Kb ligado al vector pBluescript KS + (Figura 15a), cual hibridó con la sonda degenerada 5'-GATTGGACWTGYTGGWSWTG-3 (Figura 15b).

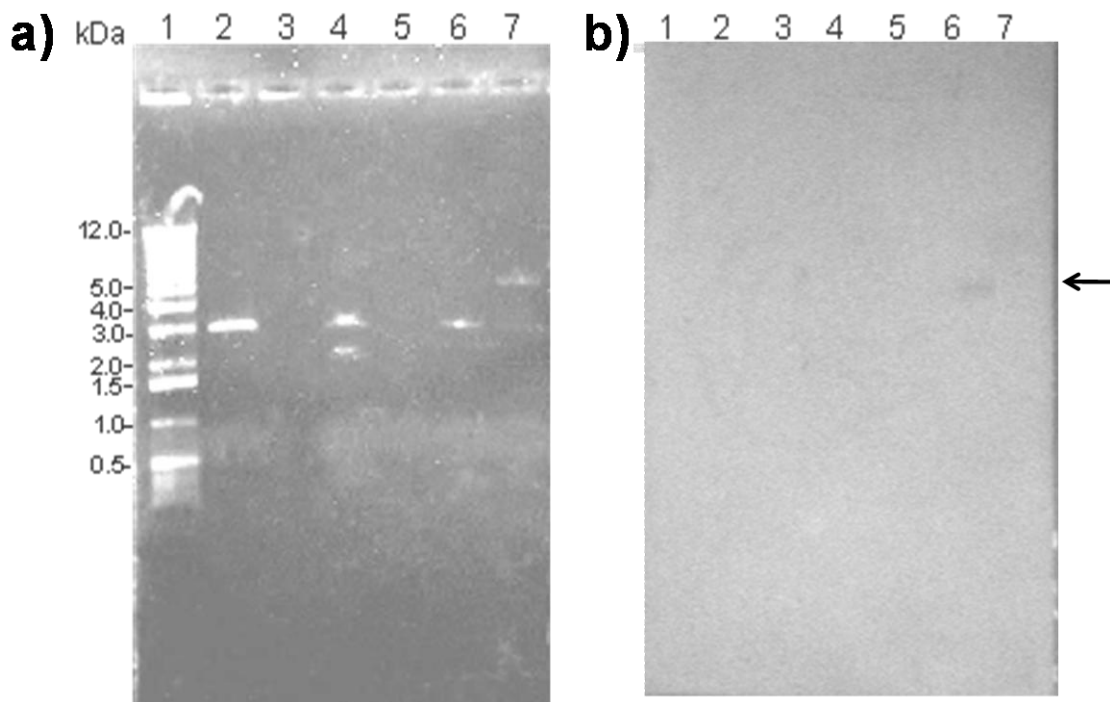


Figura 15. (a) Extracción de plásmidos de dos transformante obtenidas de un banco plasmídico *B. thuringiensis* subsp *kurstaki* (LBIT-287). (b) hibridación tipo Southern. Carril 1, escalera de 1 Kb (Invitrogen); carriles 2 y 6, vector pBluescript KS+; carril 4, transformante T287-1; carril 7, transformante T287-7. La flecha indica hibridación con un fragmento *HindIII* ~ 5 Kb.

El fragmento clonado en la transformante 287-7 fue mandado secuenciar al Laboratorio Nacional de Genómica para la Biodiversidad. Mediante el programa EditSeq (DNASTar) se localizaron los marcos de lectura de 7 proteínas, con masas moleculares de 3.0, 4.0, 4.7, 5.6, 8.2, 9.4, y 27.4. Cuando las secuencias de aminoácidos fueron

comparados con el banco de secuencias de proteínas contenidas en el NCBI (“National Center for Biotechnology Information”) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) mediante el programa “Protein Blast”; no se encontró identidad con ninguna bacteriocina reportada.

9 DISCUSIÓN

Uno de los aspectos mas interesantes de este estudio es que hemos demostrado que una bacteria (*Bacillus thuringiensis*), la cual es empleada a nivel mundial para el control de insectos, produce además de las proteínas Cry otros compuestos (bacteriocinas) que presentan una amplio rango de acción contra bacterias patógenas de interés en alimentos y hongos, teniendo de esta forma una gran potencial para poder ser empleadas como bioconservadores.

Antes de comenzar nuestros ensayos el primer paso fue producir las bacteriocinas morricina 269, kurstacina 287, kenyacina 404, entomocina 420, y tolworthcina 524 a partir de cinco cepas mexicanas de *B. thuringiensis*: *B. thuringiensis* subsp. *morrisoni* (LBIT 269), *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* (LBIT 287), *B. thuringiensis* subsp. *kenyae* (LBIT 404), *B. thuringiensis* subsp. *entomocidus* (LBIT 420) y *B. thuringiensis* subsp. *tolworthi* (LBIT 524), respectivamente (Barboza-Corona y col. 2007). Una vez producidas el siguiente paso era verificar si las bacteriocinas eran activas y tenían el peso molecular esperado. Para corroborar lo anterior, las muestras fueron colectadas y concentradas a partir de los cultivos donde se produjeron y se analizaron por electroforesis en geles de poliacrilamida bajo condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE). Tal como esperábamos, cada cepa sintetizó una bacteriocina con un peso molecular de ~10 KDa, las cuales fueron activas contra la cepa indicadora *B. cereus*. Después de esta confirmación todas las bacteriocinas producidas por Bt y la cepa indicadora de *B. cereus* se utilizaron para

determinar la actividad antimicrobiana contra patógenos de alimentos, bacterias de importancia clínica y diversos hongos.

Quizás uno de los aspectos más tediosos para estudiar las bacteriocinas es la determinación de la actividad mediante la prueba de difusión en pozos, técnica confiable pero que puede llevarse hasta tres días para arrojar un resultado. El tiempo es una gran limitante sobre todo si se están localizando nuevas bacteriocinas o transformantes en las cuales se busque la expresión de un gen que las codifique. Esta necesidad de contar con una metodología que cuantifique eficaz y rápidamente la actividad inhibitoria de las bacteriocinas nos motivó a desarrollar, estandarizar y probar un protocolo alternativo en la realización de las investigaciones. Con respecto a la estandarización del nuevo método para determinar rápidamente la actividad de las Bt-BLIS de Bt, este se basa en la capacidad que tiene la Berberina en fluorecer cuando se encuentra en interior celular de una bacteria dañada (cepa indicadora), lo que permitió aplicarla para establecer el daño celular causado en la cepa indicadora (*B. cereus*) por acción de las bacteriocinas. La berberina es un alcaloide que fluoresce intracelularmente a través de un mecanismo que aún se desconoce, sin embargo se sabe con certeza que la berberina fluoresce cuando se une a diferentes biomoléculas como DNA y glucosaminoglucanos (Reyes y col., 2004; Talwalkar y col., 2005). La molécula de la berberina es más pequeña que el DNA y puede entrar a las células a través de los poros o después de la ruptura de la membrana citoplasmática (Oscariz y Pisabarro, 2001), lo cuál permite establecer que el daño celular causado por la acción de las bacteriocinas provocó la localización intracelular y fluorescencia de la berberina. Lo anterior confirmó que nuestra metodología puede aplicarse en la búsqueda de bacteriocinas cuya actividad antimicrobiana se basa en la formación de poros o disrupción de la integridad de la membrana. Por otro lado, la alta correlación establecida entre los dos métodos para determinar la actividad de las bacteriocinas, indica que el método fluorogénico puede sustituir eficazmente al método de difusión en pozos, con la ventaja de requerir aproximadamente una hora para obtener resultados, en contraste a los ~3 días requeridos por el método de difusión.

Con relación a la actividad antibacteriana determinada en esta investigación los resultados demostraron que colectivamente las Bt-BLIS ensayadas tienen un amplio espectro de actividad antagónica contra bacterias Gram-positivas y Gram-negativas de importancia clínica. Datos actuales indicaban que las bacteriocinas de *B. thuringiensis* podían tener un espectro de actividad estrecho o moderado. Por ejemplo, la Thurincina (Favret y Yousten, 1989), Tochicina (Paik y col., 1997), Thuricina 7 (Cherif y col., 2001) y Thuricina 17 (Gray y col., 2006) tiene un espectro de actividad estrecho limitado a bacterias de la misma especie (Paik y col., 1997; Cherif y col., 2001) o contra un rango limitado de bacterias no relacionadas como *Streptococcus pyogenes* y *Listeria monocytogenes* (Cherif y col., 2001). Contrariamente la Entomocina 9 y la Thuricina S tienen un amplio espectro que incluye no solo a las especies de *Bacillus*, también contra *Lactococcus*, *Listeria monocytogenes*, *Pseudomona aeruginosa* (Cherif y col., 2003), *Salmonella enteritidis*, *Pseudomona putida* (Chehimi y col., 2007) y hongos incluyendo *Aspergillus nidulans* y *Fusarium gramineis* (Cherif y col., 2003). Recientemente se reportó que las Bt-BLIS producidas por cepas mexicanas de *B. thuringiensis* tienen actividad inhibitoria contra especies de *Bacillus*, *Listeria innocua*, *Enterococcus faecium* y *Vibrio cholerae* (Barboza-Corona y col., 2007).

En este trabajo los resultados obtenidos con respecto a la actividad de las Bt-BLIS nos permitieron expandir el conocimiento sobre su rango de acción, incluyendo a bacterias oportunistas y patógenas conocidas por ser agentes etiológicos de septicemia, heridas infecciosas, infecciones del tracto urinario (ITU), del tracto respiratorio bajo y tracto gastrointestinal (Prescott y col., 2005) (Tabla I). Entre estas bacterias encontramos aquellas que causan enfermedades en garganta y cuerpo cortado, fiebre escarlatina (*Streptococcus pyogenes*), y síndromes diarréicos y vómito (*Shigella flexneri*, *Salmonella sp.*, *E. coli*, y *Vibrio cholerae*) (Prescott y col., 2005). Previo a este estudio solamente la Entomocina 9 (Cherif y col., 2003) mostró actividad inhibitoria contra *Pseudomonas aeruginosa*, un agente nosocomial común en diversas enfermedades como neumonía, septicemia y ITU. En este trabajo demostramos que todas las Bt-BLIS estudiadas fueron activas contra *P. aeruginosa* (Tabla I). También demostramos que cada una de las cinco muestras de bacteriocinas impidió la esporulación en *Trichoderma sp.*, un micoparásito ampliamente

utilizado en control biológico. Es importante tomar en cuenta que la actividad antifúngica de diferentes especies de *Bacillus* se ha atribuido a la producción de zwittermicina A, un antibiótico aminopoliólico (Silo-Suh y col., 1998). Previamente se ha reportado que solamente una de las cepas utilizadas en esta investigación, la LBIT 269 contiene un probable gen zwittermicina A, lo cual se demostró través de amplificación por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (Barboza-Corona y col., 2007). Sin embargo, no podemos excluir la posibilidad de que alguna de las otras cepas contuvieran un gen homólogo a la zwittermicina A que no logró amplificarse con los oligonucleótidos utilizados en el estudio mencionado. Además es conocido que las quitinasas producidas por *B. thuringiensis* le confieren actividad antifúngica (Morales de la Vega y col., 2006). Por lo anterior, la incapacidad de las especies de *Trichoderma* para completar su ciclo de vital de crecimiento miceliar a la esporulación puede deberse a la presencia de la zwittermicina y/o a las quitinasas. Además, sería necesario realizar bioensayos con inhibidores de las quitinasa, para poder determinar con mayor exactitud si parte del efecto inhibitorio en el ciclo vital de las especies de *Trichoderma* es debido a las quitinasas. Por lo anterior no podemos asegurar que la actividad antifúngica es conferida específicamente por las bacteriocinas de *B. thuringiensis*.

Por otro lado, en este estudio también demostramos que las bacteriocinas de *B. thuringiensis* tienen actividad contra cepas de *S. aureus* aisladas de muestras de leche producida por vacas enfermas con mastitis bovina criadas en el estado de Michoacán. Esta bacteria Gram-positiva es difícil de controlar solamente con terapia antimicrobiana debido al incremento en la frecuencia de resistencia a los agentes antibióticos utilizados (Sandholm y col., 1990; Owens y col., 1997; Kerro-Dego y col., 2002). La prevalencia de la mastitis bovina durante este estudio fue de 51% (Barboza-Corona y col. 2009) mayor a la reportada previamente para esta misma región (29%) de Michoacán (Ochoa-Zarzosa y col., 2008). Estas diferencias podrían deberse a la heterogeneidad en el ganado ya que el estudio previo se realizó en diferentes rebaños. Sería conveniente que la evaluación de la susceptibilidad a antimicrobianos para el control de patógenos asociados a mastitis se realizara en las diferentes regiones lecheras ya que los patrones de resistencia a los antibióticos y la diversidad en las bacterias aisladas varían mucho de una región a otra. Se determinó que los

aislados de *S. aureus* muestran un alto nivel de resistencia a los antibióticos de la clase de penicilina y eritomicina (>74%), siendo la penicilina el antibiótico utilizado en este rebaño para el control de la mastitis y ejerce una alta presión en la bacteria provocando el desarrollo de resistencia. No obstante, todos los aislados mostraron alta sensibilidad a gentamicina y en menor proporción al trimetoprim y tetraciclina (Barboza-Corona y col., 2009), lo cuál concuerda con resultados obtenidos en estudios previos en otros rebaños de la misma región (López-Meza y col., 2006; Ochoa-Zarzosa y col., 2008).

Alternativamente, bacteriocinas de varias fuentes han mostrado actividad antibacteriana contra estafilococos y son candidatos prometedores para el tratamiento de *S. aureus* (Ryan y col., 1998; Capparelli y col., 2007), además recientemente demostramos que las bacteriocinas de *B. thuringiensis* obtenidas por inducción muestran actividad inhibitoria contra *S. aureus* ATCC 25923 (De la Fuente-Salcido y col., 2008). Específicamente en esta investigación demostramos que las cinco bacteriocinas producidas por *B. thuringiensis* sin inducción muestran actividad inhibitoria contra todos los aislados de *S. aureus* probados por el método de difusión en pozos. Esta observación sugiere que todas las cepas aisladas de vacas con mastitis muestran susceptibilidad a las cinco bacteriocinas probadas, confirmando su potencial aplicación como una alternativa para el control de mastitis cuando el agente etiológico es *S. aureus*. Es importante comentar la necesidad de nuevos experimentos con bacteriocinas de *B. thuringiensis* purificadas y normalizadas para comparar los resultados obtenidos en este trabajo. También es conveniente mencionar que a pesar de la susceptibilidad de los aislados a las cinco bacteriocinas probadas, no detectamos ninguna correlación entre los patrones de resistencia a antibióticos y las bacteriocinas, probablemente porque tienen diferentes mecanismos de acción (Cheen y Hoover, 2003). Si bien, encontramos que existen diferencias entre la acción inhibitoria de un gran número de aislados de *S. aureus*, encontramos que las bacteriocinas se pueden dividir en dos grupos de acuerdo a su actividad. En el primer grupo clasificamos a la Morricina 269 y a la Kurstacina 287, y en el segundo grupo a la Kenyacina 404, Entomocina 420 y a la Tolworthcina 524. Las bacteriocinas del primer grupo muestran una más alta actividad contra las cepas de *S. aureus* que las del segundo grupo. Interesantemente esta clasificación es similar a la descrita por Barboza-Corona y col.

(2008), los cuales también las clasificaron en dos grupos de acuerdo a sus características biofísicas, bioquímicas y propiedades antimicrobianas, las cual sugirió que las bacteriocinas pertenecientes a un mismo grupo podrían presentar la misma o similar identidad. Nuestros resultados concuerdan con otros estudios de bacteriocinas producidas por bacterias diferentes (*Lactococcus lactis*, *S. aureus*, *S. epidermidis* y *Streptococcus gallolyticus*) que tienen actividad antibacteriana contra patógenos asociados a mastitis (Ryan y col., 1998; Varella Coelho y col., 2007; Wu y col., 2007; Pieterse y col., 2008).

También se ha demostrado que bacterias como *Lactobacillus plantarum* NC8 requieren de la presencia de la bacteria indicadora para inducir la síntesis de la bacteriocina plantaricina NC8 (Maldonado y col., 2004), comportamiento contrario al observado en las cepas mexicanas de *B. thuringiensis* utilizadas en este trabajo las cuales producen las Bt-BLIS indistintamente en ausencia o presencia de un inductor. Claramente nuestros resultados también demuestran que la síntesis de todas las Bt-BLIS se incrementa significativamente por la presencia de la cepa sensible *B. cereus* 183. En las condiciones utilizadas en nuestros ensayos de autoinducción detectamos un pequeño incremento en la producción de bacteriocinas en el inicio del experimento, sin embargo este incremento podría no deberse a la presencia a un supuesto autoinductor. Es bien conocido que las bacteriocinas como la Nisina y la Substilisina actúan como autoinductores de su propia síntesis, también existen casos donde la liberación de feromonas peptídicas por quorum sensing no es suficiente para disparar o mantener la producción de bacteriocinas en cultivos muy diluídos (Kleerebezen y Quadri, 2001). Por lo tanto, no podemos excluir la posibilidad que las Bt-BLIS u otro péptido extracelular secretado por *B. thuringiensis* pueden actuar como un autoinductor mínimo.

Al inicio de esta investigación ensayamos la capacidad de tres cepas susceptibles de *B. cereus* para inducir la síntesis de las Bt-BLIS en co-cultivo, y seleccionamos a *B. cereus* 183 para los estudios posteriores por proporcionar el incremento más alto y reproducible para la síntesis de los péptidos microbianos. Respecto al incremento en la síntesis de Bt-BLIS en presencia de *B. cereus* 183, los resultados sugieren que la molécula inductora es una proteína de secreción ya que se observó que al tratar los sobrenadantes de cultivos de

B. cereus con proteinasa K se detienen los niveles de síntesis de las Bt-BLIS. Además, las preparaciones de células de *B. cereus* tratadas con calor y con proteinasa K incrementaron la síntesis de la Morricina 269 pero no de las demás Bt-BLIS, lo cuál sugiere que un componente de *B. cereus* 183 es especie-específico, resistente a la proteasa, y tiene la capacidad para incrementar la síntesis de la Morricina en *B. thuringiensis* subsp. *morrisoni* (LBIT 269). Lo anterior nos indica que se requieren estudios posteriores para identificar ampliamente el componente secretado o asociado a *B. cereus* 183 responsable del incremento de la síntesis de esta bacteriocina.

Por otro lado, realizamos también una investigación preliminar con el propósito de obtener información que nos permitiera la clonación de genes que codifican bacteriocinas sintetizadas por *B. thuringiensis* ya que hasta el momento no existen reportes sobre la clonación de ningún gen que codifique bacteriocinas producidas por esta bacteria. Primeramente se separaron los plásmidos de 3 cepas: *B. thuringiensis* subsp. *morrisoni* (LBIT269), *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* (LBIT 287) y *B. thuringiensis* subsp. *kenyae* (LBIT 404), encontrándose que las tres cepas a pesar de pertenecer a diferente serovariedad presentan un patrón de plásmidos muy similar, lo cual no implica que necesariamente plásmidos del mismo peso molecular contengan los mismos genes.

Cuando los plásmidos de LBIT269 fueron tratados con *HindIII* y puestos a hibridar con la sonda marcada con digoxigenina, detectamos hibridación con dos fragmentos (de entre 7 y 8 Kb) y con un plásmido de más de 16 Kb. Sin embargo, considerando que las condiciones de hibridación fueron muy suaves es difícil conocer con seguridad si en dichos fragmentos se localizan uno o más genes que codifiquen a la Morricina 269. Posteriormente se realizó un minibanco plasmídico en *E. coli* a partir de DNA obtenido de *B. thuringiensis* subsp. *morrisoni* (LBIT269) y *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* (LBIT 287). Las actividad de las proteínas de secreción de las transformantes fueron analizadas inicialmente contra *B. cereus* por el método fluorogénico desarrollado en el laboratorio. Se seleccionó *B. cereus* por ser la bacteria empleada comunmente como indicadora en todos los ensayos estandarizados en nuestro trabajo. Antes de iniciar el ensayo nos aseguramos que *E. coli* DH5 α por si sola era incapaz de tener algún efecto inhibitorio sobre *B. cereus*.

Posteriormente se seleccionaron dos transformantes, la T269 y la T287-7, las cuales presentaron los mayores niveles de fluorescencia mediante el método fluorogénico cuando fueron analizadas contra *B. cereus*. Cuando se evaluó la actividad inhibitoria de las proteínas de secreción de las transformantes detectamos que T269 inhibe a *S. xylosus* y *Shigella flexneri*, mientras que T287-7 solamente a *S. xylosus*. Lo anterior sugirió que ambas transformantes sintetizan péptidos antimicrobianos, las cuales pudieran ser codificadas por genes situados en plásmidos. Desafortunadamente por desperfectos técnicos sucedidos en el equipo donde T269 era almacenada ocasionó la pérdida de dicha transformante. Alternativamente se llevó a cabo un análisis de la construcción contenida en T287-7 observándose la clonación de un fragmento de ~5 Kb, el cual hibridó con la sonda degenerada diseñada a partir de N-terminal de dos bacteriocinas producidas por cepas de *B. thuringiensis* reportadas en otros trabajos (Gray y col., 2006). Cuando se obtuvo la secuencia del fragmento de 5 Kb se detectó la presencia de varios marcos de lectura, sin embargo cuando las proteínas deducidas fueron comparadas con el banco de proteínas contenidos en el Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI, www.ncbi.nlm.nih.gov) ninguna de ellas codificaba para ninguna bacteriocinas.

Finalmente, hemos desarrollado un nuevo método para detectar la presencia o producción de bacteriocinas de manera rápida, encontramos la forma de incrementar su producción en *B. thuringiensis* sin emplear Ingeniería Genética y detectamos fragmentos plasmídicos que pudieran contener genes que codifican bacteriocinas. Es importante comentar que los objetivos futuros de este trabajo deberían estar enfocados en identificar posibles proteínas responsables de incrementar la producción de las bacteriocinas de *B. thuringiensis* y clonar genes que codifiquen bacteriocinas con el propósito de estudiar factores involucrados en su regulación y expresión. Una de los objetivos futuros mas importantes deberá ser la sobreexpresión de los genes que codifican bacteriocinas de *B. thuringiensis* en cepas con el reconocimientos GRAS, de tal forma que se se produzcan bacteriocinas que se puedan aplicar de manera directa como bioconservadores en alimentos.

10 CONCLUSIONES

Estandarizamos un nuevo método fluorogénico para la determinación rápida de la actividad de las bacteriocinas de *B. thuringiensis*. El método fluorogénico fue eficaz para la rápida cuantificación de bacteriocinas que dañan la membrana celular. Esta nueva metodología fluorogénica proporciona resultados en una hora, e indudablemente puede sustituir al los métodos tradicionalmente utilizados para evaluar la actividad de las bacteriocinas, especialmente al método de difusión en pozos.

Las bacteriocinas producidas por cepas mexicanas de *B. thuringiensis* (Morricina 269, Kurstacina 287, Kenyacina 404, Entomocina 420 y Tolworthcina 524) tienen un amplio espectro de actividad contra diversas bacterias Gram-positivas y Gram-negativas consideradas como patógenas de importancia en alimentos y significancia clínica como *Shigella flexneri*, *E. coli*, *S. aureus*, *S. xylosum*, *Str. pneumoniae*, *S. pyogenes*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa*, *E. cloacae*. Demostramos que el espectro de actividad de las

bacteriocinas se extiende organismos microparásitos fúngicos como *Trichoderma* sp. Se demostró que 50 cepas de *S. aureus* aisladas de vacas enfermas con mastitis bovina son susceptibles a las bacteriocinas ensayadas. Ya que *S. aureus* es uno de los patógenos más comúnmente asociados a infecciones en bovinos, las bacteriocinas sintetizadas por cepas mexicanas pueden ser útiles como un método alternativo para el control de la mastitis bovina.

Podemos afirmar que las cepas mexicanas de *B. thuringiensis* pueden o no requerir la presencia de la cepa susceptible (indicadora) para sintetizarse, sin embargo, la presencia de la cepa *B. cereus* 183 incrementa significativamente la producción de todas las bacteriocinas y se reduce el tiempo requerido para una máxima producción. Comprobamos que el incremento en la síntesis de las bacteriocinas es ocasionada por proteínas termoresistentes que pueden ser de secreción o bien estar asociadas a la membrana de *B. cereus*. Este es el primer reporte sobre *B. thuringiensis* que demuestra el incremento de la síntesis de sus bacteriocinas por la acción de péptidos intra o extracelulares producidos por la cepa indicadora *B. cereus*, probablemente por un mecanismo de quorum-sensing.

Detectamos que *B. thuringiensis* subsp. *morrisoni* (LBIT 269), *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* (LBIT 287) y *B. thuringiensis* subsp. *kenyae* (LBIT 404) presentan patrones de plásmidos muy similares. Es probable que en las dos primeras cepas contengan genes que codifican bacteriocinas ubicados en fragmentos *HindIII* con tamaños de entre 5 y 7 Kb.

11 LITERATURA CITADA

- Abee, T., Krockel, L., Hill, C. 1995. Bacteriocins: mode of action and potentials in food preservation and control of food poisoning. *Int. J. Food Microbiol.* 28, 169-185.
- Abiouel, H., Valdivia, E., Martínez Bueno, M., Maqueda, M., Galvez, A. 2003. A simple method for semi-preparative-scale production and recovery of enterocin As-48 derived from *Enterococcus faecalis* subsp. *Liquefaciens* A-48-32. *J. of Microbiol. Methods.* 55(3): 599-605.
- Achemchem, F., Martínez Bueno, M., Abrini, J., Valdivia, E., Maqueda, M. 2005. *Enterococcus faecium* F-58, a bacteriocinogenic strain naturally occurring in Jben, a soft farmhouse goat's cheese made in Morocco. *J. Appl. Microbiol.* 99:141-150.
- Altena, K., Guder, A., Cramer, C., Bierbaum, G. 2000. Biosynthesis of the lantibiotic mersacidin: organization of a type B lantibiotic gene cluster. *Appl Environ Microbiol* 66:2565-71.

- Agaisse, H., Lereclus, D. 1994. Expression in *Bacillus subtilis* of the *Bacillus thuringiensis* cryIII_A toxin gene is not dependent on a sporulation-specific sigma factor and is increased in a spo0A mutant. *J. Bacteriol.* 176(15): 4734-4741
- Ahern, M., Verschueren, S., Van Sinderen, D. 2003. Isolation and characterisation of a novel bacteriocin produced by *Bacillus thuringiensis* strain B439. *FEMS Microbiology letters* 220: 127-131.
- Ahvenainen, R. 1996. New approaches in improving shelf-life of minimally processed fruits and vegetables. *Trends in Food Science and Technology* 7: 179-187.
- Alzamora, S.M., Tapia, M.S., Welti-Chanes, J. 1998. New strategies for minimal processing of foods: the role of multi-target preservation. *Food science and technology international* 4: 353-361.
- Alzamora, S.M., Tapia, M.S., Argaiz, A., Welti, J. 1993. Application of combined method technology in minimally processed fruits. *Food Research International* 26: 125-130.
- Anderssen, E.L, Diep, D.B., Nes, I.F., Eijsink, V.G.H., Nissen-Meijer, J. 1998. Antagonistic activity of *Lactobacillus plantarum* C11: 2 new 2-peptide bacteriocins, plantaricins EF and JK, and the induction factor plantaricin A. *Appl Environ Microbiol* 6:2269-72.
- Atra, R., Vatai, G., Molnar, E.B., Balint, A. 2005. Investigation of ultra- and nanofiltration for utilization of whey protein and lactose. *Journal of Food Engineering.* 67 (3): 325-332.
- Axelsson L, Holck A. 1995. The genes involved in production of and immunity to sakacin A, a bacteriocin from *Lactobacillus sake* Lb706. *J Bacteriol* 177:2125-37.
- Aymerich, M.T., Garriga, M., Ylla, J., Vallier, J., Monfort, J.M., Hugas, M. 2000. Application of enterocins as biopreservatives against *Listeria innocua* in meat products. *J. Food Prot.* 63: 721–726.
- Aznar, R., Chenoll, E. 2006. Intraspecific diversity of *Lactobacillus curvatus*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus sakei*, and *Leuconostoc mesenteroides* associated with vacuum-packed meat product spoilage analyzed by randomly amplified polymorphic DNA PCR. *J. Food Prot.* 69: 2403–2410.
- Banerjee, S., Hansen, J.N. 1988. Structure and expression of a gene encoding the precursor of subtilin, a small protein antibiotic. *J. Biol. Chem.* 263:9508-14.
- Barboza-Corona, J.E., Gutierrez-Acosta, O.B., Imperial-Cervantes, M., Bideshi, D.K., De la Fuente-Salcido, N., Bautista-Justo, M., Salcedo-Hernandez, R., 2008. Generation

- of antibacterial oligosaccharides derived from chitin using heterologous endochitinase synthesized in *Escherichia coli*. *J. of Applied Microbiol.* 105(5): 1511-1520.
- Barboza-Corona, J.E., Vázquez-Acosta, H., Bideshi, D.K., Salcedo-Hernández, R., 2007. Bacteriocin-like inhibitor substances produced by Mexican strains of *Bacillus thuringiensis*. *Arch. Microbiol.* 187: 117–126.
- Barboza-Corona, J.E., Nieto-Mazzocco, E., Velázquez-Robledo, R., Salcedo-Hernández, R., Bautista-Justo, M., Jiménez, B., Ibarra, J.E. 2003. Cloning, Sequencing, and Expression of the Chitinase Gene *chiA74* from *Bacillus thuringiensis* *Applied. and Environmental Microbiology.* 62(2): 1023-1029.
- Bravo, A., Sarabia, S., Lopez, L., Ontiveros, H., Abarca, C., Ortiz, A., Ortiz, M., Lina, L., Villalobos, F. J., Peña, G., Nuñez-Valdez, M. E., Soberón, M., Quintero, R. 1998. Characterization of *cry* genes in a Mexican *Bacillus thuringiensis* strain collection. *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 4965-4972.
- Barefoot, S.F., Klaenhammer, T.R. 1984. Purification and characterization of *Lactobacillus acidophilus* bacteriocin lactacin B. *Antimicrob. Agents Chemother.* 26: 328-334.
- Barefoot, S.F., Klaenhammer, T.R. 1983. Detection and activity of lactacin B, a bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 45:1808–1815.
- Barefoot, S.F., Nettles, C.G., Chen, Y.R. 1994. Lactacin B, a bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus*, p. 353–376. *In* L. de Vuyst and E. J.Vandamme (ed.), *Bacteriocins of lactic acid bacteria: microbiology, genetics and applications*. Blackie Academic and Professional, London, United Kingdom.
- Barefoot, S.F., Chen, Y.R. Hughes, T.A., Bodine, A., Shearer, B.M., Hughes, M. D. 1994. Identification and purification of a protein that induces production of the *Lactobacillus acidophilus* bacteriocin lactacin B. *Appl. Environ. Microbiol.* 60:3522–3528.
- Barefoot, S.F., Klaenhammer, T.R. 1983. Detection and activity of lactacin B, a bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 45(6): 1808–1815.
- Bari, M.L., Ukuku, D.O., Kawasaki, T., Inatsu, Y., Isshiki, K., Kawamoto, S. 2005. Combined efficacy of nisin and pediocin with sodium lactate, citric acid, phytic acid, and potassium sorbate and EDTA in reducing the *Listeria monocytogenes* population of inoculated fresh-cut produce. *J. Food Prot.* 68: 1381–1387.
- Barreteau, H., Delattre, C., Michaud, P. 2006. Oligosaccharides as Food Additives. *Food Technol. Biotechnol.* 44 (3): 323-333.

- Battisti, L., Green, B.D., Thorne, C.B. 1985. Mating system for transfer of plasmids among *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*, and *Bacillus thuringiensis*. *J. Bacteriol.* 162(2):543–550.
- Ben Embarek, P.K. 1994. Presence, detection and growth of *Listeria monocytogenes* in seafoods: a review. *Int. J. Food Microbiol.* 23: 17–34.
- Bennik, M.H.J., van Overbeek, W., Smid, E.J., Gorris, L.G.M. 1999. Biopreservation in modified atmosphere stored mungbean sprouts: the use of vegetable-associated bacteriocinogenic lactic acid bacteria to control the growth of *Listeria monocytogenes*. *Lett. Appl. Microbiol.* 28: 226–232.
- Bergère, J.L., Lenoir, J. 2000. Cheese manufacturing accidents and cheese defects. In *Cheesemaking: From Science to Quality Assurance*, 2nd ed., 477–518. Eck, A., and Gillis, J. C., eds., Intercept Ltd., London.
- Beuchat, L.R. 1996a. *Listeria monocytogenes*: Incidence on vegetables. *Food Control.* 7:223-228.
- Berry, C., O'Neil, S., Ben-Dov, E., Jones, A.F., Murphy, L., Quail, M.A., Holden, M.T.G., Harris, D., Zaritsky, A., Parkhill, J. 2002. Complete sequence and organization of pBtoxis, the toxin-coding plasmid of *Bacillus thuringiensis* subsp *israeliensis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 68: 5082–5095.
- Bhunja, A.K., Johnson, M.C., Ray, B., 1988. Purification, characterization and antimicrobial spectrum of a bacteriocin produced by *Pediococcus acidolactici*. *J. Appl. Bacteriol.* 65: 261–268.
- Bierbaum, G., Götz, F., Peschel, A., Kupke, T., van de Kamp, M., Sahl, H-G. 1996. The biosynthesis of the lantibiotics epidermin, gallidermin, Pep5 and epilacin K7. *Antonie van Leeuwenhoek.* 69:119-27.
- Bierbaum, G., Brötz, H., Koller, K-P., Sahl, H-G. 1995. Cloning, sequencing and production of the lantibiotic mersacidin. *FEMS Microbiol Lett* 127:121-126.
- Bierbaum, G., Sahl, H.G. 1987. Autolytic system of *Staphylococcus simulans* 22: influence of cationic peptides on activity of N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase. *J. Bacteriol.* 169(12):5452–5458.
- Bierbaum, G., Sahl, H.G. 1985. Induction of autolysis of *staphylococci* by the basic peptide antibiotics Pep5 and nisin and their influence on the activity of autolytic enzymes. *Arch. Microbiol.* 141: 249-254.

- Biswas, S. R., Ray, P., Johnson, M.C., Ray, B. 1991. Influence of growth conditions on the production of a bacteriocin, pediocin AcH, by *Pediococcus acidilactici* AcH. *Appl. Environ. Microbiol.* 57:1265–1267.
- Borch, E., Kant-Muermans, M.L., Blixt, Y. 1996. Bacterial spoilage of meat and cured meat products. *Int. J. Food Microbiol.* 33: 103–120.
- Broadbent, J. R., C. Chou, K. Guillies, y J. K. Kondo. 1989. Nisin inhibits several gram-positive, mastitis-causing pathogens. *J. Dairy Sci.* 72:3342-3345.
- Bruno, M.E.C., Montville, T. 1993. Common mechanistic action of bacteriocins from lactic acid bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 59: 3003-3010.
- Bruno, S.E., Kaiser, A., Montville, T.J. 1992. Depletion of proton motive force by nisin in *Listeria monocytogenes* cells. *Appl. Environ. Microbiol.* 58:2255-2259.
- Brurberg, M.B., Nes, I.F., Eijsink, V.G.H. 1997. Pheromone-induced production of antimicrobial peptides in *Lactobacillus*. *Mol. Microbiol.* 26: 347–360.
- Bukhtiyarova, M., Yang, R., Ray, B. 1994. Analysis of the pediocin AcH gene cluster from plasmid pSMB74 and its expression in a pediocin-negative strain. *Appl Environ Microbiol.* 60:3405-8.
- Buzby, J.C., Roberts, T., Jordan, T., Lin, C.T., MacDonald, J.M. 1996. (Eds) *Bacterial Foodborne Diseases: Medical Costs and Productivity Losses*, Agricultural Economic Report Number 741, US Department of Agriculture, Washinton, DC.
- Cai, Y., Ng, L.K., Farber, J.M. 1997. Isolation and characterization of nisin-producing *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* from bean sprouts. *J. Appl. Microbiol.* 83: 499–507.
- Calderón-Miranda, M.L., Barbosa-Cánovas, G.V., Swanson, B.G. 1999a. Inactivation of *Listeria innocua* in liquid whole egg by pulsed electric fields and nisin. *Int. J. Food Microbiol.* 51: 7–17.
- Calderón-Miranda, M.L., Barbosa-Cánovas, G.V., Swanson, B.G. 1999b. Inactivation of *Listeria innocua* in skim milk by pulsed electric fields and nisin. *Int. J. Food Microbiol.* 51: 19–30.
- Callewaert, R., DeVuyst, L. 1999. Expanded bed adsorption as a unique unit operation for the isolation of bacteriocins from fermentation media. *Bioseparation* 8: 159–168.
- Callewaert, R., Holo, H., Devreese, B., Van Beumen, J., Nes, I., 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.

- Campos, J.A. 2002. Cultivos probióticos y protectores. Propiedades funcionales (nutraceútics) de valor agregado en los derivados lácteos. Lácteos y Cárnicos Mexicanos. Jun-Jul. pág. 26-37.
- Cao, L.T., Wu, J.Q., Xie, F., Hu, S.H., Mo, Y. 2007. Efficacy of Nisin in Treatment of Clinical Mastitis in Lactating Dairy Cows. *J. Dairy Sci.* 90(3): 980-985.
- Capparelli, R., Ventimiglia, I., Palumbo, D., Nicodemo, D., Salvatore, P., Amoroso, M.G., Iannaccone, M., 2007. Expression of recombinant puroindolines for the treatment of staphylococcal skin infections (*acne vulgaris*). *J. Biotechnol.* 128: 606–614.
- Carlson, J.R. 1996. Olfaction in *Drosophila*: From odor to behavior. *Trends Genet.* 12(5): 175-180
- Carlson, C.R., Caugant, D.A., Kolstø, A-B. 1994. Genotypic Diversity among *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* Strains. *Appl Environ Microbiol.* 60(6): 1719-1725.
- Carlson, C.R., Kolstø, AB. 1993. A complete physical map of *Bacillus thuringiensis* chromosome. *J. Bacteriol.* 175:1053-1060.
- Carolissen-Mackay, V., Arendse, G., Hastings, J. W. 1997. Purification of bacteriocins of lactic acid bacteria: problems and pointers. *Int. J. Food Microbiol.* 34:1-16.
- Chehimi, S., Delalande, F., Sablé, S., Hajlaoui, M.R., Van Dorsselaer, A., Limam, F., Pons, A.M. 2007. Purification and partial amino acid sequence of thuricin S, a new anti-*Listeria* bacteriocin from *Bacillus thuringiensis*. *Can. J. Microbiol.* 53(2):284-290.
- Cherif, A., Rezgui, W., Raddadi, N., Daffonchio, D., Boudabous, A. 2008. Characterization and partial purification of entomocin 110, a newly identified bacteriocin from *Bacillus thuringiensis* subsp. *Entomocidus* HD110. *Microbiological Research.* 163(6): 684-692.
- Cherif, A., Chehimi, S., Limem, F., Hansen, B.M., Hendriksen, N.B., Daffonchio, D., Boudabbous, 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., Ouzari, H., Daffonchio, D., Cherif, H., Ben Slama, K., Hansen, A., Jaous, S., Boudabous, A. 2001. Thuricin 7: a novel bacteriocin produced by *Bacillus thuringiensis* BMG1.7, a new strain isolated from soil. *Letter in applied Microbiology.* 32: 243-247.

- Cintas, L.M., Casaus, M.P., Herranz, C., Nes, I.F., Hernández, P.E. 2001. Review: Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria. *Food Science Technology International*. 7(4): 281-305.
- Cliver, D.O. 1997. Foodborne viruses. In: Doyle MP, Beuchat LR, Montville TJ (ed.) *Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers*, p. 437-446. Washington, D.C., American Society for Microbiology.
- Cotter, P.D., Hill, C., Roos, P. 2005. **Bacteriocins: developing innate immunity for food**. 2005. *Nature Reviews Microbiology*. 3:777-788.
- Crickmore, N. 2005. Using worms to better understand how *Bacillus thuringiensis* kills insects. *Trends in Microbiology*. 13(8): 347-350.
- Crickmore, N., Zeigler, D.R., Feitelson, J., Schnepf, E. Van Rie, J., Lereclus, D., Baum, J., Dean, D.H. 1998. Revision of the nomenclature for the *Bacillus thuringiensis* pesticidal crystal proteins. *Microbiol. Mol. Rev.* 62:807-813
- Chen, H., Hoover, D.G. 2003. Bacteriocins and their Food Applications. *Comprehensive reviews in Food Science and Food Safety*. 2: 82-100.
- Chenoll, E., Macian, M.C., Elizaquivel, P., Aznar, R. 2007. Lactic acid bacteria associated with vacuum-packaged cooked-meat product spoilage: population analysis by rDNA-based methods. *J. Appl. Microbiol.* 102: 498–508.
- Chikindas, M.L., MJ García –Garcera, A.J.M., Driesessen, A.M., Ledebøer, Nissen-Mejer, J., Nes, I.F., Abee, T., Konings, W.N., Venema, G. 1993. PediocinPA-1, a Bacteriocin from *Pediococcus acidilactici* PAC1.0 Forms Hydrophilic Pores in the Cytoplasmic Membrane of Target Cells. *Appl. Environ. Microbiol.* 59: 3577-3584.
- Daba, H., Pandian, S., Gosselin, J.F., Simard, R.E., Huang, J., Lacroix, C. 1991. Detection and activity of bacteriocin produced by *Leuconostoc mesenteroides*. *Appl. Environ. Microbiol.* 57: 3450-3455.
- Dalhammar, G., Steiner, H. 1984. Characterization of inhibitor A, a protease from *Bacillus thuringiensis* which degrades attacins and cecropins, two classes of antibacterial proteins in insects. *Eur. J. Biochem.* 139: 247-252.
- Davies, E.A., Delves-Broughton, J. 1999. Nisin. In *Encyclopedia of Food Microbiology*, 191–198. Robinson, R., Batt, C., and Patel, P., eds., Academic Press, London.
- Davies, E.A., Bevis, H.E., Delves-Broughton, J. 1997. The use of the bacteriocin, nisin, as a preservative in ricotta-type cheeses to control the food-borne pathogen *Listeria monocytogenes*. *Lett. Appl. Microbiol.* 24:343-6.

- Delgado, A., Brito, D., Fevereiro, P., Tenreiro, R., Peres, C., 2005. Bioactivity quantification of crude bacteriocin solutions. *J. Microbiol. Methods* 62: 121–124
- Demain, A. L., 1998. Induction of microbial secondary metabolism. *Internat. Microbiol.* 1: 259-264.
- De Buyser, M. L., Dufour, B., Maire, M., Lafarge, V. 2001. Implication of milk and milk products in food-borne diseases in France and in different industrialised countries. *Int. J. Food Microbiol.* 67:1–17.
- De la Fuente-Salcido, N., Alanís-Guzmán, M.G., Bideshi, D.K., Salcedo-Hernández, R., Bautista-Justo, M., Barboza-Corona, J.E. 2008. Enhanced synthesis and antimicrobial activities of bacteriocins produced by Mexican strains of *Bacillus thuringiensis*. *Archives of Microbiology.* 190(6):633-640.
- De la Fuente-Salcido, N., Salcedo-Hernández, R., Alanis-Guzmán, M.G., Bideshi, D.K., Barboza-Corona, J.E. 2007. A new rapid fluorogenic method for measuring bacteriocin activity. *J. Microbiol.Meth.* 70(1):196–199.
- De Vuyst, L., Callewaert, R., 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., Vandamme, E.J. 1994. Antimicrobial potential of lactic acid bacteria. Pp. 91-142. In: L. De Vuyst, and E. J. Vandamme (Eds.), *Bacteriocins of lactic acid bacteria*. Chapman & Hall, London.
- deVos, W.M., Kuipers, O.P., van der Meer, J.R., Siezen, R.J. 1995. Maturation pathway of nisin and other lantibiotics: post-translationally modified antimicrobial peptides exported by grampositive bacteria. *Mol Microbiol* 17:427-37.
- Diep, D.B., Axelsson, L., Grefslí, C., Nes, I.F. 2000. The synthesis of the bacteriocin sakacin A is a temperature-sensitive process regulated by a pheromone peptide through a three-component regulatory system. *Microbiology* 146:2155–2160.
- Diep, D.B., Havarstein, L.S., Nes, I.F.. 1996. Characterization of the locus responsible for the bacteriocin production in *Lactobacillus plantarum* C11. *J. Bacteriol.* 178:4472–4483.
- Diep, B.D., Havarstein, L.S., Nes, I.F. 1995. A bacteriocin-like peptide induces bacteriocin synthesis in *L. plantarum* C11. *Mol. Microbiol.* 18:631-639.
- Diep, D.B., Havarstein, L.S., Nissen-Meyer, J., Nes, I.F. 1994. The gene encoding plantaricin A, a bacteriocin from *Lactobacillus plantarum* C11, is located on the

- same transcription unit as an agr-like regulatory system. *Appl. Environ. Microbiol.* 60:160-166.
- Donovan, W.P., Tan, Y., Slaney, A.C. 1997. Cloning of the nprA gene for neutral protease A of *Bacillus thuringiensis* and effect of in vivo deletion of nprA on insecticidal Bcrystal protein. *Appl. Environ. Microbiol.* 63(6): 2311-2317.
- Dufour, A., Rince, A., Uguen, P., LePennec, J.P. 2000. IS1675, a novel lactococcal insertion element, forms a transposon-like structure including the lactacin 481 lantibiotic operon. *J. Bacteriol.* 182:5600-5605.
- Ebersold, H.R., Lüthy, P., Geiser, P., Ettliger, L. 1978. The action of the dendotoxin of *Bacillus thuringiensis*: an electron microscope study. *Experientia* 34: 1672.
- Eijsink, V.G.H., Skeie, M., Middelhoven, P.H., Brurberg, M.B., Nes, I.F. 1998. Comparative studies of class IIa bacteriocins of lactic acid bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 64:3275-3281.
- Einarsson, H., Lauzon, H. L. 1995. Biopreservation of brined shrimp (*Pandalus borealis*) by bacteriocins from lactic acid bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 61: 669–676.
- Elegado, F., Guerra, M., Macayam, R., Mendoza, H., Lirazan, M. 2005. Spectrum of bacteriocina activity of *Lactobacillus plantarum* BS and fingerprinting by RAPD-PCR. *Int. J. of Food Microbiol.* 95: 11-18.
- Elotmani, F., Assobhei, O. 2004. In vitro inhibition of microbial flora of fish by nisin and lactoperoxidase system. *Lett. Appl. Microbiol.* 38: 60-65.
- Ennahar, S., Deschamps, N., Richard, J. 2000a. Natural variation in susceptibility of *Listeria* strains to class IIa bacteriocins. *Current Microbiol.* 41:1-4.
- Ennahar, S., Sashihara, T., Sonomoto, K., Ishizaki, A. 2000b. Class IIa bacteriocins: biosynthesis, structure and activity. *FEMS Microbiol. Rev.* 24:85-106.
- Ennahar, S., Sashihara, T., Sonomoto, K., Ishizaki, A. 2000. Class IIa bacteriocins: biosynthesis, structure and activity. *FEMS Microbiol. Rev.* 24: 85–106.
- Ennahar, S., Asou, Y., Zendo, T., Sonomoto, K., Ishizaki, A. 2001. Biochemical and genetic evidence for production of enterocins A and B by *Enterococcus faecium* WHE 81. *J. Food Microbiol.* 70: 291-301.
- Favret, M.E., Yousten, A.A. 1989. Thuricin: the bacteriocin produced by *Bacillus thuringiensis*. *J. Invertebr. Pathol.* 53(2): 206-216.
- Feitelson J. S., J. Payne y L. Kim. 1992. *Bacillus thuringiensis*: insects and beyond. *Bio/technology* 10:271-275.

- Feitelson J.S. 1993. The *Bacillus thuringiensis* family tree. p 63-71 En: L.Kim (ed) Advanced engineered pesticides. Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y.
- Fricourt, B.V., Barefoot, S.F., Testin, R.F., Hayasaka, S.S.. 1994. Detection and activity of plantaricin F, an antibacterial substance from *Lactobacillus plantarum* BF001 isolated from processed channel catfish. *J.Food Prot.* 57:698–702.
- Fleming, D.W., Cochi, S.L., MacDonald, K.L., Brondum, J., Hayes, P.S., Plikaytis, B.D., Holmes, M.B., Audurier, A., Broome, C.V., Reingold, A.L. 1985. Pasteurized milk as a vehicle of infection in an outbreak of listeriosis. *New England J. Med.* 312, 404-7.
- Fontana, M.B.C, Freire de Bastos, M.C., Brandelli, A. 2006. Bacteriocins Pep5 and Epidermin Inhibit *Staphylococcus epidermidis* Adhesion to Catheters. *Current Microbiology.* 52(5): 330-353.
- Foulquié-Moreno, M.R., Sarantinopoulos, P., Tsakalidou, E., De Vuyst, L. 2006. The role and application of *enterococci* in food and health. *Int. J. Food Microbiol.* 106: 1–24.
- Foulquié-Moreno, M.R., Callewaert, R., Devreese, B., Van Beeumen, J., De Vuyst, L. 2003. Isolation and biochemical characterisation of enterocins produced by enterococci from different sources. *J. Appl. Microbiol.* 94: 214–229.
- Foulquié-Moreno, M.R., Rea, M.M., Cogan, T.M., De Vuyst, L. 2003. Applicability of bacteriocin-producing *Enterococcus faecium* as a co-culture in a Cheddar cheese manufacture. *Int. J. Food Microbiol.* 81: 73-84.
- Foulquié-Moreno, M.R., Rea, M.C., Cogan, T.M., De Vuyst, L. 2002. Applicability of a bacteriocin-producing *Enterococcus faecium* as a co-culture in cheddar cheese manufacture. *Int. J. Food Microbiol.* 81: 73–84.
- Foulquié-Moreno, M.R., Leisner, J.J., Tee, L.K., Ley, C., Radu, S., Rusul, G., Vancanneyt, M., De Vuyst, L. 2002. Microbial analysis of Malaysian tempeh, and characterization of two bacteriocins produced by isolates of *Enterococcus faecium*. *J. Appl. Microbiol.* 92: 147–157
- Foulquié-Moreno, M.R., Callewaert, R., De Vuyst, L. 2001. Isolation of bacteriocins through expanded bed adsorption using a hydrophobic interaction medium. *Bioseparation*; 10:45–50.
- Galitsky, N., Cody, V., Wojtczak, A., Ghosh, D., Luft, J.R., Pangborn, W., English, L. 2001. Structure of the insecticidal bacterial δ -endotoxin Cry3Bb1 of *Bacillus thuringiensis*. *Acta Cryst.* 57: 1101-1109.
- Galvez, A., Valdivia, E., Martinez-Bueno, M., Maqueda, M. 1990. Induction of autolysis in *Enterococcus faecalis* S-47 by peptide AS-48. *J Appl Bacteriol.* 69: 406–413.

- Gálvez, A., Maqueda, M., Martínez-Bueno, M., Valdívía, E. 1991. Permeation of bacterial cells, permeation of cytoplasmic and artificial membrane vesicles, and channel formation on lipid bilayers by peptide antibiotic AS-48. *J. Bacteriol.* 173:886-892.
- Garriga, M., Aymerich, M.T., Costa, S., Monfort, J.M., Hugas, M. 2002. Bactericidal synergism through bacteriocins and high pressure in a meat model system during storage. *Food Microbiol.* 19: 509–518.
- Geissler S, Götz F, Kupke T. 1996. Serine protease EpiP from *Staphylococcus epidermidis* catalyzes the processing of the epidermin precursor peptide. *J Bacteriol* 178:284-8.
- Georgalaki, M.D., VandenBerghe, E., Kritikos, D., Devreese, B., Van Beeumen, J., Kalantzopoulos, G., De Vuyst, L., Tsakalidou, E. 2002. Macedocin, food-grade lantibiotic produced by *Streptococcus macedonicus* ACA-DC 198. *Appl. Environ. Microbiol* 68:5891–5903
- Giraffa, G. 1995. Enterococcal bacteriocins: their potential as anti-*Listeria* factors in dairy technology. *Food Microbiol.* 12: 291–299.
- Giraffa, G., Picchioni, N., Neviani E., and Carminati, D. 1995. Production and stability of an *Enterococcus faecium* bacteriocin during Taleggio cheesemaking and ripening. *Food Microbiol.* 12: 301–307.
- Gram, L., Ravn, L., Rasch, M., Bruhn, J.B., Christensen, A.B., Givskov, M. 2002. Food spoilage—interactions between food spoilage bacteria. *Int. J. Food Microbiol.* 78: 79-97.
- Gratia, A. 1925. *C R Seanc. Soc. Biol.* 93:1040-1041, in Mayr-Harting and others. 1972.
- Gratia, A., Fredericq, P. 1946. *C R Seanc. Soc. Biol.* 140:1032-1033, in Mayr-Harting and others.
- Grande, M.J., Lucas, R., Abriouel, H., Ben Omar, N., Maqueda, M., Martínez-Bueno, M., Martínez-Cañamero, M., Valdivia, E., Gálvez, A. 2005a. Control of *Alicyclobacillus acidoterrestris* in fruit juices by enterocin AS-48. *Int. J. Food Microbiol.* 104: 289–297.
- Grau, F.H., Vanderlinde, P.B. 1992. Occurrence, numbers and growth of *Listeria monocytogenes* on some vacuum-packaged processed meats. *J. Food Prot.* 55: 4-7.
- Gray, E.J., Lee, K.D., Souleimanov, A.M., Di Falco, M.R., Zhou, X., Ly, A., Charles, T.C., Driscoll, B.T., Smith, D.L. 2006a. A novel bacteriocin, thuricin 17, produced by plant growth promoting rhizobacteria strain *Bacillus thuringiensis* NEB17: isolation and classification. *J. Appl. Microbiol.* 100:545–554.

- Gray, E.J., Di Falco, M.R., Souleimanov, A., Smith, D.L. 2006b. Proteomic analysis of the bacteriocin thuricin 17 produced by *Bacillus thuringiensis* NEB 17. FEMS Microbiol. Lett. 255:27–32
- Grochulski, P., Masson, L., Borisova, S., Pusztai-Carey, M., Schwartz, J.L., Brousseau, R. y M. Cygler. 1995. *Bacillus thuringiensis* CryIA (a) Insecticidal Toxin: Crystal Structure and Channel Formation. J. of Mol. Microb. 254(3):447-464.
- Gutierrez, J., Criado, R., Citti, R., Martin, M., Herranz, C., Nes, I.F., Cintas, L.M., Hernández, P.E. 2005. Cloning, production and functional expression of enterocin P, a *sec*-dependent bacteriocins produced by *Enterococcus faecium* P-13, in *E. coli*. Intern. J. Food Microbiol. 103 (3):239-250.
- Guder A, Wiedemann I, Sahl H.-G. 2000. Post-translationally modified bacteriocins-the lantibiotics. Biopolymers 55:62-73.
- Hardy, K.G. 1982. Bacteriocins. In: Experimental Microbial Ecology Blackwell Scientific Publishers Edinburgh.
- Hauben, K., Wuytack, E., Soontjens, C.C.F., Michiels, C.W.. 1996. High-pressure transient sensitization of *Escherichia coli* to lysozyme and nisin by disruption of outer membrane permeability. J. Food Prot. 59: 350-355.
- Helgason, E., Okstad, O. A., Caugant, D. A., Johansen, H. A., Fouet, A., Mock, M., Hegna, I. and Kolsto, A-B. 2000. *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*, and *Bacillus thuringiensis*- One species on the basis of genetic evidence. Appl. Environ. Microbiol. 66, 2627-2630.
- Hechard, Y., Sahl, H.G. 2002. Mode of action of modified and unmodified bacteriocins from Gram-positive bacteria. *Biochimie*. 84(5-6):545-57.
- Hirsch, A., Grinsted, E., Chapman, H. R., Mattick, A.T.R. 1951. A note on the inhibition of an anaerobic spore former in Swiss-type cheese by a nisin-producing *Streptococcus*. J. Dairy Res. 18: 205–206.
- Holo, H., Nilssen, O., Nes, I.F. 1991. Lactococcin A, a new bacteriocin from *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*: Isolation and characterization of the protein and its gene. J Bacteriol. 173:3879-87.
- Holzappel, W.H., Geisen, R., Schillinger, U. 1995. Biological preservation of foods with reference to protective cultures bacteriocins and food grade enzymes. Int. J. Food Microbiol. 24:343-362.
- Hugas, M., Garriga, M., Pascual, M., Aymerich, M.T., Monfort, J.M. 2002. Food Microbiology 19: 519-528.

- Jack, R.W., Tagg, J.R., Ray, B. 1995. Bacteriocins of Gram-positive bacteria. *Microbiol. Rev.* 59: 171–200.
- Jacob, F., Lwoff, A., Siminovitch, L., Wallman, E. 1953. Definition de quelques termes relatifs a la Pysogenie. *Ann. Inst. Pasteur Paris* 84: 222-224.
- James, S.M., Fannin, S.L., Agee, B.A., Gall, B., Parker, E., Vogt, J., Run, G., Williams, J., Lieb, L., Prendergast, T., Werner, S.B., Chin, J. 1985. Listeriosis outbreak associated with Mexican-style cheese-California. *Morbidity Mortality Weekly Report* 34:357.
- Jarrett, P. 1983 Comparison of plasmids from twelve isolates of *Bacillus thuringiensis* H-serotype 7. *FEMS Microbiology Letters.* 16: 55–60.
- Jay, J.M. 1996. *Modern food microbiology.* 5th ed. New York: Chapman and Hall. p.635.
- Jimenez-Diaz, R., Ruiz-Barba, J.L., Cathcart, D.P., Holo, H., Nes, I.F., Sletten, K.H., Warner, P.J. 1995. Purification and partial amino acid sequence of plantaricin S, a bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* LPCO10, the activity of which depends on the complementary action of 2 peptides. *Appl Environ Microbiol* 61:4459-63.
- Jiménez-Díaz, R., Ríos-Sánchez, R.M., Desmazeaud, M., Ruiz-Barba, J.L., Piard, J-C. 1993. Plantaricin S and T, two new bacteriocins produced by *Lactobacillus plantarum* LPCO10 isolated from green olive fermentation. *Appl. Environ. Microbiol.* 59:1416-1420.
- Johnson, J.L., Doyle, M.P., Cassens, R.G. 1990. *Listeria monocytogenes* and other *Listeria* spp. in meat products; a review. *J. Food Prot.* 53: 81-91.
- Jung, G., Sahl, H.G.. 1991. Nisin and novel lantibiotics. First International Workshop on Lantibiotics. Ed. Giinther Jung. Institut fur Organische Chemie. Universitat Tubingen Auf der Morgenstelle 18 D-7400 Tubingen, Germany and Hans-Georg Sahl. Institut fur Medizinische Mikrobiologie. Universitat Bonn Sigmund-Freud-Str. 25. D-5300 Bonn Germany
- Kaletta, C., Entian, K.D., 1989. Nisin, a peptide antibiotic: cloning and sequencing of the nisA gene and posttranslational processing of its peptide product. *J. Bacteriol.* 171: 1597–1601.
- Kalchayanand, N., Sikes, T., Dunne, C.P., Ray, B. 1998. Interaction of hydrostatic pressure, time, and temperature of pressurization and pediocin AcH on inactivation of foodborne bacteria. *J. Food Prot.* 61 (4): 425-431.

- Kalchayanand, N., Hanlin, M.B., Ray, B. 1992. Sublethal injury makes gramnegative and resistant gram-positive bacteria sensitive to the bacteriocins, pediocin AcH and nisin. *Lett. Appl. Microbiol.* 15: 239-243.
- Kalchayanand, N., Sikes, A., Dunne, C.P., Ray, B.. 1994. Hydrostatic pressure and electroporation efficiency in combination with bacteriocins. *Appl. Environ. Microbiol.* 60:4174-4177.
- Kalchayanand, N., Sikes, T., Dunne, C.P., Ray, B.. 1994. Hydrostatic pressure and electroporation have increased bacterial efficiency in combination with bacteriocins. *Appl. Environ. Microbiol.* 60: 4174-4177.
- Kamoun, F., Mejdoub, H., Aouissaoui, H., Reinbolt, J., Hammami, A., Jaoua, S. 2005. Purification, amino acid sequence and characterization of Bacthuricin F4, a new bacteriocin produced by *Bacillus thuringiensis*. *J. of Applied Microbiology.* 98(4): 881-888.
- Katla, T., Møretrø, T., Aasen, I.M., Holck, A., Axelsson, L., Naterstad, K. 2001. Inhibition of *Listeria monocytogenes* in cold smoked salmon by addition of sakacin P and/or live *Lactobacillus sakei* cultures. *Food Microbiol.* 18:431-439.
- Kekessy, D.A., Piguet, J.D. 1970. New method for detecting density.bacteriocin production. *Applied Microbiology* 20: 282-283.
- Kerro-Dego, O., van Dijk, J.E., Nederbragt, H., 2002. Factors involved in the early pathogenesis of bovine *Staphylococcus aureus* mastitis with emphasis on bacterial adhesion and invasion. A review. *Vet Q.* 24, 181-198.
- Kimura, H., Sashihara, T., Matsusaki, H., Sonomoto, K., Ishizaki, A. 1998. Novel bacteriocin of *Pediococcus sp.* ISK-1 isolated from well-aged bed of fermented rice bran. *Annals of New York Academy of Sciences* 864: 345-348.
- Klaenhammer, T.R. 1993. Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* 12:39-85.
- Kleerebezen, M., Quadri, L.E.N. 2001. Peptide pheromone-dependent regulation of antimicrobial peptide production in Gram-positive bacteria: a case of multicellular behaviour. *Peptides* 22:1579–1596
- Klein, C., Kaletta, C., Schnell, N., Entian, K-D. 1992. Analysis of genes involved in biosynthesis of the lantibiotic subtilin. *Appl. Environ. Microbiol.* 58:132-42.
- Klein C, Kaletta C, Entian K-D. 1993. Biosynthesis of the lantibiotic subtilin is regulated by a histidine kinase/response regulator system. *Appl Environ Microbiol* 59:296-303.

- Klein, C., Entian, K-D. 1994. Genes involved in self-protection against the lantibiotic subtilin produced by *Bacillus subtilis* ATCC6633. *Appl. Environ. Microbiol.* 60:2793-801.
- Konisky, J. 1982. Colicins and other bacteriocins with established modes of action. *Annu. Rev. Microbiol.* 36:125-44.
- Kotelnikova, E.A., Gelfand, M.S. 2002. Bacteriocin production by gram positive bacteria and the mechanisms of transcriptional regulation. *Russian J. Genetics.* 38: 628-641.
- Kaiser, A.L., Montville, T.J. 1993. The influence of pH and growth rate on production of the bacteriocin, bavaricin MN, in batch and continuous fermentations. *J. Appl. Bacteriol.* 75:536–540.
- Kok, J., Holo, H., Van Belkum, M.J., Haandrikman, A.J., Nes, I.F. 1993. Non-nisin bacteriocins in *lactococci*: biochemistry, genetics and mode of action. In: *Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria* (Hoover, D. and Steenson, L., Eds.), Academic Press, New York, NY, pp. 121-150.
- Knowles, B.H., Ellar, D.J. 1987. Colloid-osmotic lysis is a general feature of the mechanism of action of *Bacillus thuringiensis* d-endotoxins with different insect specificity. *Biochim. Biophys. Acta* 924: 509-518.
- Komitopoulou, E., Boziaris, I.S., Davies, E.A., Delves-Broughton, J., Adams, M.R. 1999. *Alicyclobacillus acidoterrestris* in fruit juices and its control by nisin. *Int. J. Food Sci. Technol.* 34: 81-85.
- Kotelnikova, E.A., Gelfand, M.S. 2002. Bacteriocin production by gram positive bacteria and the mechanisms of transcriptional regulation. *Russian J. Genetics.* 38, 628-641.
- Kuipers, O.P., de Ruyter, P.G.G.A., Kleerebezem, M., de Vos W.M. 1998. Quorum sensing-controlled gene expression in lactic acid bacteria. *J. Biotechnol.* 64:15-21.
- Kuipers, O.P., Beerthuyzen, M.M., de Ruyter, P.G., Luesink, E.J., de Vos, W.M. 1995. Autoregulation of Nisin Biosynthesis in *Lactococcus lactis* by Signal Transduction. *J. Biological Chem.* 45: 27299-27304.
- Kumazaki, T., Ishii, S., 1982. A simple photometric method for determination of the activity of pyrocin R 1. *J. Biochem.* 91: 817–823.
- Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 227:680–685
- Lauková, A. 1992. The effect of culture medium on bacteriocin production in some bacterial strains. *Veterinary medicine (Praha).* 37:661-666.

- Lauková, A., Czikková, S., Burdova, O. 1999a. Anti-staphylococcal effect of enterocin in Sunar and yogurt. *Folia Microbiol. (Praha)* 44: 707–711.
- Lauková, A., Czikková, S., Dóbransky, T., Burdova, O. 1999b. Inhibition of *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus* by enterocin CCM4231 in milk products. *Food Microbiol.* 16: 93–99.
- Leer, R.J., van der Vossen, J.M.B.M., van Giezen, M., van Noort, J.M., Pouwels, P.H. 1995. Genetic analysis of acidocin B, a novel bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus*. *Microbiol.* 141:1629-35.
- Lee, S.J., Park, S.Y., Lee J-J., Yum, D-J., Koo, B-T., Lee, J-K. 2002. Genes Encoding the *N*-Acyl Homoserine Lactone-Degrading Enzyme Are Widespread in Many Subspecies of *Bacillus thuringiensis*. *Appl. and Env. Microbiology.* 68(8): 3919-3924.
- Leitsner, L., Gould, G.W. 2002. Hurdle technologies. Combination treatments for food stability, safety and quality. New York, USA, Kluwer Academic/Plenum Publishers.
- Leistner, L., Gorris, L.G.M. 1995. Food preservation by hurdle technology. *Trends Food Sci. Technol.* 6: 41-46.
- Leistner, L. 1985. Hurdle technology applied to meat products of the shelf stable product and intermediate moisture food types. Pp. 309-329. In: D. J. Simatos, and L. Multon (Eds.), *Properties of Water in Foods in Relation to Quality and Stability*, Martinus Nijhoff Publishers, Dordrecht, Netherlands.
- Lejeune, R., Callewaert, R., Crabbé, K., De Vuyst, L. 1998: Modelling the growth and bacteriocin production by *Lactobacillus amylovorus* DCE 471 in batch cultivation. *J. Appl. Microbiol.* 84: 159–168.
- Leroy, F., De Vuyst, L. 2005. Bacteriocin-producing strains in a meat environment; in Barredo Fuente JL (eds): *Methods in Biotechnology–Microbial Products and Biotransformations*. Totowa, Humana Press, pp 369–380.
- Leroy, F., Foulquié Moreno, M.R., De Vuyst, L. 2003. *Enterococcus faecium* RZS C5, an interesting bacteriocin producer to be used as a co-culture in food fermentation. *Int. J. Food Microbiol.* 88: 235–240.
- Leroy, F., De Vuyst, L. 1999. Temperature and pH conditions that prevail during the fermentation of sausages are optimal for the production of the antilisterial bacteriocin sakacin K. *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 974–981.

- Leroy, F., De Vuyst, L. 1999. The presence of salt and a curing agent reduces bacteriocin production by *Lactobacillus sakei* CTC 494, a potential starter culture for sausage fermentation. *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 5350–5356.
- Li, J., Carroll, J., Ellar, D.J. 1991. Crystal structure of insecticidal delta-endotoxin from *Bacillus thuringiensis* at 2.5 Å resolution. *Nature.* 353: 815-821.
- Li Yun, Xiang Hua, Liu Jingfang, Zhou Meixian, Tan Huarong. 2003. Purification and biological characterization of halocin C8, a novel peptide antibiotic from *Halobacterium* strain AS-7092. *Extremophiles.* 7:401–407.
- López-Meza, J.E., Higuera-Ramos, J.E, Ochoa-Zarzosa, A., Chassin-Noria, O., Valdez-Alarcón, J.J., Bravo-Patiño, A., Baizabal-Aguirre, V.M., 2006. Molecular characterization of *Staphylococcus* spp. isolates associated with bovine mastitis in Tarímbaro, Michoacán, México. *Tec. Pec. Méx.* 44: 91-106.
- Luchansky, J. B. 1999. Overview on applications for bacteriocin-producing lactic acid bacteria and their bacteriocins. *Antonie van Leeuwenhoek,* 76: 335
- Madigan, M., Martinko, J. (editors) 2005. *Brock Biology of Microorganisms* (11th ed. ed.). Prentice Hall.
- Marugg, J.D., Gonzalez, C.F., Kunka, B.S., Ledebøer, A.M., Pucci, M.J., Toonen, M.Y., Walker, S.A., Zoetmulder, L.C., Vandenberg, P.A. 1992. Cloning, expression, and nucleotide sequence of genes involved in production of pediocin PA-1, and bacteriocin from *Pediococcus acidilactici* PAC1.0. *Appl. Environ. Microbiol.* 58:2360-7.
- Maldonado-Blanco, M.G. 2005. Control de *Aedes aegypti* con microorganismos. *Revista Salud Pública y Nutrición. Edición Especial No.6-2005.*
- Maldonado, A., Ruiz-Barba, J.L., Jiménez-Díaz, R. 2004. Production of plantaricin NC8 by *Lactobacillus plantarum* NC8 is induced in the presence of different types of gram-positive bacteria. *Arch Microbiol* 181:8–16.
- Matthewes, K.R. 2004. Here, there, everywhere: antibiotic-resistant foodborne pathogens. *Food Technology.* 58(4): 104.
- Mayr-Harting, A., Hedges, A.J., Berkeley, R.C.W. 1972. Methods for studying bacteriocins, p. 315–422. *En* J. R. Norris and D. W. Ribbons (ed.), *Methods in microbiology*, Academic Press Inc., New York.
- McAuliffe, O., Ross, R.P., Hill, C. 2001. Lantibiotics: structure, biosynthesis and mode of action. *FEMS Microbiol. Rev.* 25: 285-308

- McCabe-Sellers, B.J., Beattie, S.E. 2004. Journal of American Dietetic Association 104: 1708-1717.
- Mead, P.S., Slutsker, L., Dietz, V., McCaig, L.F., Bresee, J.S., Shapiro, C., Griffin, P.M., Tauxe, R.V., 1999. Emerging Infectious Diseases 5: 607-625.
- Mélançon, D., Grenier, D., 2003. Production and properties of bacteriocinlike Inhibitory substances from the swine pathogen *Streptococcus suis* serotype 2. Appl. Environ. Microbiol. 69: 4482–4488.
- Moll, G.N., Konings, W.N., Driessen, A.J.M. 1999. Bacteriocins: mechanism of membrane insertion and pore formation. Antonie Van Leeuwenhoek 76:185-98.
- Montville, T.J., Wikowski, K., Chikindas, M.L., 2001. Biologically based preservation system: In: Food microbiology: Fundamentals and Frontiers. 2a Ed. Doyle, Buechart and Montville (Eds). AMS Press, Washington, D.C.
- Montville, T.J. Chen, Y. 1998. Mechanistic action of pediocin and nisin: recent progress and unresolved questions Appl. Microbiol. Biotechnol. 50: 511-519.
- Montville, T.J., Wikowski, K. 1997. In: M.P., Doyle, L.R. Beuchat y T.J., Montville, (Eds), Food Microbiology Fundamentals and Frontiers. ASM Press, Washington DC, pp. 557-577.
- Morales de la Vega, L., Barboza-Corona J.E., Aguilar-Uscanga, M.G., Ramírez-Lepe, M. 2006. Purification and characterization of an exochitinase from *Bacillus thuringiensis* ssp. *aizawai* and its action against phytopathogenic fungi. Can. J. Microbiol. 52:651–657
- Morgan, S., Ross, R.P., Hill, C., 1995. Bacteriolytic activity caused by the presence of a novel lactococcal plasmid encoding Lactococcins A, B, and M. Appl. Environ. Microbiol. 6: 2995–3001.
- Morgan, S.M., Galvin, M., Kelly, J., Ross R.P., Hill, C. 1999. Development of lactacin 3147-enriched whey powder with inhibitory activity against foodborne pathogens. J. Food Prot. 62:1011-1016.
- Morgan, S.M., Galvin, M., Ross R. P., Hill, C. 2001. Evaluation of spray lactacin 3147 powder for the control of *Listeria monocytogenes* and *Bacillus cereus* in a range of food system. Letters Applied Microbiology. 33: 387-391.
- Morse, R.J., Yamamoto, T., Stroud, R.M. 2001. Structure of Cry2Aa suggests an unexpected receptor binding epitope. Structure Camb. 9: 409-417.
- Mortvedt, J.J. 1991. Micronutrient fertilizer technology. In: Mortvedt, J.J., Cox, F.R., Shuman, L.M. and Welch R.M. (eds.). Micronutrients in Agriculture: Second

Edition. Number 4 in the Soil Science Society of America Book Series. Chapter 14. Soil Science Society of America, Inc. Madison, Wisconsin, USA.

- Mulders, J.W.M., Boerrigter, I.J., Rollema, H.S., Siezen, R.J., deVos, W.M. 1991. Identification and characterization of the lantibiotic nisin Z, a structural nisin variant. *Eur. J. Biochem.* 201:581-4.
- Mulvenna, J.P., Wang, C., Craik, D.J. 2006. CyBase: a database of cyclic protein sequence and structure. *Nucleic Acids Research*, 2006, Vol. 34, Database issue D192-D194
- Muriana, P.M., Klaenhammer, T.R. 1991b. Purification and partial characterization of lactacin F, a bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus* 11088. *Appl. Environ. Microbiol.* 57:114-121.
- Murray, M., Richard, J.A. 1997. Comparative study of the antilisterial activity of nisin A and pediocin AcH in fresh ground pork stored aerobically at 5°C. *J Food Prot* 60:1534-40.
- Nair, G., Sekar, N.V. 2004. Cloning and partial characterization of zwittermicin A resistance gene cluster from *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* strain HD1. *J. of Applied Microbiol.* 97(3): 495-503.
- Nattress, F.M., Baker, L.P. 2003. Effects of treatment with lysozyme and nisin on the microflora and sensory properties of commercial pork. *Int. J. of Food Microbiol.* 85(3):259-67.
- Nattress, F.M., Yost, C.K., Baker, L.P. 2001. Evaluation of the ability of lysozyme and nisin to control meat spoilage bacteria. *Int. J. of Food Microbiol.* 70(1-2):111-119.
- Nemcova, R., A. Laukova, S. Gancarcikova, R. Kastel. 1997. In vitro studies of porcine *lactobacilli* for possible probiotic use. *Berl. Muench. Tieraerztl. Wochenschr.* 110:413-417.
- Nes, I.F., Holo, H. 2000. Class II antimicrobial peptides from lactic acid bacteria. *Biopolymers* 55:50-61. Nemcova, R. 1997. Criteria for selection of *lactobacilli* for probiotic use. *Vet. Med.* 42: 19-27.
- Nes, I.F., Eijsink, V.G.H.. 1999. Regulation of group II peptide bacteriocin synthesis by quorum sensing mechanisms, p. 175–192. *In* G. M. Dunne and S. C. Winans (ed.), *Cell-cell signaling in bacteria*. ASM Press, Washington, D.C.
- Nes, I.F., Diep, D.B, Havarstein, L.S, Brurberg, M.B, Eijsink, V., Holo, H. 1996. Biosynthesis of bacteriocins in lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek* 70:113-28.

- Nettles, C.G., Barefoot, S.F. 1993. Biochemical and genetic characteristics of bacteriocins of food-associated lactic acid bacteria. *J. Food Prot.* 56: 338-356.
- Neuendorf, S., Hedtke, K., Tangen, G., Genersch, E. 2004. Biochemical characterization of different genotypes of *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae*, a honey bee bacterial pathogen. *Microbiology.* 150: 2381-2390.
- Nilsson, L., Ng, Y. Y., Christiansen, J. N., Jorgensen, B. L., Grotnum, D., and Gram, L. 2004. The contribution of bacteriocin to inhibition of *Listeria monocytogenes* by *Carnobacterium piscicola* strains in cold-smoked salmon systems. *J. Appl. Microbiol.* 96: 133–143.
- Nilsson, L., Huss, H.H., Gram, L. 1997. Inhibition of *Listeria monocytogenes* on cold-smoked salmon by nisin and carbon dioxide atmosphere. *Int. J. Food Microbiol.* 38: 217–227.
- Nissen-Meyer, J., Sletten, K., Nes, I.F. 1991. Purification and amino acid sequence of lactocin, a bacteriocin produced by *Lactobacillus sake* L45. *Appl. Environ. Microbiol.* 57:1829-1834
- Nissen, H., Holo, H., Axelsson, L., Blom, H. 2001. Characterization and growth of *Bacillus* spp. in heat-treated cream with and without nisin. *J. Appl. Microbiol.* 90: 530–534.
- Nilsen, T., Nes, I.F., H. Holo. 1998. An exported inducer peptide regulates bacteriocin production in *Enterococcus faecium* CTC 492. *J. Bacteriol.* 180:1848-1854.
- Ochoa-Zarzosa, A., Loeza-Lara, P., Torres-Rodríguez, F., Loeza-Ángeles, H., Mascot-Chiquito, N., Sánchez-Baca, S., López-Meza, J.E., 2008. Antimicrobial susceptibility and invasive ability of *Staphylococcus aureus* isolates from mastitis from dairy backyard systems. *Antonie van Leeuwenhoek.* 94, 199–206.
- Oscáriz, J.C., Pisabarro, A.G., 2001. Classification and mode of action of membrane-active bacteriocins produced by gram-positive bacteria. *Int. Microbiol.* 4, 13–19.
- Oscariz, J.C., Lasa, I., Pisabarro, A.G. 1999. Detection and characterization of cerein 7, a new bacteriocin produced by *Bacillus cereus* with a broad spectrum of activity. *FEMS Microbiology Letters.* 178: 337–341.
- O'Sullivan, L., Ross, R. P., Hill, C. 2002. Potential of bacteriocin-producing lactic acid bacteria for improvements in food safety and quality. *Biochimie* 84:593-604.
- Owens, W.E., Ray, C.H., Watts, J.L., Yancey, R.J., 1997. Comparison of success of antibiotic therapy during lactation and results of antimicrobial susceptibility tests for bovine mastitis. *J. Dairy Sci.* 80, 313–317.

- Paik, H.D., Bae, S.S., Park, S.H., Pan, J.G. 1997. Identification and partial characterization of tochicin, a bacteriocin produced by *Bacillus thuringiensis* subsp. *tochigiensis*. J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 19:294–298.
- Paik, H.D., Glatz, B.A. 1995. Purification and amino acid sequence of propionicin PLG-1, a bacteriocin produced by *Propionibacterium thoenii* P127. Lait. 75: 367-377.
- Parente, E., Ricciardi, A. 1999. Production, recovery and purification of bacteriocins from lactic acid bacteria. Appl. Microbiol. Biotechnol. 52:628-38.
- Parente, E., Giglio, M.A, Ricciardi, A., Clememti, F. 1998. The combined effect of nisin, Leucocin F10, pH, NaCl and EDTA on the survival of *Listeria monocytogenes* in broth. Int. J. Food Microbiol. 40: 65-75.
- Parente, A.M., Abreu, I, Salema, R. 1994. Mycoplasma-like organism associated with phloem cells of disease grapevines in Northern Portugal. Z. Pflanzenkrankh, Pflanzenschutz. 101:124-127
- Parente, E., Ricciardi, A. 1994. Influence of pH on the production of enterocin 1146 during batch fermentation. Lett. Appl. Microbiol. 19:12-15.
- Parente, E., Hill, C. 1992. A comparison of factors affecting the production of two bacteriocins from lactic acid bacteria. J. Appl. Bacteriol. 73: 290-298.
- Parente, E., Hill, C. 1992. Inhibition of *Listeria* in buffer, broth, and milk by enterocin 1146, a bacteriocin produced by *Enterococcus faecium*. J. Food Prot. 55: 503–508.
- Parente, E., Hill, C. 1992a. Characterization of enterocin 1146, a bacteriocin from *Enterococcus faecium* inhibitory to *Listeria monocytogenes*. J. Food Protect. 55: 497-508.
- Parente, E., Hill, C. 1992b. Inhibition of *Listeria* in buffer, broth, and milk by enterocin 1146, a bacteriocin produced by *Enterococcus faecium*. J. Food Protect. 5:503-502.
- Parente, E., Hill, C. 1992c. A comparison of factors affecting the production of two bacteriocins from lactic acid bacteria. J. Appl. Bacteriol. 73: 290-298.
- Parker, M.W., Pattus, F. 1993. Rendering a membrane protein soluble in water: a common packing motif in bacterial protein toxins. TIBS 18: 391-395.
- Parkinson, J.S. 1993. Signal transduction schemes of bacteria. Cell. 73:857-71.
- Pawar, D.D., Malik, S.V.S., Bhilegaonkar, K.N., Barbuddhe, S.B. 2000. Effect of nisin and its combination with sodium chloride on the survival of *Listeria monocytogenes* added to raw buffalo meat mince. Meat Sci. 56: 215–219.

- Pieterse, R., Todorov, S.D., Dicks, L.M., 2008. Bacteriocin ST91KM, produced by *Streptococcus gallolyticus* subsp. *macedonicus* ST91KM, is a narrow-spectrum peptide active against bacteria associated with mastitis in dairy cattle. *Can. J. Microbiol.* 54, 525-531.
- Piva, A., Headon, D.R. 1994. Pediocin A, a bacteriocin produced by *Pediococcus pentosaceus* FBB61. *Microbiol.* 140: 697-702.
- Pol, I. E., Mastwijk, H.C., Slump, R.A., Popa, M.E., Smith, E.J. 2001. Influence of food matrix on inactivation of *Bacillus cereus* by combinations of nisin, pulsed electric field treatment, and carvacrol. *J. Food Prot.* 64: 1012–1018.
- Prescott, L.M., Harley, J.P., Klein, D.A. 2005. The epidemiology of infectious disease. In: Prescott, L.M., Harley, J.P., Klein, D-A. (eds) *Microbiology*, 6th edn, McGraw-Hill, New York, pp 821–843
- Quadri, L.E., Kleerebezem, M., Kuipers, O.P., de Vos, W.M., Roy, K.L., Vederas, J.C., Stiles, M.E. 1997. Characterization of a locus from *Carnobacterium piscicola* LV17B involved in bacteriocin production and immunity: evidence for global inducer-mediated transcriptional regulation. *J. Bacteriol.* 179:6163-71.
- Quadri, L.E., Sailer, M., Terebiznik, M.R., Roy, K. L, Vederas, J.C., Stiles, M.E. 1995. Characterization of the protein conferring immunity to the antimicrobial peptide carnobacteriocin B2 and expression of carnobacteriocin B2 and BM1. *J. Bacteriol.* 177:1144-51.
- Raloff, J. 1998. Staging germ warfare in foods. *Sci. News* 153:89-90.
- Rauch, P.J.G., de Vos, W.M. 1992. Characterization of the novel nisin-sucrose conjugative transposon Tn5276 and its insertion in *Lactococcus lactis*. *J. Bacteriol.* 174:1280-7.
- Ray, B. 1992. Bacteriocins of starter culture bacteria as food biopreservatives: an overview. Pp. 177-205. In: B. Ray, and M. Daeschel (Eds.), *Food biopreservatives of microbial origin*. Boca Raton, Florida, CRC Press.
- Ray, B. 1992. Diacetyl of lactic acid bacteria as a food biopreservative. Pp. 137-153. In: B. Ray, and M. Daeschel (Eds.), *Food preservatives of microbial origin*. CRC Press, Boca Raton, Fla.
- Reyes, R., Ramírez, G., Delgado, N.M., 2004. Fluorescent berberine binding as a marker of internal glycosaminoglycans sulfate in bovine oocytes and sperm cells. *Arch. Androl.* 50: 327–332.
- Riley, M.A., Wertz, J.E. 2002. Bacteriocins: Evolution, Ecology, and Application. *Annu. Rev. Microbiol.* 56: 117-13.

- Rince, A., Dufour, A., Uguen, P., Le Pennec J-P, Haras D. 1997. Characterization of the lactacin 481 operon: the *Lactococcus lactis* genes lctF, lctE, and lctG encode a putative ABC transporter involved in bacteriocin immunity. *Appl. Environ. Microbiol* 63:4252-60.
- Rocourt, J., Jacquet, C., Reilly, A. 2000. Epidemiology of human listeriosis and seafoods. *Int. J. Food Microbiol.* 62: 197–209.
- Rodgers, S. 2001. Preserving non-fermented refrigerated foods with microbia cultures – a review. *Trends in Food Science & Technology.* 12: 276-284
- Rørvik, L. M. 2000. *Listeria monocytogenes* in the smoked salmon industry. *Int. J. Food Microbiol.* 62: 183–190.
- Ross, R.P., Morgan, S., Hill, C. 2002. Preservation and fermentation: past, present and future. *International J. of Food Microbiology.* 79: 3-16.
- Ross, R.P., Galvin, M., McAuliffe, O., Morgan, S.M., Ryan, M.P., Twomey, D.P., Meaney, W.J., Hill, C. 1999. Developing applications for lactococcal bacteriocins. *Antonie van Leeuwenhoek* 76:337-46.
- Ruiz-Larrea, F., Rojo-Bezares, B., Sáenz, Y., Navarro, L., Díez, L., Zarazaga, M., Torres, C. 2007. Bacteriocins para la estabilización microbiológica y reducción de la dosis SO₂. *International Symposium Microbiology and Foods safety of wine “Microsafetywine”*. Vilafranca del penedés, Spain. 21-23 November 2007.
- Ryan, M. P., W. J. Meaney, R. P. Ross, y C. Hill. 1998. Evaluation of lactacin 3147 and teat seal containing this bacteriocin for inhibition of mastitis pathogens. *Appl. Environ. Microbiol.* 64:2287-2290.
- Ryser, E.T., Marth, E.H. 1999. *Listeria*, listeriosis and food Safety. 2nd ed. New York: Marcel Dekker, Inc. 738 p.
- Sablon, E., Contreras, B., Vandamme, E., 2000. Antimicrobial peptides of Lactic Acid Bacteria: Mode of Action, Genetic and Biosynthesis. In *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*. [Th.Scheper]Springer–Verlag.
- Sanchis, V., Lereclus, D., Menou, G., Chaufaux, J., Lecadet, M.M. 1988. Multiplicity of delta-endotoxin genes with different insecticidal specificities in *Bacillus thuringiensis aizawai* 7.29. *Mol. Microbiol.* 2(3):393–404.
- Sandholm, M., Kaartinen, L., Pyorala, S., 1990. Bovine mastitis – why does antibiotic therapy not always work? An overview. *J. Vet. Phamacol. Therap.* 13, 248–260.

- Sangeetha, P.T., Ramesh, M.N., Prapulla, S.G. 2005. Recent trends in the microbial production, analysis and application of fructooligosaccharides. *Trends Food Sci. Technol.* 16: 442-457.
- Sankaranarayanan, R., Sekar, K., Banerjee, R., Sharma, V., Surolia, A., Vijayan, M. 1996. A novel mode of carbohydrate recognition in jacalin, a Moraceae plant lectin with a β -prism fold. *Nat. Struct. Biol.* 3: 596-603
- Samelis, J., Kakouri, A., Rementzis, J. 2000. Selective effect of the product type and the packaging conditions on the species of lactic acid bacteria dominating the spoilage microbial association of cooked meats at 4°C. *Food Microbiol.* 17: 329-340.
- Schillinger, U., Geisen, R., Holzapfel, W.H. 1996. Potential of antagonistic microorganisms and bacteriocins for the biological preservation of food. *Trends Food Sci Technol.* 7: 158-164.
- Schillinger, U., Lücke, F.K., 1989. Antibacterial activity of *Lactobacillus sake* isolated from meat. *Appl. Environ. Microbiol.* 55: 1901-1906.
- Schmidt, K., Tirado, C. 2001. Seventh report 1993-1998. WHO Surveillance programme for control of foodborne infections and intoxications in Europe Berlin. pp 321-333. Edited by C. Tirado and K. Schmidt.
- Schnell, N., Engelke, G., Augustin, J., Rosenstein, R., Ungermann, V., Götz, F., Entian, K-D. 1992. Analysis of genes involved in the biosynthesis of lantibiotic epidermin. *Eur. J. Biochem.* 204:57-68.
- Schnepf, H.E. Chickmore, N., Vanrie, J., Lereclus, D., Baum, J., Feitelson, J., Zfider, D.R., Dean, D.H. 1998. *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. *Microbiol. and Mol. Biol. Rev.* 62 (3): 775-806.
- Schnepf, H., Wong, H., Whiteley, H. 1985. The amino acid sequence of a crystal protein from *Bacillus thuringiensis* deduced from the DNA base sequence. *J. Biol. Chem.* 260: 6264-6272.
- Schnepf, H.E., Whiteley, H.R. 1981. Cloning and expression of the *Bacillus thuringiensis* crystal protein gene in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78:2893-2897.
- Schripsema, J., K., De Rudder, E.E., van Vliet, T.B., Lankhorst, P.P., De Vroom, E., Kijne, W., van Brussel, A.A.N. 1996. Bacteriocin small of *Rhizobium leguminosarum* belongs to the class of N-acyl-L-homoserine lactone molecules, known as autoinducers and as quorum sensing co-transcription factors. *J. Bacteriol.* 178: 366-371.

- Schved, F., Pierson, M.D., Juven, B.J. 1996. Sensitization of *Escherichia coli* to nisin by maltol and ethyl maltol. *Lett. Appl. Microbiol.* 22: 305-314.
- Shimizu, T., Morikawa, K. 1996. The β -prism: a new folding motif. *Trends Biochem. Sci.* 21:3-6.
- Silo-Suh, L.A., Stabb, E.V., RaVel, S., Hendelsman, J. 1998. Target range of zwittermicin A, an aminopolyol antibiotic from *Bacillus cereus*. *Curr. Microbiol.* 37:6-11.
- Silva, J., Carvahlo, A.S., Teixeira, P., Gibbs, P.A. 2002. Bacteriocin production by spray-dried lactic acid bacteria. *Letters in Applied Microbiology.* 34: 77-81.
- Simon, L., Frémaux, C., Cenatiempo, Y., Berjeaud, J.M. 2002. Sakacin G, a new type of antilisterial bacteriocin. *Appl. Environ. Microbiol.* 12:6416-6420.
- Speer, C.A. 1997. Protozoan parasites acquired from food and water. In: Doyle MP, Beuchat LR, Montville TJ (eds.) *Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers*, p. 478-493. Washington, DC, American Society for Microbiology.
- Stiles, M.E. 1996. Biopreservation by lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek* 70: 331-345.
- Stevens, K.A., Sheldon, B.W., Klapes, N.A., Klaenhammer, T.R. 1991. Nisin treatment for inactivation of *Salmonella* species and other Gram-negative bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 57: 3613-3615.
- Stock, J.B., Stock, A.M., Mottonen, J. M. 1990. Signal transduction in bacteria. *Nature.* 344: 395-400.
- Stock, J.B., Ninfa, A.J., Stock, A.M.. 1989. Protein phosphorylation and regulation of adaptive responses in bacteria. *Microbiol. Rev.* 53:450-490.
- Stoddard, G.W., Petzel, J.P., van Belkum, M.J., Kok, J., McKay, L.L. 1992. Molecular analyses of the lactococcin A gene cluster from *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis* WM4. *Appl. Environ. Microbiol.* 58:1952-61
- Stohr, V., Joffraud, J.J., Cardinal, M., Leroi, F. 2001. Spoilage potential and sensory profile associated with bacteria isolated from cold-smoked salmon. *Food Res. Int.* 34: 797-806.
- Sobrino-López, A., Martí-Belloso, O. 2006. Enhancing inactivation of *Staphylococcus aureus* in skim milk by combining high intensity pulsed electric fields and nisin. *J. Food Prot.* 69: 345-353.

- Suzuki, M., Yamamoto, Y. Kawai, T., Inoue, N., Yamazaki, K. 2005. Mode of action of piscicocin CS526 produced by *Carnobacterium piscicola* CS526. J. Appl. Microbiol. 98(5): 1146.
- Svetoslav, T., Vaz-Velho, M., Gibbs, P. 2004. Comparison of two methods for purification of plantaricin ST31, a bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* ST31. Brazilian J. of Microbiol. 35: 157-160.
- Tagg, J.R., McGiven, A.R., 1971. Assay system for bacteriocins. Appl. Microbiol. 21:943.
- Tagg, J.R., Dajani, A.S., Wannamaker, L.W. 1976. Bacteriocins of gram-positive bacteria. Bacteriol. Rev. 40:722-56.
- Talwalkar, S.S., Vaidya, A.B., Godse, C., Vaidya, A., Vaidya, R., 2005. *Plasmodium* DNA fluoresces with berberine: a novel approach for diagnosis of malaria parasites. Am. J. Clin. Pathol. 124:408–412.
- Taylor, J.I., Hirsh, A., Mattick, T. R. 1949. The treatment of bovine *streptococcal* and *staphylococcal* mastitis with nisin. The Vet Record 61:197-198.
- Thamthiankul, S., Suan-Ngay, S., Tantimavanich, S., Panbangred, W. 2001. Chitinase from *Bacillus thuringiensis* serovar. *pakistani*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 56:395-401.
- Terebiznik, M.R., Jagus, R.J., Cerrutti, P., De Huergo, M., Pilosof, A.M. 2002. Inactivation of *Escherichia coli* by a combination of nisin, pulsed electric fields, and water activity reduction by sodium chloride. J. Food Prot. 65: 1253–1258.
- Tichaczek, P.S., Meyer, J.N., Nes, I.F., Vogel, R.F., Hammes, W.P. 1992. Characterization of the bacteriocins curvacin A from *Lactobacillus curvatus* LTH1174 and sakacin P from *L. sake* LTH673. Syst. Appl. Microbiol. 15: 460–468.
- Thomas, L.V., Delves-Broughton, J. 2001. New advances in the application of the food preservative nisin. Adv. Food Sci. 2: 11–22.
- Thomas, L.V., Clarkson, M.R., Delves-Broughton, J. 2000. Nisin. In: Natural Food Antimicrobial Systems, pp. 463–524. Naidu, A. S., ed., CRC Press, Boca Raton, FL.
- Tomita, H., Tanimoto, K., Hayakawa, S., Morinaga, K., Ezaki, K., Oshima, H., Ike, Y. 2003. Highly Conjugative pMG1-Like Plasmids Carrying Tn1546-Like Transposons That Encode Vancomycin Resistance in *Enterococcus faecium* Journal of Bacteriology. 185(23):7024-7028.

- Uguen, P., Le Pennec, J.P., Dufour, A. 2000. Lantibiotic biosynthesis: interactions between prelactacin 481 and its putative modification enzyme, LctM. *J. Bacteriol.* 182:5262-5266.
- Vadlamudi, R.K., Weber, E., Ji, I., Ji, T.H. y L.A. Jr. Bulla. 1995. Cloning and expression of a receptor for an insecticidal toxin of *Bacillus thuringiensis*. *J.Biol. Chem.* 270, 5490-5494.
- VanKraaij, C., de Vos, W.M., Siezen, R.J., Kuipers, O.P. 1999. Lantibiotics: biosynthesis, mode of action and applications. *Nat. Prod. Rep.* 16:575-87.
- Van Laack, L. J. M., Schillinger, U., Holzappel, W. H.. 1992. Characterization and partial purification of a bacteriocin produced by *Leuconoctoc carnosum* LA44A. *Int. J. Food Microbiol.* 16:183-195.
- van Belkum, M.J., Hayema, B.J., Jeeninga, R.E., Kok, J., Venema, G. 1991. Organization and nucleotide sequence lactococcal bacteriocin operons. *Applied and Environmental Microbiology.* 57: 492–498.
- Varella-Coelho, M.L., Santos Nascimento, J.D., Fagundes, P.C., Madureira, D.J., Oliveira, S.S., Vasconcelos de Paiva Brito, M.A., Freire Bastos Mdo, C., 2007. Activity of staphylococcal bacteriocins against *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus agalactiae* involved in bovine mastitis. *Res. Microbiol.* 158: 625- 630.
- Venema, K., Kok, J., Marugg, J.D., Toonen, M.Y., Ledebøer, A.M., Venema, G., Chikindas, M.L. 1995a. Functional analysis of the pediocin operon of *Pediococcus acidilactici* PAC 1.0:PedB is the immunity protein and PedD is the precursor processing enzyme. *Mol. Microbiol.* 17:515-22.
- Venema, K., Venema, G., Kok, J. 1995b. Lactococcins: mode of action, immunity and secretion. *Int. Dairy J.* 5: 815-32.
- Venema, K., Abbe, T., Haandrikman, A.J., Leenhouts, K.J., Kok, J., Venema, G. 1993. Mode of action of lactococcin B, a thiol-activated bacteriocin from *Lactococcus lactis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 59:1041–1048
- Verluyten, J., Messens, W., De Vuyst, L. 2004. Sodium chloride reduces production of curvacin A, a bacteriocin produced by *Lactobacillus curvatus* strain LTH 1174, originating from fermented sausage. *Appl. Environ Microbiol.* 70: 2271–2278.
- Villani, F., Salzano, G., Sorrentino, E., Pepe, O., Marino, P., and Coppola, S. 1993. Enterocin 226 NWC, a bacteriocin produced by *Enterococcus faecalis* 226, active against *Listeria monocytogenes*. *J. Appl. Bacteriol.* 74: 380–387.

www.cfsan.fda.gov/~mow/intro.html

www.madrimasd.org/biotecnologia

www.microbiologia.org.mx/microbiosenlinea

www.ncbi.nlm.nih.gov

www.novapublisher.com/catalog/product_info.php

<http://www.sipweb.org>

Wiley, R.C. 1994. Minimally processed refrigerated fruits and vegetables. New York, USA, Chapman & Hall.

Worobo, R.W., Henkel, T., Sailer, M., Roy, K.L., Vederas, J.C., Stiles, M.E. 1994. Characteristics and genetic determinant of a hydrophobic peptide bacteriocin, carnobacteriocin A, produced by *Carnobacterium piscicola* LV 17A. Microbiol. 140:517-26.

Woo-Jin, J., Mabood, F., Souleimanov, A., Zhou, X., Jaoua S., Kamoun, F. Smith, D.L. 2008. Stability and Antibacterial Activity of Bacteriocins Produced by *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus thuringiensis* ssp. *kurstaki*. J. Microbiol. Biotechnol. 18(11): 1836–1840.

Wu, J., Hu, S., Cao, L., 2007. Therapeutic effect of nisin Z on subclinical mastitis in lactating cows. Antimicrob. Agents Chemother. 51, 3131–3135.

Yang, R., Ray, B. 1994. Factors influencing production of bacteriocins by lactic acid bacteria. Food Microbiol. 11:281-91.

Yang, R., Ray, B. 1994. Prevalence and biological control of bacteriocin-producing psychrotrophic *leuconostocs* associated with spoilage of vacuum-packaged process meats. J. Food Prot. 57: 209-217.

Yang, R., Johnson, M.C., Ray, B. 1992. Novel method to extract large amounts of bacteriocins from lactic acid bacteria. Appl. Environ Microbiol. 58: 3355–3359.

Yamazaki, K., Suzuki, M., Kawai, Y., Inoue, N., Montville, T.J. 2003. Inhibition of *Listeria monocytogenes* in cold-smoked salmon by *Carnobacterium piscicola* CS526 isolated from frozen surimi. J. Food Prot. 66: 1420–1425

Yamazaki, K., Murami M., Kawai Y., Inoue N., and Matsuda, T. 2000. Use of nisin for inhibition of *Alicyclobacillus acidoterrestris* in acidic drinks. Food Microbiol. 17: 315–210.

Zottola, E.A., Yezzi, T.L., Ajao, D.B., Roberts, R.F. 1994. Utilization of cheddar cheese containing nisin as an antimicrobial agent in other foods. *Int. J. Food Microbiol.* 24:227-38.

RESUMEN CURRICULAR

M.C. Norma Margarita de la Fuente Salcido

Candidato para obtener el Grado de
Doctor en Ciencias especialidad Alimentos

Tesis **BIOSINTESIS Y ACTIVIDAD DE BACTERIOCINAS PRODUCIDAS POR CEPAS MEXICANAS DE *Bacillus thuringiensis* CON POTENCIAL APLICACIÓN COMO BIOCONSERVADORES EN ALIMENTOS.**

Campo de Estudio: Ciencias de los Alimentos

DATOS PERSONALES:

Nacionalidad: Mexicana

Fecha de Nacimiento: 21 Junio 1964

Puesto Actual: Catedrático Asociado B Tiempo Completo, Escuela de Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Coahuila. Torreón, Coah.

ESTUDIOS REALIZADOS:

Maestro en Ciencias en Desarrollo y Procesamiento de Alimentos.

Mención Honorífica, Mejor Promedio.

Universidad Juárez del Estado de Durango, 2001.

Ingeniero Bioquímico.

Universidad Autónoma de Coahuila, Torreón Coah., 1998.

Diplomados:

Diplomado “Formación de Tutores” ANUIES - U.A.de C. Septiembre 2003.

Diplomado “Investigación Científica aplicada a las Ciencias Químico-Biológicas”, U.J.E.D., Febrero 2002.

Diplomado “Práctica Docente Reflexiva”. U.A. de C. Noviembre 2002.

PUBLICACIONES INDEXADAS

Norma de la Fuente-Salcido, Rubén Salcedo-Hernández, Ma.Guadalupe Alanis-Guzmán, Dennis K. Bideshi, J. Eleazar Barboza-Corona (2007). **A new rapid fluorogenic method for measuring bacteriocin activity**. Journal of Microbiological Methods 70 (1): 196–199.

N. de la Fuente-Salcido, Ma. Guadalupe Alanís-Guzmán, D. K. Bideshi, R. Salcedo-Hernández, M. Bautista-Justo, J. E. Barboza-Corona. (2008). **Enhanced synthesis and antimicrobial activities of bacteriocins produced by Mexican strains of *Bacillus thuringiensis***. Archives of Microbiology 190(6): 633-640

J.E. Barboza-Corona, O.B. Gutierrez-Acosta, M. Imperial-Cervantes, D.K. Bideshi, **N. de la Fuente-Salcido**, M. Bautista-Justo, R. Salcedo-Hernandez (2008). **Generation of antibacterial oligosaccharides derived from chitin using heterologous endochitinase synthesized in *Escherichia coli***. Journal of Applied Microbiology. 105(5): 1511-1520.

José Eleazar Barboza-Corona, **Norma de la Fuente-Salcido**, Nayeli Alva-Murillo, Alejandra Ochoa-Zarzosa, Joel E. López-Meza (2009). **Activity of bacteriocins synthesized by *Bacillus thuringiensis* against *Staphylococcus aureus* isolates associated to bovine mastitis**. Veterinary Microbiology. 138: 179-183.

J.Eleazar Barboza-Corona, Tomas Ortiz-Rodriguez, **Norma de la Fuente-Salcido**, Mayela Bautista-Justo, Dennis Bidechi, Ruben Salcedo-Hernandez (2009). **Hyperproduction of chitinase influences crystal toxin synthesis and sporulation of *Bacillus thuringiensis***. Antonie van Leeuwenhoek. 96:31–42

ARTICULOS ARBITRADOS DE DIVULGACIÓN

Janeth Adriana Martínez-Cardenas J.A., **N. de la Fuente-Salcido**, J. E. Barboza-Corona y R. Salcedo-Hernández (2006). **La síntesis de la morricina 269 es inducida en presencia de *B. cereus***. Memorias del XVI Verano de la Investigación Científica UJAT 2006. ISBN 968-9024-10-8. Colección: Eduardo Caballero y Caballero. 294-300.

Norma De la Fuente Salcido (2006). **Alimentos Funcionales=¿Moda Actual para la salud humana?** CienciAcierta.. 5(2):17-19.

De la Fuente-Salcido N. y JE Barboza-Corona (2006). La dualidad de *Bacillus thuringiensis*: bioinsecticida y bioconservador. CienciAcierta. 6(2): 27-28.

De la Fuente Salcido N., M. G. Alanis Guzmán y J. E. Barboza-Corona (2007). Bacteriocinas de *Bacillus thuringiensis* con potencial aplicación como bioconservadores en alimentos. CienciAcierta. 10(2): 35-39.

Morales-Pérez, G., **De la Fuente-Salcido, N. M.,** Barboza-Corona, J.E. (2007). **Ubicación del gen que codifica la morricina 269 en el genoma de *B. thuringiensis*.** AgoMemorias CONCyTEG 4to. Verano Estatal de la Investigación.

RECONOCIMIENTOS

Primer Lugar en el Tercer Concurso de Creatividad e Innovación, categoría licenciatura. Trabajo: **”Innovadora metodología para determinar rápidamente la actividad de bacteriocinas por fluorescencia”**. Asesor. Universidad de Guanajuato. Septiembre del 2007.

IX Foro Regional de Vinculación y Premio a la Innovación Tecnológica 2007. **“Metodología para determinar rápidamente la actividad de bacteriocinas por fluorescencia”**. Asesor. Guadalajara, Jalisco. Octubre 2007.

PRESENTACIONES EN CONGRESOS NACIONALES E INTERNACIONALES

Nuevo método fluorogénico para determinar rápidamente la actividad de bacteriocinas. Norma de la Fuente-Salcido, Rubén Salcedo-Hernández, Ma.Guadalupe Alanis-Guzmán, Dennis K. Bideshi, J. Eleazar Barboza-Corona. XII Congreso Nacional Sociedad Mexicana de Biotecnología y Bioingeniería SMBB. 25 Mayo 2007. Morelia, Michoacán.

La síntesis de la morricina 269 es inducida en presencia de *B. cereus*. Janeth Adriana Martínez Cardeñas, Dr. J. Eleazar Barboza Corona, M.C. Norma M. de la Fuente Salcido, Dr. Rubén Salcedo Hernández. IX Congreso Nacional de Ciencia de los Alimentos y V Foro de Ciencia y Tecnología de los Alimentos. Junio 2007. Guanajuato, Gto.

Síntesis por inducción y actividad antimicrobiana de bacteriocinas de *B. thuringiensis*. Norma Margarita de la Fuente Salcido, Gabriela Morales Pérez, Ma. Guadalupe Alanís-Guzmán, Rubén Salcedo Hernández, J. Eleazar Barboza Corona. X Congreso Nacional de Ciencia y Tecnología de los Alimentos. II Simposium Internacional de Ciencias Químicas. 29 Mayo 2008. Gómez Palacio Dgo.

Ubicación y caracterización parcial de una clona con el posible gen de una bacteriocina de *Bacillus thuringiensis*. Gabriela Morales Pérez, M.C. Norma de la Fuente Salcido, J. Eleazar Barboza Corona. X Congreso Nacional de Ciencia y Tecnología de los Alimentos II Simposium Internacional de Ciencias Químicas. 29 Mayo 2008. Gómez Palacio Dgo.

La producción de bacteriocinas de *Bacillus thuringiensis* puede inducirse mediante proteínas sintetizadas por *B. cereus*. N. de la Fuente-Salcido, M.G. Alanís-Guzmán, R. Salcedo-Hernández y J. E. Barboza-Corona. XXXVI Congreso Nacional de Microbiología. Junio de 2008. Morelia, Michoacán.

Producción de quitooligosacáridos con actividad antibacteriana empleando una endoquitinasa heteróloga expresada en *Escherichia coli*. J. Eleazar Barboza-Corona, Olga Gutiérrez-Acosta, Maribel Imperial-Cervantes, Norma de la Fuente-Salcido, Dennis K. Bideshi y Rubén Salcedo-Hernández. XXXVI Congreso Nacional de Microbiología. Junio de 2008. Morelia, Michoacán.

Heterologous expresión of recombinant bacterial endochitinases and production of chitin-derived oligosaccharides. Barboza-Corona JE, Gutierrez-Acosta OB, Imperial-Cervantes M, Bideshi DK, De la Fuente-Salcido N., Salcedo-Hernández, R. In 41st Annual Meeting of the Society for Invertebrate Pathology and 9th International Conference on *Bacillus thuringiensis*. 3-7 August, 2008. United Kingdom.

Enhanced synthesis and antimicrobial activities of bacteriocins produced by Mexican strains of *Bacillus thuringiensis*. De la Fuente-Salcido, N., Alanís-Guzmán, M.G., Bideshi, D.K., Salcedo-Hernández, R., Bautista-Justo, M., Barboza-Corona, J.E. 3RD International Congress Food Science & Biotechnology in Developing Countries. 15-17 Octubre 2008. Querétaro, Qro.

Hyperproduction of chitinase influences crystal toxin synthesis and sporulation of *Bacillus thuringiensis*

J. Eleazar Barboza-Corona · Tomás Ortiz-Rodríguez · Norma de la Fuente-Salcido · Dennis K. Bideshi · Jorge E. Ibarra · Rubén Salcedo-Hernández

Received: 7 November 2008 / Accepted: 17 March 2009 / Published online: 1 April 2009
© Springer Science+Business Media B.V. 2009

Abstract *Bacillus thuringiensis* HD-73 was transformed with the endochitinase gene *chiA74* under the control of a strong promoter (*pcytA*) and a 5' mRNA stabilizing (STAB-SD) sequence (HD-73-pEBchiA74). Expression levels were compared with those observed from the wild type strain (HD-73) and the recombinant HD-73 strain expressing *chiA74* under the control of its native promoter (HD-73-pEHchiA74). The chitinolytic activity of HD-73-pEBchiA74 was markedly elevated, being ~58- and 362-fold higher than, respectively, HD-73-pEHchiA74 and parental HD-73, representing the highest levels of chitinase expression in recombinant *B. thuringiensis* reported to date. Parasporal crystals measured under transmission electron microscopy showed that HD-73 produced crystals of 1.235 (± 0.214) and 1.356

(± 0.247) μm in length when the bacterium was grown in respectively, NBS and NBS with glucose. Otherwise, HD-73-pEBchiA74 synthesized crystals of 1.250 (± 0.222) and 1.139 (± 0.202) μm in length when cultivated in NBS and NBS with glucose, respectively, values that showed a diminution of ~10 and 20% compared with crystals produced by HD-73-pEHchiA74 grown under the same conditions. Comparison of viable spore counts per ml showed that HD-73-pEBchiA74 produced fewest viable spores (1.5×10^9 , 1.3×10^9), compared to HD-73-pEHchiA74 (4.9×10^9 , 5.3×10^9) and HD-73 (6.8×10^9 , 8.8×10^9) when grown in NBS and NBS supplemented with glucose, respectively. No change in cellular protease activity was observed despite the overproduction of the chitinase.

J. E. Barboza-Corona (✉) · T. Ortiz-Rodríguez · N. de la Fuente-Salcido · R. Salcedo-Hernández
Campus Irapuato-Salamanca, División Ciencias de la Vida, Departamento de Ingeniería en Alimentos, Universidad de Guanajuato, Apartado postal 311, 36500 Irapuato, Guanajuato, Mexico
e-mail: josebar@dulcinea.ugto.mx

T. Ortiz-Rodríguez
Unidad Académica de Ciencias Químico Biológicas Farmacéuticas, Universidad Autónoma de Nayarit, Tepic, Nayarit, Mexico

N. de la Fuente-Salcido
Escuela de Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Coahuila, 27440 Torreón, Coahuila, Mexico

D. K. Bideshi
Department of Natural and Mathematical Sciences, California Baptist University, 8432 Magnolia Avenue, Riverside, CA 92504, USA

D. K. Bideshi
Department of Entomology, University of California, Riverside, Riverside, CA 92521, USA

J. E. Ibarra
Departamento de Biotecnología y Bioquímica, Cinvestav-IPN, Campus Guanajuato, 36500 Irapuato, Guanajuato, Mexico

Keywords *Bacillus thuringiensis* · ChiA74 · Cry1Ac · Endochitinase · Overexpression · *pcyA/STAB*

Introduction

In vitro overproduction of proteins is crucial in industry, as higher yields per unit of culture lowers production costs (Jan et al. 2001). For example, in entomopathogenic *Bacillus thuringiensis*, marked increases in insecticidal crystal proteins (Cry) have been obtained (Park et al. 1998, 1999, 2000, 2001, 2005) using chimeric genes controlled by a dual sporulation-dependent promoter (*pcy1A*) found in the *cyt1A* gene of *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* (Waalwijk et al. 1985) and the STAB-SD sequence, a Shine-Dalgarno (SD) motif which does not direct translational initiation, but is involved in stability (STAB) of mRNA through interaction with the 3' end of 16S rRNA (Agaïsse and Lereclus 1996). Cry proteins are known to induce pore formation and ion imbalances in the membranes of insect midgut cells, leading to cytolysis, and spores subsequently penetrate the gut wall causing septicemia (Schnepf et al. 1998). Thus, the improvement of toxin yields in entomopathogenic strains could have significant applied value as they are relatively more toxic to insects when compared to parental strains.

In this regard, we are particularly interested in developing strains that hyperexpress chitinases in *B. thuringiensis* (Casique-Arroyo et al. 2007) as these enzymes have been shown to have additive entomopathogenic effects against important agronomical pests in combination with toxic parasporal crystalline inclusions (Liu et al. 2002). For example, expression in *B. thuringiensis* of bacterial chitinase genes placed under the control of their native promoters and Shine-Dalgarno sequences (Lertcanawanichakul et al. 2004; Casique-Arroyo et al. 2007) or under regulation of the p19 promoter (Sirichotpakorn et al. 2001; Thamthiankul et al. 2004) resulted in incremental increases of chitinolytic (Sirichotpakorn et al. 2001; Lertcanawanichakul et al. 2004; Thamthiankul et al. 2004; Casique-Arroyo et al. 2007) and insecticidal activities (Lertcanawanichakul et al. 2004; Thamthiankul et al. 2004). More recently, an endochitinase gene from *Nicotiana tabacum* was co-expressed with

the Cry1Ac protein gene in an acrySTALLIFEROUS strain of *B. thuringiensis* under the control of the *cry1Ac* promoter to obtain significant increases in both chitinolytic and insecticidal activities (Ding et al. 2008). The primary aim of these studies was to improve both chitinolytic and entomopathogenic activities for applied use. However, little attention has been focused on characterizing the physiological effects in *B. thuringiensis* resulting from increased chitinase production. Although several homologous chitinase genes from *B. thuringiensis* strains have been cloned and characterized (Thamthiankul et al. 2001; Barboza-Corona et al. 2003, 2008; Arora et al. 2003; Zhong et al. 2003; Lin and Xiong 2004; Driss et al. 2005), only *chiA74* under the control of its native promoter has been used to transform *B. thuringiensis* (Casique-Arroyo et al. 2007). In that work, the recombinant strain showed threefold increase in chitinase production; however, the insecticidal activity was not improved (Casique-Arroyo et al. 2007).

In the present study, we used the highly active *pcy1A/STAB-SD* expression system employed for overproducing entomocidal crystalline inclusions in *B. thuringiensis* to drive expression of *chiA74*. Our objectives were to determine if chitinase production could significantly exceed those previously reported and to characterize the effects of elevated synthesis of the enzyme on crystal toxin size and yield, intrinsic protease activity, and viable spore counts, as these are critical factors to consider for applied use of recombinant strains. Using *pcy1A/STAB-SD*, we observed an impressive ~360-fold increase in chitinase production, the highest level reported to date. In addition, although increased intrinsic protease activity was not observed, the recombinant showed a decrease in crystal toxin synthesis and size, and a significant level of reduction in viable spore counts, probably compensating factors associated with increased chitinase synthesis.

Materials and methods

Plasmids and bacterial strains

The plasmid pCHIBT containing the endochitinase *chiA74* gene from *B. thuringiensis* subsp. *kenyae* (LBIT-82) in pBluescript II KS(+) was described

previously (Barboza-Corona et al. 2003). The plasmid pPF-CH contains the *pcytA* promoters and the STAB-SD sequence (*pcyt1A*/STAB-SD) inserted into the *EcoRI* and *XbaI* sites in the *Escherichia coli*-*B. thuringiensis* shuttle vector, pHT3103 (Lereclus et al. 1989; Park et al. 1999). The *chiA74* open-reading frame was amplified by the polymerase chain reaction (PCR) using the *chiA74-2* and *chiA74-3* primers which included *SalI* and *PstI* sites to allow cloning of the amplicon into the pHT3101 vector (Table 1). PCR amplification was performed with the SuperMix high-fidelity enzyme mix (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) using an iCycler thermocycler (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) for 30 cycles of 94°C for 1 min, 55°C for 1 min, 68°C for 4 min, each, followed by a 7-min termination step at 68°C. The amplicon was purified using the QIAquick gel extraction kit (Qiagen, Valencia, CA, USA), then digested with *SalI* and *PstI* and cloned into the same sites in pPF-CH to generate pEBchiA74 (Fig. 1). This construct was propagated in *E. coli* DH5 α [*supE44*, *AlacU169* (F80*lacZ* Δ M15) *hsdR17* *recA1* *end A1* *gyrA96* *thi-1* *relA1*] and then used to transform *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD-73 (hereafter HD-73). This bacterium synthesizes a bipyramidal crystal constituted of the Cry1Ac protein (Adanj et al. 1985). *B. thuringiensis* HD-73-pEHchiA74 is a recombinant strain transformed with the endochitinase gene *chiA74* under control by its native promoter (Casique-Arroyo et al. 2007).

Transformation of *B. thuringiensis* HD-73 and screening for chitinolytic activity

The HD-73 strain was transformed by electroporation as previously described (Park et al. 2001). Transformants were selected on BHI (brain heart infusion) agar containing 25 μ g of erythromycin per ml and incubated for 24 h at 28°C. Transformants were transferred to nutrient agar with erythromycin (25 μ g ml⁻¹) and incubated for 24 h at 28°C. Colonies were spotted on Castañeda’s medium containing 0.5% (w/v) of colloidal chitin and chitinolytic activity was assessed by the presence of translucent halos around bacterial colonies as previously described (Barboza-Corona et al. 1999; Ruiz-Sánchez et al. 2005). Plasmid-enriched samples were obtained from selected colonies, as described by Reyes-Ramirez and Ibarra (2008). To confirm the

Table 1 Primers used for amplification *chiA74* and *pcytA*-STAB

Primers	Sequences ^a	Restriction sites (underlined)	References
a) <i>chiA74-1</i>	F: 5'-ACGGCTCGACCTTTCTACGTCCTTTAATAAATGGCTCCATAC-3'	<i>SalI</i>	Casique-Arroyo et al. (2007)
b) <i>chiA74-2</i>	F: 5'-ACGGCTCGACGCTAGAITTCAITTTGATTTATTGGCGTATG-3'	<i>SalI</i>	Casique-Arroyo et al. (2007)
c) <i>chiA74-3</i>	R: 5'-AACTGCGAGCGAAAAGCCTTCCCTAACAGGTGACTAT-3'	<i>PstI</i>	This work
d) <i>cyt</i> -STAB-1	F: 5'-CGGAAATCTATTTTCGATTTC-3'	<i>EcoRI</i>	This work
e) <i>cyt</i> -STAB-2	R: 5'-TGCTCTAGACTTTCTATCATATATAC-3'	<i>XbaI</i>	This work

^a Forward (F) and reverse (R) primers

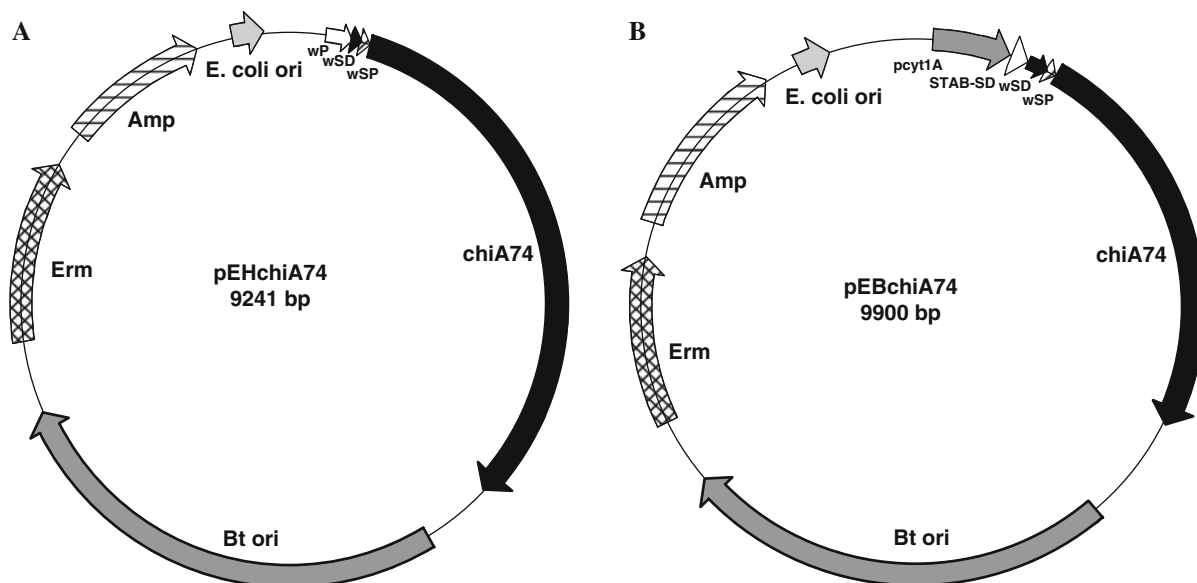


Fig. 1 Map of recombinant plasmids pEHchiA74, pEBchiA74 containing the *chiA74* gene under the control of respectively, wild promoter and *pcytA*-STAB sequence. To construct the pEHchiA74, the *chiA74* gene including its native promoter was ligated into the *SalI* and *PstI* sites of the pHT3101 plasmid. To generate the pEBchiA74, the *chiA74* open reading frame was inserted into the *SalI* and *PstI* sites of the pPF-CH vector. Bt

presence of the *pcytA*-STAB-SD *chiA74* chimeric gene, PCR was performed with *cyt*-STAB-1 and *cyt*-STAB-2 primers (Table 1) to amplify the *pcytA*-STAB-SD chimeric promoter. Also, primers *cyt*-STAB-1 and *chiA74*-3, allowed the amplification of the *pcytA*/STAB-SD *chiA74* chimeric construct.

Stability of the recombinant plasmid

Wild-type and recombinant strains were cultivated in nutrient broth (NB) with daily transfers to fresh media without erythromycin for 31 days. On selected days, cultures were diluted tenfold and 100 μ l of diluted samples was plated on NB with and without antibiotic. After 24 h incubation at 28°C, colony forming units (cfu) were quantified and the percentage of erythromycin-resistant colonies was calculated using the equation, [(erythromycin-resistant cfu) (total cfu)⁻¹] \times 100.

Chitinase assays

Recombinant and wild-type bacteria were cultivated overnight (28°C, 200 rev min⁻¹) in NB plus salts

ori, *B. thuringiensis* origin of replication; Erm, erythromycin resistance gene; Amp, ampicillin resistance gene; *E. coli* ori, *E. coli* origin of replication; wP, wild promoter; *pcytA*, *cytA* promoters; STAB-SD, mRNA stabilizing sequence and ribosome binding site; wSD, wild Shine Dalgarno sequence; wSP, wild signal peptide sequence

(NBS: 8 g l⁻¹ nutrient broth, 1.5 g l⁻¹, yeast extract, 0.05 g l⁻¹ MnCl₂, 50 mM NaH₂PO₄, 1.22 mM MgSO₄, 0.68 mM CaCl₂) (Park et al. 2001) without erythromycin to achieve an absorbance of \sim 1.7 at 600 nm. Then \sim 100 μ l of cultures containing the same number of cells were transferred to 50 ml of two different fresh media: NBS and NBS with 0.5% (w/v) glucose (Park et al. 2001). Aliquots collected at 72 h were centrifuged and the supernatants containing secreted proteins were assayed for chitinase activity, in triplicates, in a Turner fluorometer (model 450; 340-nm interference filter and 415-nm cut filter) using the fluorogenic substrate 4-methylumbelliferyl- β -D-N,N',N''-triacetylchitotriose [4-MU-(GlcNAc)₃] (Barboza-Corona et al. 2003; Ruiz-Sánchez et al. 2005). One unit (U) of chitinolytic activity was defined as the amount of enzyme required to release 1 μ mol of 4-methylumbelliferone in 1 h.

Proteolytic activity

One-hundred microliters of each supernatant prepared as described above was mixed with 400 μ l of double distilled water and 1 ml of 1% (w/v) casein in

200 mM glycine-NaOH buffer (pH 9) and incubated at 37°C for 30 min. Then, reactions were terminated by adding 3.5 ml of 4% (w/v) trichloroacetic acid, centrifuged, and the absorbance of the supernatants containing hydrolyzed casein was measured at 280 nm. A standard curve of tyrosine (0–300 $\mu\text{M}/\text{ml}$) was estimated to determine protease units (PU). One PU was defined as the amount of enzyme required to release 1 μg of tyrosine min^{-1} (Rojas-Avelizapa et al. 1999).

Chitinase detection by zymography

To confirm the presence and molecular weight of the recombinant endochitinase, bacterial cultures with the same absorbance were transferred to NBS or NBS with 0.5% (w/v) glucose without erythromycin and grown for 72 h. Cultures were centrifuged and supernatants were concentrated by adding ammonium sulfate to 80% saturation. Concentrated proteins were resuspended in 2 ml of 100 mM phosphate buffer and dialyzed overnight against the same buffer. Protein samples were denatured in Laemmli's disruption buffer (Laemmli 1970) and fractionated in a 12% (w/v) SDS-PAGE. Proteins were renatured by removing SDS and 2-mercaptoethanol with casein-EDTA wash buffer (10 g l^{-1} casein, 2 mM EDTA, 40 mM Tris-HCl, pH 9). Detection of chitinase activity after gel electrophoresis was measured using 4-MU-GlcNAc, 4-MU-(GlcNAc)₂ and 4-MU-(GlcNAc)₃ using the same conditions as previously described (Barboza-Corona et al. 2003, 2008).

Effect of increased chitinase synthesis of CryIAc crystal size

Because the expression of the *cryIAc* gene might be affected by the simultaneous overexpression of the *chiA74* gene in the recombinant strain, the size of crystalline inclusions produced by the recombinant and the wild-type strains were compared under transmission electron microscopy (TEM). Both strains were cultured in NBS and NBS + glucose (Park et al. 2001; Casique-Arroyo et al. 2007) media without antibiotic until complete autolysis was observed under phase contrast microscopy (Axio Imager.A1 Zeiss). Spore-crystal complexes were then washed by centrifugation three times and pellets resuspended in double distilled water (ddH₂O). The

volume was adjusted to obtain appropriate crystal spreading as observed by phase contrast microscopy. Then, 2 μl of each suspension were dispersed on a TEM formvar-coated grid and air-dried. Subsequently, 2 μl of 1.5% (w/v) phosphotungstic acid (pH 6.8) was laid on top of the dried samples for 2 min, which were then submerged in ddH₂O. Grids were air-dried and examined and photographed in a Phillips Morgani electron microscope operated at an accelerating voltage of 70 Kv and 5,600 X magnification. The length of 75–414 bipyrarnidal crystals per sample was individually measured from the photographs. Measurements were subjected to ANOVA and Tukey's analyses to determine statistical significance between crystal sizes in the wild-type and recombinant strains.

Effect of chitinase overexpression on spore count

About 100 μl of autolysed cultures (72 h) were incubated at 60°C for 20 min to destroy any remaining vegetative cells (Park et al. 2001). After serial dilution (10^{-5} – 10^{-7}), suspensions were plated on nutrient agar without erythromycin and incubated at 28°C for 24 h to determine the number of viable spores produced by each strain in each medium. Data were analyzed with the ANOVA program (StatSoft Inc.). Experiments were replicated three times on three different days.

Results

Construction of the recombinant strain and plasmid stability

HD-73 cells were transformed with the recombinant plasmid pEBchiA74 (Fig. 1) and grown on a medium with antibiotic. Subsequently, erythromycin resistant colonies were cultured on medium containing colloidal chitin as carbon source. From the transformants, a colony surrounded by a visible halo was selected and named HD-73-pEBchiA74. To corroborate the integrity of this recombinant strain and also the integrity of HD-73-pEHchiA74 and HD-73 used in this work (Casique-Arroyo et al. 2007), PCR analysis was performed. Plasmid preparations (Reyes-Ramirez and Ibarra 2008) were isolated from the wild type HD-73 and also from recombinant HD-73-pEHchiA74,

HD-73-pEBchiA74. When enrichment plasmid preparations were analyzed with *chiA74*-1 and *chiA74*-3 (primers a and c, Table 1), primers that allowed amplification of *chiA74* with its native promoter and transcription terminator (Table 1; Fig. 2a), we found that the three strains produce an amplicon of ~2.5 kbp (Fig. 2b, lines 1–3). It is important to note that we have recently identified and cloned a *chiA74* gene homologue (i.e. *chiA-HD73*) located on the chromosome of HD-73 that shows 98% identity at the nucleotide level with *chiA74* (Barboza-Corona et al. 2008). Therefore, to confirm that HD-73-pEBchiA74

harbored *chiA74* under control of *pcyt1A*/STAB-SD, PCR reactions were performed using specific primers (Table 1; Fig. 2a). With *cyt*-STAB-1 and *cyt*-STAB-2 (primers d and e, Table 1), amplicons of ~0.6 kbp were obtained in HD-73-pEBchiA74 (Fig. 2c, line 3) and pPF-CH plasmid (Fig. 2c, line 4), whereas with *chiA74*-2 and *chiA74*-3 (primers b and c, Table 1) and also with *cyt*-STAB-1 and *chiA74*-3 (primers d and c, Table 1), amplicons of respectively, ~2.3 (Fig. 2b, lane 3, primers b, c) and 2.5 kbp (Fig. 2c, lane 3, primers d, c) were obtained. No amplifications were found with HD-73 and HD-73-pEHchiA74

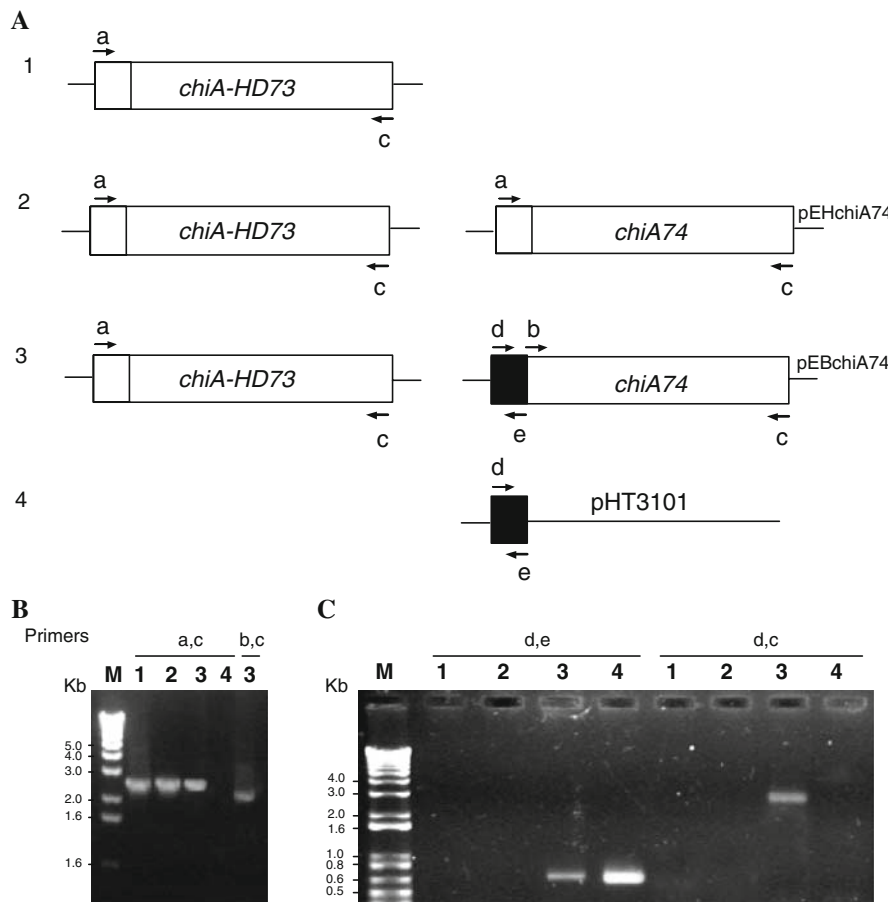


Fig. 2 Detection of *chiA74* gene in recombinant strains of *B. thuringiensis*. **a** Schematic representations of amplification of *chiA-HD73* and *chiA74* genes under the control of different promoters in (1) HD-73, (2) HD-73-pEHchiA74, (3) HD-73-pEBchiA74 strains and (4) pHT3101 vector containing the *cytA* promoters and STAB-SD sequence (pPF-CH vector). Sequence of primers used for amplification is described on Table 1. Primers a and c allow amplification of *chiA-HD73* and *chiA74* genes with their native promoters and transcription terminator;

b and c permit amplification of open reading frame (orf) of *chiA74* and its transcription terminator; d and e amplify *pcytA*/STAB-SD sequence; d and c allow amplification of *chiA74* under the control of *pcytA*/STAB-SD sequence. **b** Amplification of *chiA-HD73*, *chiA74* wild-type genes (lines 1, 2, 3, primers a, c) and *chiA74* orf (lines 3, primers b, c). **c** Amplification of *pcytA*-STAB sequence (lines 3, primer d, e), and *chiA74* gene under the control of *pcytA*/STAB-SD sequence (line 3, primers d, c)

strains (Fig. 2c, lanes 1, 2) either by using the cyt-STAB-1 and cyt-STAB-2 primers nor cyt-STAB-1 and chiA74-3, indicating that these strains did not harbor *chiA74* under the control *pcyt1A/STAB-SD* I.

The HD-73-pEBchiA74 recombinant strain showed pEBchiA74 plasmid stability under non-selective pressure. When the recombinant bacterium was cultivated in NB without erythromycin with daily transfers for 31 days, 90% of erythromycin resistant colonies were obtained. The high segregational stability of pEBchiA74 suggests that this recombinant could be stably maintained after several passages, similar to the pBCX shuttle vector (Lertcanawanichakul and Wiwat 2000), or pHYA2 and pEHchiA74 harboring chitinase genes (Lertcanawanichakul et al. 2004; Casique-Arroyo et al. 2007).

Analysis of chitinase and protease production

Bacteria were grown in NBS and NBS supplemented with 0.5% (w/v) glucose and the effect of these media on Cry, chitinase and protease production was examined. NB plus salts and glucose medium has been previously shown to promote larger amounts of crystalline inclusions and spores (Park et al. 2001). However, it has been also demonstrated that glucose inhibits endogenous chitinase expression by catabolic repression (Saito et al. 1998; Felse and Panda 1999) while at the same time allows for the synthesis of larger crystals with a higher content of Cry proteins in a semisynthetic medium (Scherrer et al. 1973).

Independent of medium constitution, the highest chitinase yield was obtained with HD-73-pEBchiA74, followed by HD-73-pEHchiA74 and HD-73 (Fig. 3a). The highest yields were detected in NBS without glucose, with values of ~29,000, 500 and 80 U/ml for, respectively, HD-73-pEBchiA74, HD-73-pEHchiA74 and HD-73. This result clearly showed that when HD-73 was transformed with a chitinase gene under regulation of the strong *pcyt1A/STAB-SD* promoter, a marked incremental increase in chitinase production of ~58- and 362-fold compared with, respectively, the strain transformed with *chiA74* regulated by its native promoter and the wild-type bacterium was obtained. Similarly, when bacteria were grown in NBS with glucose, HD-73-pEBchiA74 produced ~35- and 190-fold higher levels of chitinase than, respectively, HD-73-pEHchiA74 and HD-73. This result indicated that when bacteria were grown in a medium with glucose decreases of ~50, 20 and 5% were observed in, respectively, 73-pEBchiA74, HD-73-pEHchiA74 and HD-73, when compared to growth in NBS lacking glucose. In other regards, little or no change in protease production was observed when bacteria were grown in media with or without glucose (Fig. 3b).

Detection of chitinase after gel electrophoresis

Supernatants of bacteria cultures growing in NBS plus glucose were concentrated and equal amounts of protein preparations were fractionated by gel

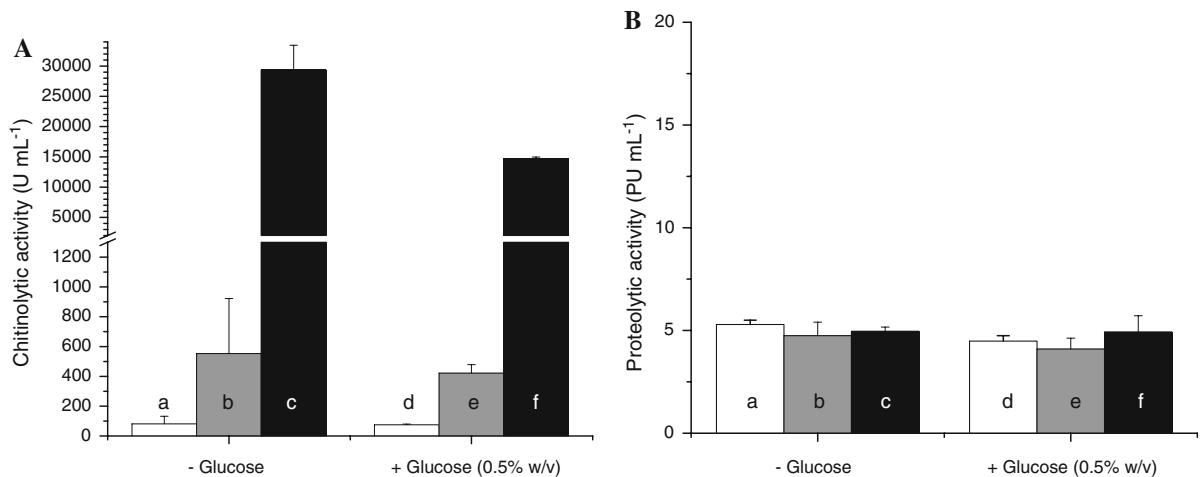


Fig. 3 **a** Chitinolytic and **b** proteolytic activities of wild and recombinant strains grown on NB plus salts without glucose (–glucose) or NB plus salts and glucose (+glucose). (a, d) HD-73, (b, e) HD-73-pEHchiA74 and (c, f) HD-73-pEBchiA74

electrophoresis (SDS–PAGE) for detection of chitinolytic activity with three fluorescent substrates. ChiA74 protein has a predicted molecular mass of 74.5 kDa, but in the processed form it is ~ 71 kDa (Barboza-Corona et al. 2003). With 4-MU-(GlcNAc)₂ (Fig. 4b) and 4-MU-(GlcNAc)₃ (Fig. 4c) but not with 4-MU-GlcNAc (data not shown), we detected enzymatic activity associated with proteins of molecular masses corresponding to ~ 70 kDa (Fig. 4a) i.e. corresponding to the ChiA74 and ChiA-HD73 endochitinases (Barboza-Corona et al. 2003, 2008). Although zymogram analysis is not a quantitative method and gels were exposed to UV light (312 nm) for only a short period of time to avoid image saturation, HD-73-pEBchiA74 showed the strongest activity for proteins of ~ 70 kDa, followed by HD-73-pEHchiA74 and HD-73. This result is correlated well with the robust enzymatic activity detected in the strain transformed with *chiA74* under the control of *pcyt1A/STAB-SD* (Fig. 3). Data were consistent on three zymograms performed on three different days. It is important to note that signals observed with proteins of ~ 70 kDa in HD-73-pEBchiA74 and HD-73-pEHchiA74 could be due to the release of MU by the combined action of both ChiA-HD73 and ChiA74 whereas in the wild type HD-73 the chitinase activity is conferred by ChiA-HD73. Similar results were observed when zymograms were carried out using secreted proteins of bacteria grown in NBS without glucose (data not shown). Additionally, a protein of

~ 30 kDa was detected with trimeric and tetrameric fluorogenic derivatives (Fig. 4b, c) and a faint signal was observed with the dimeric substrates (data not shown) suggesting that this protein could be an exochitinase. As the three strains showed comparable fluorescence signals for the protein of ~ 30 -kDa, expression of this chitinase might be not affected by the presence of *chiA74* gene under the control of the wild promoter or *pcytA/STAB*.

Effect on crystal size

The mean length of parasporal crystals, measured under TEM (Fig. 5; Table 2), indicated that HD-73 produced larger crystals when cultured in NBS supplemented with glucose than NBS without glucose (1.356 vs. 1.235 μm). The mean crystal size of HD-73-pEHchiA74 and HD-73-pEBchiA74, grown on NBS without glucose, was 1.357 and 1.250 μm , respectively, whereas when grown with supplementary glucose they averaged 1.376 and 1.139 μm , respectively. Statistical analyses of the data showed significant differences at $P < 0.001$ (Table 2). Interestingly, crystal size of HD-73-pEHchiA74 grown either with or without supplementary glucose, showed no statistical differences, whereas HD-73-pEBchiA74 produced significantly larger crystals without supplementary glucose than when grown with it. Also, crystals produced by HD-73 (1.356 μm)

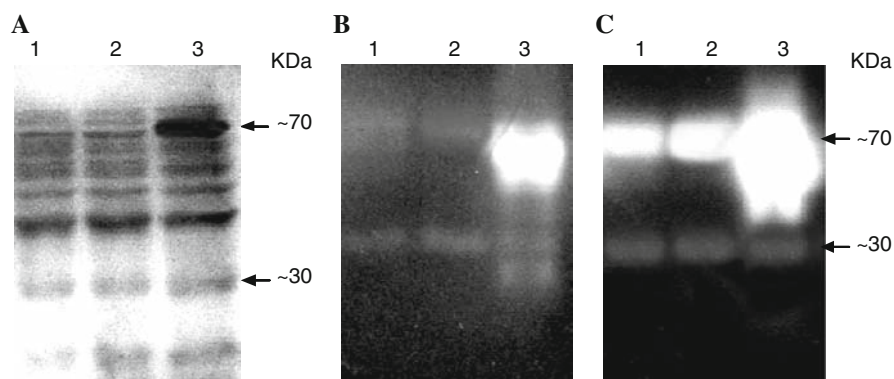


Fig. 4 a SDS–PAGE and identification of chitinolytic enzymes from wild-type and recombinant strains with b 4-MU-(GlcNAc)₂ and c 4-MU-(GlcNAc)₃. Bacteria were cultivated in NBS supplemented with glucose and secreted proteins were concentrated using ammonium sulfate. About ~ 3 μg of

each sample was separated in SDS–PAGE gel and the chitinolytic activity was detected with fluorogenic synthetic derivatives. Lane 1, HD-73; lane 2, HD-73-pEHchiA74; lane 3, HD-73-pEBchiA74. For determination of molecular masses a BenchMark protein ladder (Invitrogen) was used

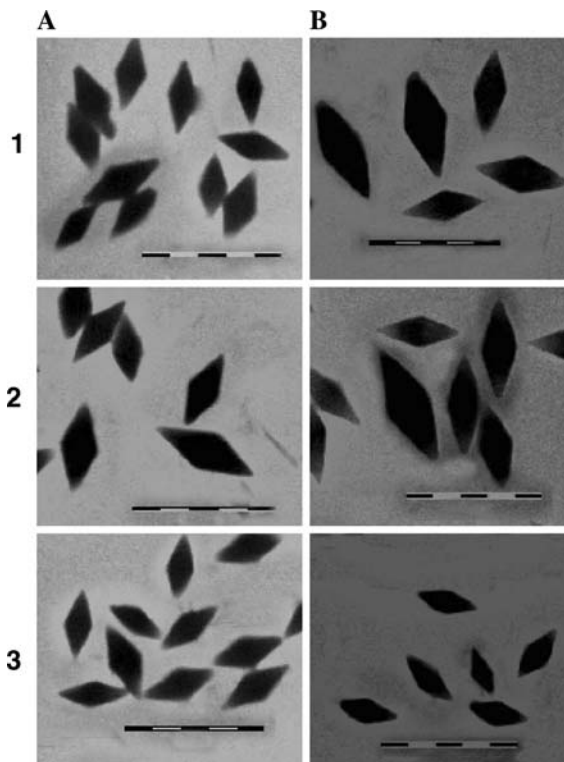


Fig. 5 Transmission electron microscopy of negatively stained crystals produced by wild-type and recombinant strains of *Bacillus thuringiensis*. **a** Strains grown on NBS and **b** NBS supplemented with glucose. HD-73 (1); HD-73-pEHchiA74 (2); and HD-73-pEBchiA74 (3). Micrographs show examples of randomly selected parasporal crystals. Bars, 2 μ m

and HD-73-pEHchiA74 (1.376 μ m) grown with supplementary glucose, showed no difference, as previously reported (Casique-Arroyo et al. 2007).

Effect of chitinase overexpression on spore count

Comparative analyses of spore counts showed that independent of media, recombinant strain expressing *chiA74* under the control of *pcyt1A*/STAB-SD produced fewer viable spores, followed by bacteria expressing *chiA74* with its native promoter and the HD-73 wild-type strain. HD-73, HD-73-pEHchiA74 and HD-73-pEBchiA74 growing on NBS produced, respectively, 6.8×10^9 , 4.9×10^9 and 1.5×10^9 spores/ml; whereas when grown in NBS supplemented with glucose, corresponding counts were 8.8×10^9 , 5.3×10^9 and 1.3×10^9 spores/ml. These results indicated that HD-73 expressing *chiA74* under the control of the native promoter showed a ~30–40% decrease in sporulation, whereas HD-73 expressing *chiA74* under the control of *pcyt1A*/STAB-SD showed a decrease of ~75–85%, compared to the wild-type strain, when grown in the absence or presence of glucose (Table 2).

Discussion

To our knowledge, this is the first report of a recombinant strain of *B. thuringiensis* transformed with a homologous chitinase gene under the control of strong *pcyt1A*/STAB-SD promoter sequence, an expression system used to markedly improve yields of entomocidal Cry proteins and the binary toxin (Bin) of *B. thuringiensis* and *Bacillus sphaericus*, respectively (Park et al. 1998, 2005). To study the effect of this expression system on chitinase production and to test the influence of glucose on the

Table 2 Mean parasporal crystal length and mean viable spore counts from wild-type and recombinant strains, grown on different media

Strain	Number of crystal	Crystal size (μ m) (\pm SD)	Spores/ml $\times 10^7$ (\pm SD)
NBS without glucose			
HD-73	414	1.235 (\pm 0.214)b*	675.5 (14.1)b*
HD-73-pEHchiA74	317	1.357 (\pm 0.252)a	485.5 (24.7)d
HD-73-pEBchiA74	231	1.250 (\pm 0.222)b	153.5 (7.7)e
NBS with glucose			
HD-73	134	1.356 (\pm 0.247)a	882.0 (9.9)a
HD-73-pEHchiA74	75	1.376 (\pm 0.227)a	528.5 (12.0)c
HD-73-pEBchiA74	245	1.139 (\pm 0.202)c	132.0 (8.5)f

* Values followed by different letters in the same column are significantly different at $P < 0.001$ (size) and $P = 0.05$ (spore count)

synthesis of both chitinase and Cry proteins, the physiological changes in a wild-type strain (HD-73) and two recombinant strains of *B. thuringiensis* transformed with *chiA74* under the control of its wild-type promoter (HD-73-pEH*chiA74*) and *pcyA*/STAB-SD (HD-73-pEB*chiA74*) were studied. We showed that the marked improvement in chitinase yield with the chimeric expression system resulted in physiologic effects related to a slight decrease in Cry1Ac crystal size and significant reduction in spore count, probably compensating effects for the marked increment (~362-fold) in enzyme synthesis.

Our observation that the HD-73 wild-type strain produced chitinase when grown for ~72 h (Fig. 3) in a medium lacking chitin as inducer but containing glucose was somewhat surprising, as glucose is known to suppress chitinase synthesis by catabolic repression (Saito et al. 1998; Felse and Panda 1999). Although the specific reason why this occurred is unknown, it is possible that after 72 h, glucose levels could have been exhausted resulting in upregulation of the chitinase gene, a phenomenon known to occur as bacterial cultures age (Carsolio et al. 1994). In addition, whether the HD-73 chitinase gene is expressed constitutively or whether point mutations have accrued in the promoter to confer constitutive expression (Ni and Westpheling 1997; Arora et al. 2003) is unknown. When the native promoter of *chiA74* was replaced with the strong expression system (*pcyA*-STAB), the resulting HD-73-pEB*chiA74* strain showed a 362-fold increase in chitinase production, the highest level reported to date for *B. thuringiensis* and independent of whether the bacterium was grown in medium with or without glucose. In this regard, it is important to note that in the chimeric construct the native ribosome binding site and the putative signal peptide sequences of *chiA74* were retained (Barboza-Corona et al. 2003) (Fig. 1) to allow secretion of recombinant chitinase in HD-73. Additionally, dot-blot analysis performed with samples amplified by Reverse Transcription PCR to determine the relative synthesis of *chiA74*-specific mRNA showed that transcript level in HD-73-pEB*chiA74* was higher than in strains HD-73-pEH*chiA74* and HD-73 (data not shown). This result suggests that the high level of *ChiA74* synthesis in HD-73-pEB*chiA74* is related to higher levels of expression and/or greater mRNA stability conferred by *pcyA*/STAB-SD.

Because the insecticidal Cry proteins of *B. thuringiensis* are among the most important components for applied use, one of the aims of the present study was to hyper-produce chitinase in *B. thuringiensis* while incurring little or no deleterious effects on the crystal toxin size, yield and sporulation. To this end, we used a rich medium previously demonstrated to allow high levels of synthesis of entomocidal crystal proteins (Park et al. 2001) and modified the glucose concentration to control chitinase synthesis by catabolic repression (Felse and Panda 1999) and the size of crystalline inclusions (Scherrer et al. 1973). We assayed different glucose concentration [0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5% (data not shown)] and selected 0.5% (w/v) because results were reproducible at this concentration. Although the level of chitinase production was higher without glucose, the decrease observed at 72 h in all strains in a medium supplemented with glucose was not as notable, possibly because *chiA74* expression was not regulated by glucose concentrations or this compound was depleted (see Fig. 3). The increment in chitinase production had an effect on the size of the Cry1Ac crystalline inclusion in the recombinant strain, possibly because of a diminution of Cry1Ac synthesis. The decrease in crystal size probably is due to competition for nutrient precursors for chitinase and Cry1Ac synthesis and not by an increase in Cry1Ac proteolysis, as production of proteases were not affected by chitinase production (Fig. 3).

Apparently, the presence of glucose in the culture medium allows the wild-type strain to produce larger crystals, as compared when grown in medium without supplementary glucose. This result showed the influence of glucose concentration as an important factor that positively influences the crystal size in *B. thuringiensis*, as reported previously (Scherrer et al. 1973). In contrast, the effect of glucose on the crystal size of the recombinant strains was not clear. No difference in crystal size was observed in HD-73-pEH*chiA74* grown with or without supplementary glucose, whereas crystals produced by HD-73 expressing *chiA74* under the control of the *pcyA*/STAB were larger when grown without supplementary glucose than without it. The explanation for these observations is unknown and further studies will be required to understand this phenomenon. However, probably the *pcyA*/STAB promoter is negatively regulated by glucose metabolism, a proposal that remains to be resolved.

The presence of glucose in the culture medium also affected sporulation. In general, when a medium was supplemented with glucose, an increment in the spore yield was observed. It is an interesting observation as an increment in spore production is associated with an increment in Cry yield (one spore and crystal per cell). Recently it has been reported that if glucose is added to a medium at concentration higher than 7.5% (w/v), a delay of sporulation occurs (Berbert-Molina et al. 2008). In particular, HD-73-pEBchiA74 showed a reduction of ~75–85% in spore yield after growth in NBS or NBS plus glucose compared with the wild type strain. For potential applied use, reduction in spore count and crystal production is undesirable, as these are important factors in the insecticidal activity of *B. thuringiensis*.

Finally, we showed that *pcytIA*/pSTAB-SD is a useful expression system for significantly enhancing yields of a protein (chitinase) other than Cry proteins of *B. thuringiensis* and it could be an important system for expressing other proteins with biotechnological value. Our future objectives are to develop culture systems that allow not only increased chitinase yields with the *pcytIA*/pSTAB-SD expression system, but more importantly, systems that will increase sporulation and Cry1Ac protein yields in the recombinant bacterium described here. Additionally, genetically manipulating the Cry1Ac gene using 3' mRNA stabilizing sequences, chimeric promoters, or by the inclusion of helper protein genes that encode putative molecular chaperones may be beneficial for achieving our goal (Park et al. 2007). These studies will be required to determine the optimal conditions for expressing ChiA74 and maximizing both crystal toxin and spore yield to enhance the insecticidal activity of the recombinant strain.

Acknowledgments This research was supported by grant (SEP-CONACYT-2003-C02-44990, México) to J.E.B.-C. The authors are grateful for the essential material provided by Brian A. Federici (University of California, Riverside) and Hyun-Woo Park (Florida A&M University) for the pPF-CH vector and whose group developed the *pcytIA*/STAB-SD expression system. In addition, we thank Gabriela Casique-Arroyo, Laura Cortez, Regina Basurto and Aurora Verver for their excellent technical support. Tomas Ortiz-Rodríguez and Norma de la Fuente-Salcido are, respectively, undergraduate and graduate students supported by CONCYTEG and CONACYT, México, fellowships.

References

- Adanj MJ, Staver MJ, Rocheleau TA, Leighton J, Barker RF, Thompson DV (1985) Characterized full-length and truncated plasmid clones of the crystal protein of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD-73 and their toxicity to *Manduca sexta*. *Gene* 36:289–300. doi:10.1016/0378-1119(85)90184-2
- Agaisse H, Lereclus D (1996) STAB-SD: a Shine-Dalgarno sequence in the 5' untranslated region is a determinant of mRNA stability. *Mol Microbiol* 20:633–643. doi:10.1046/j.1365-2958.1996.5401046.x
- Arora N, Ahmad T, Rajagopal R, Bhatnagar RK (2003) A constitutively expressed 36 kDa exochitinase from *Bacillus thuringiensis* HD-1. *Biochem Biophys Res Commun* 307:620–625. doi:10.1016/S0006-291X(03)01228-2
- Barboza-Corona JE, Contreras JC, Velázquez-Robledo R, Bautista-Justo M, Gómez-Ramírez M, Cruz-Camarillo R, Ibarra JE (1999) Selection of chitinolytic strains of *Bacillus thuringiensis*. *Biotechnol Lett* 21:1125–1129. doi:10.1023/A:1005626208193
- Barboza-Corona JE, Nieto-Mazzocco E, Velázquez-Robledo R, Salcedo-Hernández R, Bautista M, Jiménez B, Ibarra JE (2003) Cloning, sequencing, and expression of the chitinase gene *chiA74* from *Bacillus thuringiensis*. *Appl Environ Microbiol* 69:1023–1029. doi:10.1128/AEM.69.2.1023-1029.2003
- Barboza-Corona JE, Reyes-Rios DM, Salcedo-Hernández R, Bideshi D (2008) Molecular and biochemical characterization of an endochitinase (ChiA-HD73) from *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD-73. *Mol Biotechnol* 39:29–37. doi:10.1007/s12033-007-9025-4
- Berbert-Molina MA, Prata AM, Pessanha LG, Silveira MM (2008) Kinetics of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* growth on high glucose concentration. *J Ind Microbiol Biotechnol* 35:1397–1404. doi:10.1007/s12029-008-0439-1
- Carsolio C, Gutiérrez A, Jiménez B, Van Montagu M, Herrera-Estrella A (1994) Characterization of *ech-42*, a *Trichoderma harzianum* endochitinase gene expressed during mycoparasitism. *Proc Natl Acad Sci USA* 91:10903–10907. doi:10.1073/pnas.91.23.10903
- Casique-Arroyo G, Bideshi D, Salcedo-Hernández R, Barboza-Corona JE (2007) Development of a recombinant strain of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD-73 that produces the endochitinase ChiA74. *Antonie Van Leeuwenhoek* 92:1–9. doi:10.1007/s10482-006-9127-1
- Ding X, Luo Z, Gao B, Sun Y, Zhang Y (2008) Improving the insecticidal activity by expression of a recombinant cry1Ac gene with chitinase-encoding gene in acrySTALLIFEROUS *Bacillus thuringiensis*. *Curr Microbiol* 56:442–446. doi:10.1007/s00284-008-9112-1
- Driss F, Kallassy-Awad M, Zouari N, Jaoua S (2005) Molecular characterization of a novel chitinase from *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki*. *J Appl Microbiol* 99:945–953. doi:10.1111/j.1365-2672.2005.02639.x
- Felse PA, Panda T (1999) Regulation and cloning of microbial chitinase genes. *Appl Microbiol Biotechnol* 51:141–151. doi:10.1007/s002530051374
- Jan J, Valle F, Bolivar F, Merino E (2001) Construction of protein overproducer strains in *Bacillus subtilis* by an

- integrative approach. *Appl Microbiol Biotechnol* 55:69–75. doi:[10.1007/s002530000448](https://doi.org/10.1007/s002530000448)
- Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680–685. doi:[10.1038/227680a0](https://doi.org/10.1038/227680a0)
- Lereclus D, Arantes O, Chaufaux J, Lecadet MM (1989) Transformation and expression of a cloned δ -endotoxin gene in *Bacillus thuringiensis*. *FEMS Microbiol Lett* 60:211–218
- Lertcanawanichakul M, Wiwat C (2000) Improved shuttle vector for expression of chitinase gene in *Bacillus thuringiensis*. *Lett Appl Microbiol* 31:123–128. doi:[10.1046/j.1365-2672.2000.00777.x](https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2000.00777.x)
- Lertcanawanichakul M, Wiwat C, Bhumiratana A, Dean DH (2004) Expression of chitinase-encoding genes in *Bacillus thuringiensis* and toxicity of engineered *B. thuringiensis* subsp. *aizawai* toward *Lymantria dispar* larvae. *Curr Microbiol* 48:175–181. doi:[10.1007/s00284-003-4119-0](https://doi.org/10.1007/s00284-003-4119-0)
- Lin Y, Xiong G (2004) Molecular cloning and sequence analysis of the chitinase gene form *Bacillus thuringiensis* serovar *alesti*. *Biotechnol Lett* 26:635–639. doi:[10.1023/B:BILE.0000023021.50213.ed](https://doi.org/10.1023/B:BILE.0000023021.50213.ed)
- Liu M, Cai QX, Liu HZ, Zhang BH, Yang JP, Yuan ZM (2002) Chitinolytic activities in *Bacillus thuringiensis* and their synergistic effects on larvicidal activity. *J Appl Microbiol* 93:374–379. doi:[10.1046/j.1365-2672.2002.01693.x](https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2002.01693.x)
- Ni X, Westpheling J (1997) Direct repeat sequences in the *Streptomyces* chitinase-63 promoter direct both glucose repression and chitin induction. *Proc Natl Acad Sci USA* 94:13116–13121. doi:[10.1073/pnas.94.24.13116](https://doi.org/10.1073/pnas.94.24.13116)
- Park HW, Ge B, Bauer LS, Federici BA (1998) Optimization of Cry3A yields in *Bacillus thuringiensis* by use of sporulation-dependent promoters in combination with the STAB-SD mRNA sequence. *Appl Environ Microbiol* 64:3932–3938
- Park HW, Bideshi DK, Johnson JJ, Federici BA (1999) Differential enhancement of Cry2A versus Cry11A yields in *Bacillus thuringiensis* by use of the *cry3A* STAB mRNA sequence. *FEMS Microbiol Lett* 181:319–327. doi:[10.1111/j.1574-6968.1999.tb08862.x](https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1999.tb08862.x)
- Park HW, Bideshi DK, Federici BA (2000) Molecular genetic manipulation of truncated Cry1C protein synthesis in *Bacillus thuringiensis* to improve stability and yield. *Appl Environ Microbiol* 66:4449–4455. doi:[10.1128/AEM.66.10.4449-4455.2000](https://doi.org/10.1128/AEM.66.10.4449-4455.2000)
- Park HW, Delécluse A, Federici BA (2001) Construction and characterization of a recombinant *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* strain that produces Cry11B. *J Invertebr Pathol* 78:37–44. doi:[10.1006/jipa.2001.5038](https://doi.org/10.1006/jipa.2001.5038)
- Park HW, Bideshi DK, Wirth MC, Johnson JJ, Walton WE, Federici BA (2005) Recombinant larvicidal bacteria with markedly improved efficacy against culex vectors of the west Nile virus. *Am J Trop Med Hyg* 72:732–738
- Park HW, Bideshi DK, Federici BA (2007) The 20-kDa protein of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* enhances *Bacillus sphaericus* 2362 Bin toxin synthesis. *Curr Microbiol* 55:119–124. doi:[10.1007/s00284-006-0359-0](https://doi.org/10.1007/s00284-006-0359-0)
- Reyes-Ramirez A, Ibarra JE (2008) Plasmid patterns of *Bacillus thuringiensis* type strains. *Appl Environ Microbiol* 74:125–129. doi:[10.1128/AEM.02133-07](https://doi.org/10.1128/AEM.02133-07)
- Rojas-Avelizapa LI, Cruz-Camarillo R, Guerrero MI, Rodríguez-Vázquez R, Ibarra JE (1999) Selection and characterization of a proteo-chitinolytic strain of *Bacillus thuringiensis*, able to grow in shrimp waste media. *World J Microbiol Biotechnol* 15:261–268. doi:[10.1023/A:1008947029713](https://doi.org/10.1023/A:1008947029713)
- Ruiz-Sánchez A, Cruz-Camarillo R, Salcedo-Hernández R, Ibarra J, Barboza-Corona JE (2005) Molecular cloning and purification of an endochitinase from *Serratia marcescens* (Nima). *Mol Biotechnol* 31:103–111. doi:[10.1385/MB:31:2:103](https://doi.org/10.1385/MB:31:2:103)
- Saito A, Fujii T, Yoneyama T, Miyashita K (1998) *glkA* is involved in glucose repression of chitinase production in *Streptomyces lividans*. *J Bacteriol* 180:2911–2914
- Scherrer P, Lüthy P, Trumpf B (1973) Production of d-endotoxin by *Bacillus thuringiensis* as a function of glucose concentration. *Appl Microbiol* 25:644–646
- Schnepf F, Crickmore N, Van Rie J, Lereclus D, Baum J, Feitelson D, Zeigler DR, Dean DH (1998) *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. *Microbiol Mol Biol Rev* 62:775–806
- Sirichotpakorn N, Rongnoparut P, Choosang K, Panbangred W (2001) Coexpression of chitinase and the *cryIIAa1* toxin genes in *Bacillus thuringiensis* serovar *israelensis*. *J Invertebr Pathol* 78:160–169. doi:[10.1006/jipa.2001.5058](https://doi.org/10.1006/jipa.2001.5058)
- Thamthiankul S, Suan-Ngay S, Tantimavanich S, Panbangred W (2001) Chitinase from *Bacillus thuringiensis* subsp. *pakistani*. *Appl Microbiol Biotechnol* 56:395–401. doi:[10.1007/s002530100630](https://doi.org/10.1007/s002530100630)
- Thamthiankul S, Moar WJ, Miller ME, Panbangred W (2004) Improving the insecticidal activity of *Bacillus thuringiensis* subsp. *aizawai* against *Spodoptera exigua* by chromosomal expression of a chitinase gene. *Appl Microbiol Biotechnol* 65:183–192. doi:[10.1007/s00253-004-1606-6](https://doi.org/10.1007/s00253-004-1606-6)
- Waalwijk C, Dullemans AM, Workman MES, Visser B (1985) Molecular cloning and the nucleotide sequence of the Mr 28, 000 crystal protein gene of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. *Nucleic Acids Res* 13:8207–8217. doi:[10.1093/nar/13.22.8207](https://doi.org/10.1093/nar/13.22.8207)
- Zhong WF, Jiang LH, Yan WZ, Cai PZ, Zhang ZX, Pei Y (2003) Cloning and sequence of chitinase gene from *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. *Yi Chuan Xue Bao* 30:364–369

Enhanced synthesis and antimicrobial activities of bacteriocins produced by Mexican strains of *Bacillus thuringiensis*

N. de la Fuente-Salcido · Ma. Guadalupe Alanís-Guzmán · D. K. Bideshi ·
R. Salcedo-Hernández · M. Bautista-Justo · J. E. Barboza-Corona

Received: 9 May 2008 / Revised: 24 June 2008 / Accepted: 9 July 2008 / Published online: 25 July 2008
© Springer-Verlag 2008

Abstract Recently, we reported the synthesis of five bacteriocin-like inhibitor substances (Bt-BLIS: morricin 269, kurstacin 287, kenyacin 404, entomocin 420, and tolworthcin 524) by Mexican strains of *Bacillus thuringiensis*. Here we show that, collectively, these Bt-BLIS have a moderate to broad spectrum of antibacterial activity, being toxic to clinically significant against Gram-positive and Gram-negative bacteria, including common etiological agents of human diseases, such as strep throat and scarlet fever, septicemia, pneumonia, urinary tract infection, and emetic and

gastrointestinal syndromes. Although synthesis of the five Bt-BLIS was independent of the presence of a target inducing bacterium, we demonstrated for the first time that a proteinaceous component(s) secreted by, or liberated by proteolytic cleavage of *Bacillus cereus* 183 following treatment with proteinase K, enhanced Bt-BLIS synthesis.

Keywords *Bacillus thuringiensis* · Bacteriocins · Antibacterial activity · Enhancement

Communicated by Erko Stackebrandt.

N. de la Fuente-Salcido · R. Salcedo-Hernández ·
M. Bautista-Justo · J. E. Barboza-Corona (✉)
Departamento de Ingeniería en Alimentos,
Universidad de Guanajuato, Instituto de Ciencias Agrícolas,
Apartado postal 311, 36500 Irapuato, Guanajuato, Mexico
e-mail: josebar@dulcinea.ugto.mx

N. de la Fuente-Salcido
Universidad Autónoma de Coahuila,
Escuela de Ciencias Biológicas,
27440 Torreon, Coahuila, Mexico

N. de la Fuente-Salcido · Ma. Guadalupe Alanís-Guzmán
Universidad Autónoma de Nuevo León. Facultad de
Ciencias Biológicas, San Nicolás de los Garza,
Nuevo Leon, Mexico

D. K. Bideshi
Department of Natural and Mathematical Sciences,
California Baptist University, 8432 Magnolia Avenue,
Riverside, CA 92504, USA

D. K. Bideshi
Department of Entomology, University of California,
Riverside, CA 92521, USA

Introduction

As artificial additives used for food preservation can produce undesirable health effects, many consumers are demanding the substitution of potentially harmful artificial ingredients with safe and natural compounds. As such, there is growing interest in expanding the use of effective natural antimicrobials such as thymol, carvacrol and bacteriocins as preservatives (Olasupo et al. 2003). In particular, bacteriocins are natural antimicrobial peptides synthesized and secreted by bacteria, and have the capacity to inhibit growth of closely related species thereby eliminating or significantly reducing competition for available nutrients (Paik et al. 1997; Simon et al. 2002; Matthewes 2004). Currently, nisin, an antimicrobial peptide synthesized by *Lactococcus lactis*, is the only bacteriocin that is generally recognized as safe (GRAS) for human consumption. However, the use of nisin is limited as it is ineffective against Gram-negative bacteria (Olasupo et al. 2003). Thus, there is considerable interest in identifying and mass-producing other bacteriocins with moderate to broad spectra of activity for applied use in the food industry (Chen and Hoover 2003; Alvarado et al. 2005).

In this regard, identification of such bacteriocins synthesized by natural bacterial isolates (producers) is complicated

by observations that their optimal production is dependent upon induction by different stimuli, including the presence of inducing target microbes (susceptible inducers), nutrient depletion, culture media composition, reduction of growth rate, or changes in physical conditions that affect growth, such as temperature, pH, and oxic and anoxic stress (Biswas et al. 1991; Yang and Ray 1994; Diep et al. 2000; Maldonado 2004; Barboza-Corona et al. 2007). In addition, the presence of extracellular peptides and other autoinducing agents synthesized by susceptible inducers or producer could be required to optimize bacteriocin synthesis by quorum sensing mechanisms (Nilsen et al. 1998; Diep et al. 1995; Kuipers et al. 1995).

Bacillus thuringiensis, an entomopathogen, is a naturally occurring Gram-positive spore-forming soil bacterium routinely used worldwide in insect biocontrol (Swiecicka 2008). Its entomopathogenicity, due to a plethora of crystal (Cry) protein toxins produced during sporulation, has been widely reported (Schnepf et al. 1998). However, reports on the production of bacteriocins by *B. thuringiensis* is scarce and there is only a limited information about the spectrum of activity and biophysical properties of bacteriocins produced by strains of this microbe (Favret and Yousten 1989; Paik et al. 1997; Cherif et al. 2001, 2003; Ahern et al. 2003; Kamoun et al. 2005; Gray et al. 2006a, b; Barboza-Corona et al. 2007; de la Fuente et al. 2007; Chehimi et al. 2007). Recently, we reported the production of five bacteriocin-like inhibitor substances (Bt-BLIS: morricin 269, kurstacin 287, kenyacin 404, entomocin 420, and tolworthcin 524) synthesized by Mexican strains of *B. thuringiensis* (Barboza-Corona et al. 2007). Taking into account the growing interest in identifying broader spectrum bacteriocins for applied use, the focus of the present study was to expand our knowledge regarding the target range of activity of these Bt-BLIS and to gain insights into the nature of the inducer or enhancer agent(s) that promote Bt-BLIS synthesis. Towards this end, we assayed the inhibitory effects of morricin 269, kurstacin 287, kenyacin 404, entomocin 420, and tolworthcin 524 against important pathogenic bacteria and fungi, and found that, collectively, Bt-BLIS inhibited a wide variety of clinically significant microorganisms. We also demonstrated for the first time that even though production of bacteriocins by *B. thuringiensis* does not require induction, it could be enhanced by the presence of peptide(s) synthesized by a susceptible bacterium, *Bacillus cereus* 183.

Materials and methods

Microbial strains and culture conditions

Bacillus thuringiensis subsp. *morrisoni* (LBIT 269), *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* (LBIT 287), *B. thuringiensis*

subsp. *kenyae* (LBIT 404), *B. thuringiensis* subsp. *entomocidus* (LBIT 420) and *B. thuringiensis* subsp. *tolworthi* (LBIT 524) were obtained from a native bacterial stock collection held at CINVESTAV, Campus Guanajuato, Mexico, and were used to produce, respectively, morricin 269, kurstacin 287, kenyacin 404, entomocin 420, and tolworthcin 524 (Barboza-Corona et al. 2007). For bacteriocin production, strains were cultured at 28°C in tryptic soy broth (TSB). *B. cereus* 183 was obtained from a collection of *Bacillus* strains maintained in the International Entomopathogenic *Bacillus* Centre, Institut Pasteur, Paris, France. This strain was employed as the enhancer bacterium in enhancement studies and for the determination of bacteriocin activity with the well-diffusion assay (Barboza-Corona et al. 2007) and by the fluorogenic method previously described by de la Fuente-Salcido et al. (2007). Activities of the five bacteriocins were evaluated against Gram-negative bacteria, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Enterobacter cloacae* ATCC 13047, *Proteus vulgaris* ATCC 13315, *Escherichia coli* (Quanti-Cult), *Salmonella* sp., *Shigella flexneri*, and *Klebsiella pneumoniae*, and Gram-positive bacteria, *Staphylococcus xylosus* ATCC 700404, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Listeria innocua*, *Bacillus cereus* 183, *Streptococcus pyogenes*, and *Streptococcus pneumoniae*. Bacteria not obtained from an ATCC collection were acquired from the Clinical Microbiological Laboratory and Sanitary of the Laguna, with the exception of *Salmonella* sp. and *L. innocua* that were obtained from the Laboratory of Public Health of the State of Hidalgo, Mexico. Fungi from our laboratory stock used in this study were *Rizophus* sp., *Fusarium oxysporum*, *Mucor rouxii* IM80, *Trichoderma* sp. SH1, and *Trichoderma* sp. SD3.

Production of Bt-BLIS

To study the kinetics of bacteriocin production, bacterial strains were cultured overnight in TSB at 28°C with 180 rpm and an aliquot of 5 ml ($\sim 1 \times 10^9$ cells/ml) was mixed with 45 ml of fresh TSB and incubated overnight. Duplicate samples were taken at 2 h intervals over a 24 h period. One of the samples was used for monitoring cell growth spectrophotometrically at 600 nm. The other was centrifuged, adjusted to pH = 7 with 5 N NaOH, and filtered through a 0.20 mm filter, and 50 μ l of the each supernatant was evaluated for antibacterial activity with the rapid fluorogenic method (de la Fuente-Salcido et al. 2007).

Detection of bacteriocin activity in SDS-polyacrylamide gel-overlay assays

Equal amounts of bacteriocin preparations treated with Laemmli's buffer without β -mercaptoethanol were incubated at 55°C for 5 min and loaded in two 15% continuous

sodium dodecyl sulfate (SDS)-polyacrylamide gels for electrophoresis (SDS-PAGE) (Laemmli 1970). One gel was stained with Coomassie blue using standard protocols, and the other was fixed for 30 min with 25% (v/v) isopropanol and 10% (v/v) acetic acid. Afterwards, the gel was washed with double-distilled water for 1 h and equilibrated for 10 min in phosphate buffer, pH 6.5. The gel was aseptically placed in a sterile Petri dish and overlaid with soft TSB containing agar (0.7% w/v) and *B. cereus* 183 as described above. The Petri dish was incubated at 28°C for 1 day and examined for zones of inhibition (Barboza-Corona et al. 2007). Standard prestained protein molecular markers (BenchMark, Invitrogen) were used to estimate the molecular masses of Bt-BLIS.

Antibacterial activity of bacteriocins against food-borne pathogenic bacteria

The modified well-diffusion method was used to assess antibacterial activity of partially purified bacteriocins against food-borne pathogenic bacteria (see above). Bacteria were cultivated overnight at 37°C in TSB, brain heart infusion (BHI), or nutrient broth (NB), and 105 µl (~1 ×

10⁹ cell/ml) of each culture were mixed with 15 ml of TSB with warm soft agar 0.7% (w/v) and plated. Wells, 8 mm in diameter, were dug into the agar and kept for 2 h at 37°C. Then, 100 µl of partially purified bacteriocin preparations was added to each well and incubated for 12 h at 4°C to allow diffusion of samples, followed by an additional incubation at 28 or 37°C for 1 day before diameters of zones of inhibition were measured (Table 1). The minimum detectable zone measured for analytic purposes was 1 mm beyond the well diameter. Assays were repeated in triplicate and the average result was recorded. For our purposes, we defined one unit (U) of BLIS activity as equal to 1 mm² of the zone of inhibition of growth of the indicator bacterium (Delgado et al. 2005; Barboza-Corona et al. 2007).

Activity against fungi

Antagonistic activity against fungi (see above) was determined using potato dextrose agar (PDA). Wells, 8 mm in diameter, were dug into fresh PDA and stored for 2 h at 37°C. One disk of ~8 mm of the outer edge of a 5 to 7-day-old culture of each fungus was cut with a sterile cork borer and placed in the center of new PDA plate. Then 100 µl of

Table 1 Inhibitory activity (U) of partial purified Bt-BLIS determined by the well-diffusion method

Indicator bacteria	Medium of incubation (°C) ^a	Bacteriocins				
		Moricin 269	Kurstacin 287	Kenyacin 404	Entomocin 420	Tolworthcin 524
Gram-positive						
<i>B. cereus</i> 1 ^b	TSB, 28	291	397	299	330	330
<i>B. cereus</i> 183	TSB, 28	402	481	365	63	45
<i>E. faecium</i> ^b	TSB, 37	0	0	188	307	188
<i>L. innocua</i>	TSB, 37	610	657	402	126	126
<i>S. aureus</i> ^c	NA, 37	1040	204	82	63	63
<i>S. xyloso</i>	NA, 37	610	610	481	45	264
<i>Str. pneumoniae</i> ^c	NA, 37	0	28	104	104	0
<i>Str. pyogenes</i>	NA, 37	104	233	13	13	0
Gram-negative						
<i>E. cloacae</i>	BHI, 37	441	441	441	63	151
<i>Escherichia coli</i>	LB, 37	204	402	565	104	56
<i>K. pneumoniae</i>	BHI, 37	610	441	522	104	151
<i>P. aeruginosa</i>	BHI, 37	610	565	402	208	104
<i>P. vulgaris</i>	BHI, 37	0	28	45	28	0
<i>Salmonella</i> sp. ^d	BHI, 37	264	28	82	28	402
<i>Shigella flexneri</i>	BHI, 37	63	63	0	0	0
<i>Vibrio cholerae</i> ^b	TSB, 37	324	291	52	104	94

One unit is defined as 1 mm² of the zone of inhibition as determined by the well-diffusion method (see text). Data are the average of triplicate assays. A value of “0” indicates no inhibition

^a Media and temperature used for growing bacteria. In all cases, TSB plus agar was used in well-diffusion assays

^b Data published in Barboza-Corona et al. 2007

^c Assays were done with induced Bt-BLIS samples (see Fig. 2)

^d Fuzzy inhibition was observed

crude bacteriocins were added to each well and incubated overnight at 4°C to allow diffusion of the samples. Plates were incubated at 28°C for 5–7 days after which growth inhibition or morphological changes were recorded. Each assay was repeated in triplicate.

Determination of the number of *B. cereus* necessary to promote bacteriocin synthesis

A fixed inoculum ($\sim 1 \times 10^9$ cells/ml) of each of the *B. thuringiensis* strains was co-cultured with increasing amounts, from 10^3 to 10^7 cells/ml culture, of the enhancer strain, *B. cereus* 183. Cultures were incubated at 28°C with 180 rpm, and samples were taken at 2-h intervals over an 8-h period. Supernatants were assayed for bacteriocin activity using the fluorogenic method, with *B. cereus* 183 as a control (de la Fuente-Salcido et al. 2007).

Partial characterization of the inducer of bacteriocin synthesis

To determine if bacteriocin synthesis was enhanced by secreted, internal, or structural components produced by the enhancer strain, *B. cereus* 183 was cultivated in TSB overnight and cells were separated from the supernatant by centrifugation and filtration through a 0.45 μm filter (Fisherbrand). Four different treatments, using TSB cultures were performed, as follows: culture broths were inoculated with (1) 1% (v/v) of *B. thuringiensis* culture; (2) 1% (v/v) of *B. thuringiensis* culture supplemented with 0.5% (v/v) of *B. cereus* 183 culture; (3) 1% (v/v) of *B. thuringiensis* culture plus 50 μL of *B. cereus* 183 cell-free supernatant; and (4) 1% (v/v) of *B. thuringiensis* supplemented with 50 μL of *B. cereus* 183 cells heated at 55°C for 15 min. Duplicate samples were taken at 2-h intervals over a 8-h period and activity was evaluated using the fluorogenic method (de la Fuente-Salcido et al. 2007). In addition, autoinduction assays were performed using cell-free supernatant or *B. thuringiensis* cells heated at 55°C.

To examine the susceptibility of the putative enhancer(s) to proteolytic enzymes, control *B. cereus* 183 and *B. thuringiensis* strains were cultured in TSB overnight at 28°C, and 50 ml was centrifuged, and 50 μl of cell-free supernatant was mixed with the same amount of phosphate buffer 100 mM, pH 7.0 (buffer final concentration: 50 mM) and then 1 unit/ml of proteinase K (Invitrogen) was added. Likewise, the pellet was resuspended in 1,000 μl of phosphate buffer 50 mM, pH 7.0, and 50 μl of *B. cereus* cells was incubated at 55°C for 10 min, after which 1 unit/ml of proteinase K (Invitrogen) was added. For controls, one sample containing cell-free supernatant and the other containing bacterial cells were treated as described above but without proteinase K. Mixtures were incubated at 37°C for 1 h and then heated

at 100°C for 10 min to inhibit the enzymatic reaction. Cultures were incubated at 28°C (180 rpm) and duplicate aliquots of 1 ml were taken at 2-h intervals over an 8-h period. One sample was used for absorbance measurement at 600 nm and the other for bacteriocin assay with the fluorescent method.

Results

Production of bacteriocins (Bt-BLIS)

To produce Bt-BLIS for antimicrobial assays, the Mexican strains of *B. thuringiensis* and the enhancer bacterium, *B. cereus* 183, were cultivated in TSB over a 24-h period. The highest bacteriocin yields for LBIT 269 and LBIT 287, and LBIT 404, LBIT 420 and LBIT 524 were detected at, respectively, ~ 24 and 15 h, as previously observed (Barboza-Corona et al. 2007). Samples collected at these times were concentrated and analyzed by SDS-PAGE to corroborate the activity and molecular weight of bacteriocins. As was expected (Fig. 1), each Mexican strain produced an active bacteriocin of ~ 10 kDa that elicited inhibitory effects against *B. cereus* 183, the bacterium employed in subsequent enhancement studies. After confirmation, these samples were used in antimicrobial assays against foodborne pathogenic and clinically significant bacteria and against various fungi.

Antimicrobial activity

To determine their antimicrobial spectra, Bt-BLIS samples were assayed against different bacteria using the well-diffusion method (Table 1). Of the Gram-positive bacteria tested, collectively, Bt-BLIS showed activity against *B. cereus*, *Listeria innocua*, *Staphylococcus aureus*, *S. xylosum*, and *Streptococcus pneumoniae*. Inhibitory effects were also observed against different Gram-negative bacteria, i.e.,

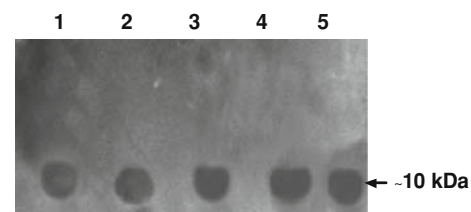


Fig. 1 Direct detection of Bt-BLIS. Assays were performed using bacteriocins fractionated in SDS-PAGE and overlaid with *B. cereus* 183 culture. Lane 1 tolworthicin 524, lane 2 entomocin 420, lane 3 kenyanicin 404, lane 4 kurstacin 287, lane 5 morricin 269. The arrow indicates the relative position (~ 10 kDa) of proteins that elicited bacterial growth inhibition zones. BenchMark prestained protein ladder (Invitrogen) was used to estimate the molecular masses of bacteriocins of *B. thuringiensis*

Enterobacter cloacae, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* and *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella* sp., and *Vibrio cholerae*. Interestingly, in other regards, *Streptococcus pyogenes* and *Shigella flexneri* were susceptible to morricin 269 and kurstacin 287, whereas *Enterococcus faecium* were inhibited by kenyacine 404, entomocin 420 and tolworthcin 524.

When the activity of Bt-BLIS was assayed against different fungi (Table 2), inhibition of sporulation in *Trichoderma* species was recorded as a change on coloration from green to white. Inhibitory effects were not observed against *Rizophus* sp., *Fusarium oxysporum* and *Mucor rouxii*.

Determination of the number of *B. cereus* 183 cells required to enhance Bt-BLIS synthesis

When *B. thuringiensis* strains were co-cultivated with *B. cereus* 183 (Barboza-Corona et al. 2007), an increase in bacteriocin production, compared to the control, was observed (Fig. 2). In these studies, a series of each of the *B. thuringiensis* strains were cultured under the same conditions that yielded a maximal bacteriocin activity (24 or 15 h), and different quantities of cells of the enhancer bacterium, *B. cereus* 183, were added. We observed that the highest production of morricin 269 and kurstacin 287 occurred at, respectively, 6 and 4 h with 1×10^6 and 1×10^3 cells/ml of *B. cereus* 183, whereas maximal enhancement of kenyacine 404, entomocin 420, and tolworthcin 524 occurred at 8 h using, respectively, 1×10^3 , 1×10^7 and 1×10^6 enhancer cells/ml. The addition of *B. cereus* 183 cells to *B. thuringiensis* cultures showed that the former strain was able to enhance synthesis of morricin 269, kurstacin 287, kenyacine 404, entomocin 420 and tolworthcin 524 by, respectively, 42, 65, 68, 90 and 79% when compared with controls (Fig. 2).

Partial characterization of the Bt-BLIS inducer

When *B. thuringiensis* cultures were supplemented, either with *B. cereus* 183 cells heated at 55°C or cell-free supernatants, incremental increases in bacteriocin production were observed in all cultures (Fig. 3). In comparison, under

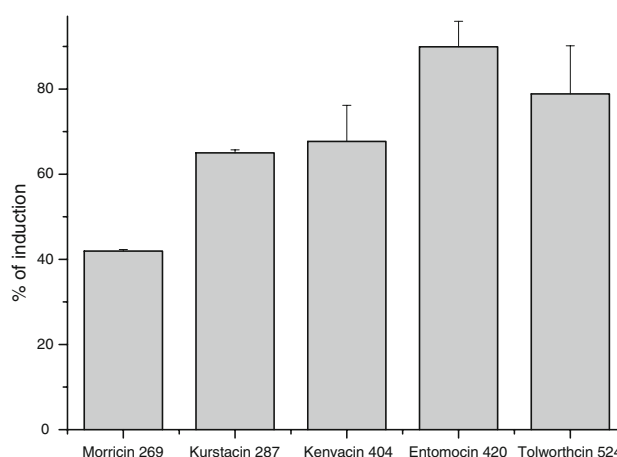


Fig. 2 Increase of bacteriocin production in Mexican strains of *B. thuringiensis* by the presence of the susceptible enhancer bacterium, *B. cereus* 183. *Bacillus thuringiensis* subsp. *morrisoni* (LBIT 269), *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* (LBIT 287), *B. thuringiensis* subsp. *kenyae* (LBIT 404), *B. thuringiensis* subsp. *entomocidus* (LBIT 420) and *B. thuringiensis* subsp. *tolworthi* (LBIT 524), which produced, respectively, morricin 269, kurstacin 287, kenyacine 404, entomocin 420 and tolworthcin 524, were co-cultured with different quantities of *B. cereus* 183 cells (see “Materials and methods”). The percent enhancement of Bt-BLIS by *B. thuringiensis* strains was calculated using cultures without the enhancer bacterium as baseline controls. Bacteriocin activity in supernatants was determined with a fluorogenic method using *B. cereus* as the indicator bacterium

the conditions used in autoinduction assays, we observed lower incremental increases (from ~10 to 40%) at the beginning of the cell growth, but this increment could not be maintained and was depleted after 8 h of incubation (data not shown).

To determine the chemical nature and thermostability of the Bt-BLIS enhancer molecule(s) synthesized by *B. cereus* 183, *B. thuringiensis* cultures were supplemented with either cell-free supernatants or *B. cereus* cells heated at 55°C, or treated with or without proteinase K (Fig. 3). When cell-free supernatants treated with proteinase K were used as enhancer samples, all *B. thuringiensis* strains showed a decrement in bacteriocin activity when compared with controls. In addition, when *B. cereus* cells treated with proteinase K were added to cultures, LBIT 287, LBIT 404,

Table 2 Antimicrobial activity of partial purified Bt-BLIS against fungi

Fungi	Characteristic	Morricin 269	Kurstacin 287	Kenyacin 404	Entomocin 420	Tolworthcin 524
<i>Rhizopus</i> sp.	Food spoilage	–	–	–	–	–
<i>Fusarium oxysporum</i>	Plant pathogen	–	–	–	–	–
<i>Mucor rouxii</i>	Soil fungus	–	–	–	–	–
<i>Trichoderma</i> sp. SH1	Mycoparasite	+	+	+	+	+
<i>Trichoderma</i> sp. SD3	Mycoparasite	+	+	+	+	+

Symbols (+) and (–) indicate, respectively, inhibition or no inhibition of sporulation. Inhibition of sporulation was observed as a change in the hyphae color from green to white

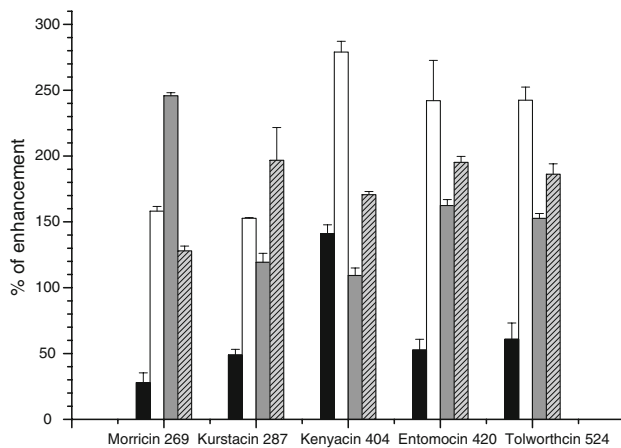


Fig. 3 Enhancement of bacteriocin production in Mexican strains of *Bacillus thuringiensis* using *Bacillus cereus* 183 cell-free supernatants or *B. cereus* 183 heat-killed cells. *B. thuringiensis* cultures supplemented with cell-free supernatant treated with proteinase K (black bar), cell-free supernatant without proteinase K (white bar), *B. cereus* cells heated at 55°C and treated with proteinase K (gray bar), nd *B. cereus* cells heated at 55°C without proteinase K treatment (gray and lined bar)

LBIT 420 and LBIT 524 showed a reduction in BT-BLIS synthesis, whereas an increase was observed for LBIT 269.

Discussion

The objectives of the present study were to determine whether bacteriocins synthesized by Mexican strains of *B. thuringiensis* (Bt-BLIS) had activity against important pathogenic bacteria, not previously screened for this organism, and to determine the nature of biochemical component(s) produced by a susceptible enhancer strain, *Bacillus cereus* 183, that elicited an incremental increase in Bt-BLIS synthesis. Our results demonstrate that, collectively, the various Bt-BLIS have a broad spectrum of antagonistic activity against both Gram-positive and Gram-negative clinically significant bacteria.

Current data indicate that bacteriocins of *B. thuringiensis* could have either a narrow or a moderate spectrum of activity. For example, thurincin (Favret and Yousten 1989), tochicin (Paik et al. 1997), thuricin 7 (Cherif et al. 2001), and thuricin 17 (Gray et al. 2006) have a narrow spectrum, with limited activity against bacteria of the same species (Paik et al. 1997; Cherif et al. 2001) or against a restricted range of unrelated bacteria, i.e., *Streptococcus pyogenes* and *Listeria monocytogenes* (Cherif et al. 2001). To the contrary, entomocin 9 and thuricin S have an expanded spectrum that include not only *Bacillus* species, but also *Lactococcus*, *Listeria monocytogenes*, *Pseudomonas aeruginosa* (Cherif et al. 2003), *Salmonella enteritidis*, *Pseudomonas putida* (Chehimi et al. 2007), and fungi including

Aspergillus nidulans and *Fusarium gramineis* (Cherif et al. 2003). Recently, we reported that Bt-BLIS produced by Mexican strains of *B. thuringiensis* have inhibitory activity against *Bacillus* species, *Listeria innocua*, *Enterococcus faecium* and *Vibrio cholerae* (Barboza-Corona et al. 2007). Here, we expanded the target range to include a plethora of pathogenic and opportunistic bacteria (Table 1) known to be etiologic agents of septicemia, wound infections, urinary tract infection (UTI), and infections of the lower respiratory and gastrointestinal tracts (Prescott et al. 2005). Included among these bacteria are those that cause outbreaks of sore (strep) throat and scarlet fever (*Streptococcus pyogenes*), and diarrheal and emetic syndromes (*Shigella flexneri*, *Salmonella* sp., *E. coli*, and *Vibrio cholerae*) (Prescott et al. 2005). Prior to this study, only entomocin 9 (Cherif et al. 2003) was shown to be active against *Pseudomonas aeruginosa*, a common nosocomial agent of diverse diseases ranging from pneumonia, septicemia and UTI. Here, we demonstrate that each of the Bt-BLIS studied were active against *P. aeruginosa* (Table 1).

Our studies also demonstrated that each of the five Bt-BLIS samples prevented sporulation of *Trichoderma* sp. (Table 2), a mycoparasite widely used in biological control. It is important to note that antifungal activity by different *Bacillus* species has been attributed to the production of *zwittermicin A*, an aminopolyol antibiotic (Silo-Suh et al. 1998). Previously, we reported that only one of the *B. thuringiensis* strains used in this study, i.e., LBIT 269, contained a putative *zwittermicin A* gene that was amplified by PCR (Barboza-Corona et al. 2007). However, we cannot exclude the possibility that the other Mexican strains contained a *zwittermicin A* gene homologue that was not amplified with the primers used in that study. It is also known that chitinases produced by *Bacillus thuringiensis* confer antifungal activity (Morales de la Vega et al. 2006). We detected low amounts of chitinases (data not shown) in crude bacteriocin preparations used for assays in the present study with methods described by Barboza-Corona et al. (2008). Thus, the failure of *Trichoderma* species to complete its life cycle from mycelial growth to sporulation could be due to the presence of *zwittermicin* and/or chitinases. Further studies are required to determine if *zwittermicin* is produced in these strains. In addition, bioassays employing chitinase inhibitors (e.g., allosamidin) could be useful to determine whether chitinases play a detrimental role in the life cycle of *Trichoderma* species. As such, we are unable to conclude whether the antifungal activity is, specifically, conferred by Bt-BLIS.

Unlike other bacteria such as *Lactobacillus plantarum* NC8, which require a susceptible bacterium to induce synthesis of bacteriocin (Maldonado et al. 2004), the Mexican strains of *B. thuringiensis* studied here produced Bt-BLIS in the absence of an inducer. Our results clearly

demonstrate that Bt-BLIS synthesis is significantly enhanced by the presence of *B. cereus* 183. Under the condition used in our autoinduction assays, we detected a small increase in the bacteriocin production at the beginning of the assay. However, this increase could not be maintained by a putative autoenhancer. Although bacteriocins are known to act as autoinducers, for example, nisin and subtilisin from, respectively, *Lactococcus lactis* and *B. subtilis* (Klein et al. 1993; Kuipers et al. 1995), there are some examples where peptide pheromones released during quorum-sensing are not sufficient to either trigger or maintain bacteriocin production in highly diluted cultures (Kleerebezen and Quadri 2001). Consequently, we cannot exclude the possibility that Bt-BLIS or other extracellular peptide secreted by *B. thuringiensis* could act as minimal autoenhancers.

At the commencement of the present study, we assayed the ability of three different susceptible strains of *B. cereus* to induce synthesis of Bt-BLIS in co-cultures. Although each of these strains enhanced synthesis of bacteriocins (data not shown), we selected *B. cereus* 183 for subsequent studies because it yielded reproducible incremental increases of antimicrobial peptides. Regarding the enhanced synthesis of Bt-BLIS in the presence of *B. cereus* 183 (Fig. 2), our results suggest that the enhancing molecule is a secreted proteinaceous component as treatment of *B. cereus* culture supernatants with proteinase K suppressed Bt-BLIS levels. In addition, our observation that heat-killed *B. cereus* 183 proteinase-K treated preparations enhanced morrigin 269 production, but not the other Bt-BLIS, suggests a species-specific protease-resistant component released from the 183 strain after treatment enhances synthesis of the bacteriocin by *Bacillus thuringiensis* subsp. *morrisoni* (LBIT 269). Further studies are required to identify the putative secreted and cell-associated enhancer components of *B. cereus* 183.

In conclusion, we have shown that bacteriocins synthesized by Mexican strains of *B. thuringiensis* have a moderate to broad spectrum of activity and are effective against human pathogenic bacteria of clinical significance. In addition, this is the first report demonstrating that synthesis of *B. thuringiensis* bacteriocins could be enhanced either by extracellular or structural proteins produced by *B. cereus*, possibly through a quorum-sensing mechanism. Our future objectives are focused on identifying putative enhancers of *B. cereus* 183, and cloning the Bt-BLIS genes for studies related to mechanisms involved in regulation of their expression. Currently, we are conducting experiments to determine whether susceptible Gram-negative or Gram-positive bacteria, other than *B. cereus*, are able to enhance the production of bacteriocins in Mexican strains of *B. thuringiensis*. In addition, our ultimate goal is to hyper-express these genes in a GRAS (generally recognized as

safe) bacterium to produce various Bt-BLIS for safety and efficacy studies and applied uses.

Acknowledgments We thank Gabriela Morales-Pérez and Roberto Ortega Monzon, undergraduate students from Universidad de Guanajuato, Mexico, and Janeth Adriana Martínez-Cardenas from Universidad Juarez Autonoma de Tabasco, Mexico, for their technical assistance. Norma de la Fuente-Salcido is a graduate student supported by a fellowship sponsored by CONACYT-México. The authors are grateful for the essential material provided by Jorge Ibarra, Irais Sánchez-Ortega and Ma. Alejandra Chavira-Zuñiga. This research was supported partially by a grant (DINPO 2006) from the Universidad de Guanajuato to JEB-C.

References

- Ahern M, Verschueren S, van Sinderen D (2003) Isolation and characterization of a novel bacteriocin produced by *Bacillus thuringiensis* strain B439. FEMS Microbiol Lett 220:127–131
- Alvarado C, Garcia-Almendarez BE, Martin SE, Regalado C (2005) Anti-*Listeria monocytogenes* bacteriocin-like inhibitory substances from *Enterococcus faecium* UQ31 isolated from artisan Mexican-style cheese. Curr Microbiol 51:110–115
- Barboza-Corona JE, Vázquez-Acosta H, Bideshi DK, Salcedo-Hernández R (2007) Bacteriocin-like inhibitor substances produced by Mexican strains of *Bacillus thuringiensis*. Arch Microbiol 187:117–126
- Barboza-Corona JE, Reyes-Rios DM, Salcedo-Hernandez R, Bideshi DK (2008) Molecular and biochemical characterization of an endochitinase (ChiA-HD73) from *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD-73. Mol Biotechnol 39:29–37
- Biswas SR, Ray P, Johnson C, Ray B (1991) Influence of growth conditions on the production of a bacteriocin, pediocin AcH, by *Pedococcus acidilactici* AcH. Appl Environ Microbiol 57:1265–1267
- Chehimi S, Delalande F, Sablé S, Hajlaoui MR, Van Dorsseleer A, Limam F, 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
- Chen H, Hoover DG (2003) Bacteriocins and their food applications. Comprehensive reviews in food science and food safety. Institute of Food Technologist 2:82–100
- Cherif A, Ouzari H, Cherif H, Daffonchio , Ben-Slama K, Hassen A, Jaoua A, 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, Limen F, Hansen BM, Hendriksen NB, Daffonchio D, Boudabous A (2003) Detection and characterization of the novel bacteriocin entomocin 9, and safety evaluation of its producer, *Bacillus thuringiensis* ssp. *Entomocidus* HD-9. J Appl Microbiol 95:990–1000
- De la Fuente-Salcido N, Salcedo-Hernández R, Alanis-Guzmán MG, Bideshi DK, Barboza-Corona JE (2007) A new rapid fluorogenic method for measuring bacteriocin activity. J Microbiol Meth 70(1):196–199
- Delgado A, Brito D, Fevereiro P, Tenreiro R, Peres C (2005) Bioactivity quantification of crude bacteriocin solutions. J Microbiol Meth 62:121–124
- Diep DB, Havarstein LS, Nes IF (1995) A bacteriocin-like peptide induces bacteriocin synthesis in *Lactobacillus plantarum* C11. Mol Microbiol 18:631–639
- Diep DB, Axelsson L, Grefslis C, Nes IF (2000) The synthesis of the bacteriocin sakacin A is a temperature-sensitive process regulated by a pheromone peptide through a three-component regulatory system. Microbiol 146:155–2160

- Favret ME, Yousten AA (1989) Thuricin: the bacteriocin produced by *Bacillus thuringiensis*. *J Invertebr Pathol* 53:206–216
- Gray EJ, Lee KD, Souleimanov AM, Di Falco MR, Zhou X, Ly A, Charles TC, Driscoll BT, Smith DL (2006a) A novel bacteriocin, thuricin 17, produced by plant growth promoting rhizobacteria strain *Bacillus thuringiensis* NEB17: isolation and classification. *J Appl Microbiol* 100:545–554
- Gray EJ, Di Falco MR, Souleimanov A, Smith DL (2006b) Proteomic analysis of the bacteriocin thuricin 17 produced by *Bacillus thuringiensis* NEB 17. *FEMS Microbiol Lett* 255:27–32
- Kamoun F, Mejdoub H, Aouissaoui H, Reinbolt J, Hammami A, 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
- Kleerebezen M, Quadri LEN (2001) Peptide pheromone-dependent regulation of antimicrobial peptide production in Gram-positive bacteria: a case of multicellular behaviour. *Peptides* 22:1579–1596
- Klein C, Kaletta C, Entian KD (1993) Biosynthesis of the lantibiotic subtilisin is regulated by a histidine kinase/response regulator system. *Appl Environ Microbiol* 59:296–303
- Kuipers OP, Beerthuyzen MB, de Ruyter PGGA, Luesink EJ, de Vos WM (1995) Autoregulation of nisin biosynthesis in *Lactococcus lactis* by signal transduction. *J Biol Chem* 270:27299–27304
- Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680–685
- Maldonado A, Ruiz-Barba JL, Jiménez-Díaz R (2004) Production of plantaricin NC8 by *Lactobacillus plantarum* NC8 is induced in presence of different types of gram-positive bacteria. *Arch Microbiol* 181:8–16
- Matthewes KR (2004) Here, there, everywhere: antibiotic-resistant foodborne pathogens. *Food Technol* 58:104
- Morales de laVega L, Barboza-Corona JE, Aguilar-Uscanga MG, Ramírez-Lepe M (2006) Purification and characterization of an exochitinase from *Bacillus thuringiensis* ssp. *aizawai* and its action against phytopathogenic fungi. *Can J Microbiol* 52:651–657
- Nilsen T, Nes IF, Holo H (1998) An exporter inducer peptide regulates bacteriocins production in *Enterococcus faecium* CTC492. *J Bacteriol* 180:1848–1854
- Olasupo NA, Fitzgerald DJ, Gasson MJ, Narbad A (2003) Activity of natural antimicrobial compounds against *Escherichia coli* and *Salmonella enterica* serovar *typhimurium*. *Lett Appl Microbiol* 37:448–451
- Paik HD, Bae SS, Park SH, Pan JG (1997) Identification and partial characterization of tochicin, a bacteriocin produced by *Bacillus thuringiensis* subsp. *tochigiensis*. *J Ind Microbiol Biotechnol* 19:294–298
- Prescott LM, Harley JP, Klein DA (2005) The epidemiology of infectious disease. In: Prescott LM, Harley JP, Klein DA (eds) *Microbiology*, 6th edn, McGraw-Hill, New York, pp 821–843
- Schnepf E, Crickmore N, VanRie J, Lereclus D, Baum J, Feitelson J, Zeigler DR, Dean DH (1998) *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. *Microbiol Mol Biol Rev* 62:775–806
- Silo-Suh LA, Stabb EV, Raffel S, Hendelsman J (1998) Target range of zwittermicin A, an aminopolyol antibiotic from *Bacillus cereus*. *Curr Microbiol* 37:6–11
- Simon L, Frémaux C, Cenatiempo Y, Berjeaud JM (2002) Sakacin G, a new type of antilisterial bacteriocin. *Appl Environ Microbiol* 12:6416–6420
- Swiecicka I (2008) Natural occurrence of *Bacillus thuringiensis* in eukaryotic organisms: a case for symbiosis. *Biocontrol Sci Technol* 18:221–239
- Yang R, Ray B (1994) Factors influencing production of bacteriocins by lactic acid bacteria. *Food Microbiol* 11:281–291

ORIGINAL ARTICLE

Generation of antibacterial oligosaccharides derived from chitin using heterologous endochitinase synthesized in *Escherichia coli*

J.E. Barboza-Corona¹, O.B. Gutierrez-Acosta¹, M. Imperial-Cervantes¹, D.K. Bideshi^{2,3}, N. de la Fuente-Salcido^{1,4}, M. Bautista-Justo¹ and R. Salcedo-Hernández¹

¹ Departamento de Ingeniería en Alimentos, Instituto de Ciencias Agrícolas, Universidad de Guanajuato, Irapuato, Guanajuato, México

² Department of Natural and Mathematical Sciences, California Baptist University, Riverside, CA, USA

³ Department of Entomology, University of California, Riverside, CA, USA

⁴ Universidad Autónoma de Coahuila, Escuela de Ciencias Biológicas, Torreón, Coahuila, México

Keywords

Bacillus thuringiensis, ChiA74, ChiA Nima, endochitinases, oligosaccharides, *Serratia marcescens*.

Correspondence

Jose Eleazar Barboza-Corona, Departamento de Ingeniería en Alimentos, Instituto de Ciencias Agrícolas, Universidad de Guanajuato, Apartado postal 311, Irapuato, Gto., México. E-mail: josebar@dulcinea.ugto.mx

2008/0347: received 27 February 2008, revised 3 April 2008 and accepted 10 April 2008

doi:10.1111/j.1365-2672.2008.03904.x

Abstract

Aims: To synthesize two heterologous endochitinases in *Escherichia coli* and demonstrate their potential for applied use in generating antibacterial chitin-derived oligosaccharides (OGS).

Methods and Results: Heterologous endochitinase genes, *chiA Nima* and *chiA74*, were expressed in *E. coli*. Endochitinases were secreted by the *E. coli* export machinery and by ~20 h maximal chitinolytic activity was observed. The highest chitinolytic activity was observed with ChiA Nima, which produced antibacterial OGS with activities against *Enterobacter cloacae*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* and *S. xylosus*.

Conclusions: It was shown that the export machinery of *E. coli* is well suited for the secretion of bioactive ChiA74 and ChiA Nima endochitinases, and that the latter can generate antibacterial OGS.

Significance and Impact of the Study: Our study suggests that it is feasible to synthesize endochitinases ChiA Nima and ChiA74 codified by *E. coli* and mass-produce these enzymes in culture supernatants. As signal peptides in native ChiA Nima and ChiA74 were recognized by the protein export molecular apparatus in *E. coli*, these short peptides could be included as signal sequences for transport in *E. coli* of other proteins with applied value. This is the first report suggesting that ChiA Nima can be used to produce OGS to control food-borne pathogenic bacteria.

Introduction

Oligosaccharides (OGS) are polymers of sugar subunits that occur as free entities or in combination with other biomolecules in all living organisms (Nakakuki 2002). OGS vary structurally from each other based on the different degrees of polymerization, typically being composed of 2–25 saccharide subunits (Barreteau *et al.* 2006). At present, there is increased interest in large-scale production of OGS and their derivatives from chitin in its low acetylated form (chitosan) as these polymers can be utilized as prebiotic ingredients and food preservatives (Campbell *et al.*

1997; Shabrukova *et al.* 2002; Barreteau *et al.* 2006; Kadokura *et al.* 2007a), and have the potential for diverse clinical applications as antitumorigenic, antiangiogenic, antimicrobial, hypocholesterolemic and antihypertensive agents (Suzuki *et al.* 1986; Kobayashi *et al.* 1990; Choi *et al.* 2001; No *et al.* 2002; Chen *et al.* 2005; Bhattacharya *et al.* 2007; Wang *et al.* 2007). Bioactive OGS can be produced by enzymatic and chemical synthesis or by depolymerization of polysaccharides using physical, chemical or enzymatic methods (Barreteau *et al.* 2006). However, the lack of efficient mass production schemes is the main disadvantage that limits enzymatic protocols.

Chitin [β -(1,4)-*N*-acetyl-D-glucosamine (GlcNAc)]_n, a major component of fungi cell wall, crabs and shrimp exoskeleton, and the peritrophic membrane and exoskeleton of insects (Bhattacharya *et al.* 2007), is among the most abundant polysaccharide widely distributed in nature. Thus, chitin provides a viable ubiquitous source for exploitation in the large scale production of OGS. As such, devising efficient enzymatic systems for chitin degradation is of considerable interest. Diverse organisms such as bacteria, plants, arthropods and fungi, produce a myriad of chitinases that play specific physiological roles related to their structure and nutrition. For example, bacteria synthesize a wide variety of chitinolytic enzymes that are categorized into two principal groups: endochitinases that hydrolyse chitin randomly at internal glycosidic linkages, and exochitinases that catabolize chitin progressively in a process that initiates at the nonreducing end of chitin resulting in release of chitobiose (chitobiosidases) or GlcNAc (*N*-acetylglucosaminidases). These products, particularly GlcNAc, are subsequently converted into other biomolecules that enter different metabolic pathways employed for synthesizing diverse cellular structures (Suzuki *et al.* 2002; Bhattacharya *et al.* 2007). In other regards, chitinolytic enzymes are involved in virulence of entomopathogenic bacteria that inflict high morbidity and mortality in insect larval populations. Recently, we have cloned two bacterial endochitinase genes, *ChiA74* and *ChiA Nima*, from respectively *Bacillus thuringiensis* subsp. *kenyae* (LBIT 82) and *Serratia marcescens* Nima, and have suggested their use as synergistic factor for increasing the entomocidal activity of recombinant *B. thuringiensis* expressing these genes (Barboza-Corona *et al.* 2003; Ruiz-Sánchez *et al.* 2005a; Casique-Arroyo *et al.* 2007).

Although the use of fungal and bacterial chitinases in OGS production have been reported (Ramírez-Coutiño *et al.* 2006), there is a lack of information regarding *ChiA Nima* and *ChiA74* chitinases in similar processes. Here we report on the heterologous expression of *ChiA74* and *ChiA Nima* in *Escherichia coli*, and on the chitinolytic activities of their gene products. We demonstrate that both enzymes are secreted efficiently by the *E. coli* export

apparatus and retain their intrinsic activities, being capable of hydrolysing chitin to produce OGS. In particular, OGS produced by *ChiA Nima* were shown to have antimicrobial properties against important food-borne pathogenic bacteria, and thus have potential applied value in the food industry.

Materials and methods

Recombinant plasmids and bacterial strains

Parental recombinant pHT3101 plasmid vectors harbouring the *chiA Nima* (pEANima) and *chiA74* (pEHchiA74) from, respectively, *Serratia marcescens* Nima and *B. thuringiensis kenyae* (LBIT-82), were described previously (Barboza-Corona *et al.* 2003; Ruiz-Sánchez *et al.* 2005a). Plasmids pBluescript KS(+) [pBSKS(+)] (Stratagene, La Jolla CA, USA) and pHT3101 (Lereclus *et al.* 1989) were used for expression of the chitinase genes in *Escherichia coli* DH5 α F' [*supE44*, Δ *lacU169* (F80*lacZ* Δ M15) *hsdR17 recA1 end A1 gyrA96 thi-1 relA1*]. The *chiA74* and *chiA Nima* genes were amplified from the pHT3101 parental templates using, respectively, the primer pair *chiA74*-1 and *chiA74*-3, and Sm-5 and Sm-6 (Table 1, Fig. 1). These oligonucleotides were designed to amplify the chitinase genes with their regulatory sequences (promoter, ribosome binding site and transcriptional terminator) (Ruiz-Sánchez *et al.* 2005a; Casique-Arroyo *et al.* 2007). PCR amplifications were performed with the PCR SuperMix high-fidelity enzyme mix (Invitrogen, La Jolla, CA, USA), in an iCycler thermocycler (Bio-Rad) for 30 cycles of 94°C for 1 min, 55°C for 1 min, 68°C for 4 min, followed by a 7-min termination step at 68°C. The PCR product was purified using the QIAquick gel extraction kit (Qiagen). Amplicons were digested with restriction enzymes and ligated (Invitrogen) into the same sites of the pBSKS(+) with T4 DNA ligase to generate plasmids pBS74 and pBSNima (Fig. 1). All recombinant plasmid constructs were amplified in *Escherichia coli* DH5 α F' and purified using the Qiagen plasmid Minikit.

Table 1 Primers used for amplification of *chiA74* and *chiA Nima* endochitinases genes

Primers	Sequences*	Restriction sites (underlined)	References
<i>chiA74</i> -1	F: 5'-ACGCGTCGACCTTTCTACGTCTTTAATAATTGGCTCCATAC-3'	<i>SalI</i>	Casique-Arroyo <i>et al.</i> (2007)
<i>chiA74</i> -3	R: 5'-AACTGCAGCGAAAGCCTTTCCCTAACAGGTGACTAT-3'	<i>PstI</i>	Casique-Arroyo <i>et al.</i> (2007)
Sm-3	F: 5'-CTAGTCTAGAGTTGTCAATAATGACAACACCCTGGCTG-3'	<i>XbaI</i>	Ruiz-Sánchez <i>et al.</i> (2005a)
Sm-4	R: 5'-ACATGCATGCCATTTTTAGCGCATTGGTCTGACCCT-3'	<i>SphI</i>	Ruiz-Sánchez <i>et al.</i> (2005a)
Sm-5	F: 5'-CGCGGATCCGAGTGTGGTGAATACTG-3'	<i>BamHI</i>	This work
Sm-6	R: 5'-CGGGGTACCGCTGAATGATGAATATCTG-3'	<i>KpnI</i>	This work

*Forward (F) and reverse (R) primers.

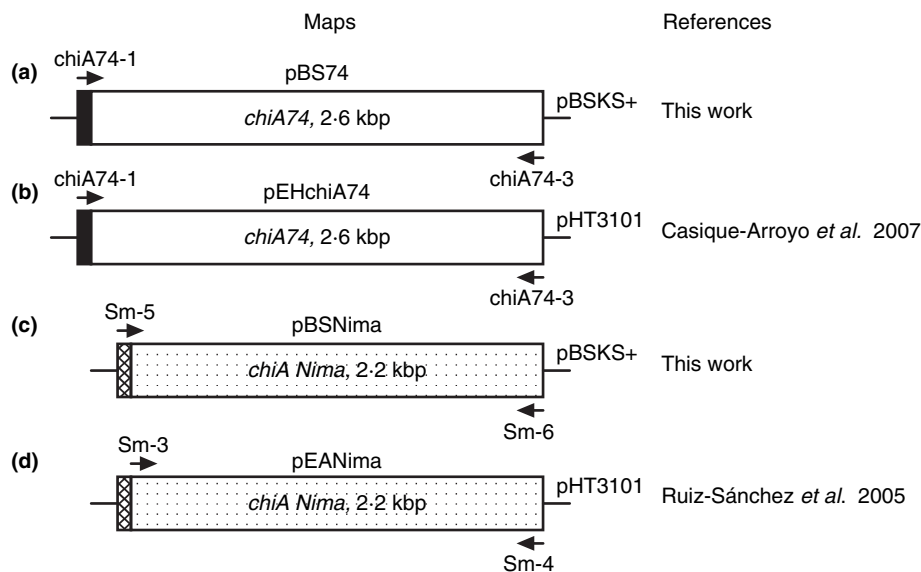


Figure 1 Schematic illustrations of different constructs used to synthesize bacterial endochitinases in *Escherichia coli*. (a) pBS74 and (b) pEHchiA74 were used to produce ChiA74 of *Bacillus thuringiensis*; these constructs contained *chiA74* in, respectively, pBluescript KS(+) and pHT3101. (c) pBSNima and (d) pEANima were used to synthesize ChiA Nima of *Serratia marcescens*; these constructs contained *chiA Nima* in, respectively, pBluescript KS(+) and pHT3101. The forward and reverse primers (see also Table 1) used to obtain the different constructs by PCR are also shown.

Chitinase assays using fluorogenic substrates

Recombinant bacteria were cultivated overnight (37°C, 200 rev min⁻¹) in Luria-Bertani broth (LB, Difco) with ampicillin (0.1 mg ml⁻¹). Samples with the same number of cells were transferred to fresh LB broth with ampicillin. Aliquots of 2 ml were collected at different times, centrifuged at 17 000 g for 10 min, and the supernatants were assayed for endochitinase activity in a Turner fluorometer (model 450; 340-nm interference filter and 415-nm cut filter) using the fluorogenic 4-MU-(GlcNAc)₃ substrate, as described previously (Barboza-Corona *et al.* 2003; Ruiz-Sánchez *et al.* 2005a). Assays were replicated in triplicates. To quantify chitinolytic activity, one unit (U) was defined as the amount of enzyme required to release 1 µmol of 4-methylumbelliferone in 1 h (Barboza-Corona *et al.* 2003).

RT-PCR

RNA was isolated at different times from cells grown in LB with ampicillin at 28°C. Briefly, cells were harvested at 4°C and the pellets were suspended in 0.2 ml of TRIzol reagent (Invitrogen). Samples were vortexed and incubated at room temperature for 10 min. Subsequently, 0.2 ml of chloroform was added to each sample, then mixed and incubated at room temperature for 3 min. Samples were centrifuged at 17 000 g for 5 min, and

supernatants were mixed with 0.5 ml of isopropyl alcohol per 1 ml of TRIzol. The samples were placed at -20°C for 20 min followed by centrifugation at 17 000 g for 15 min. Pellets were washed with 70% (v/v) ethanol in 0.1% (v/v) diethyl pyrocarbonate (DEPC)-treated double-distilled water, dried at 55°C, and resuspended in 50 µl of 0.1% (v/v) DEPC-treated double-distilled water. RNA concentrations were determined using the SmartSpec 3000 (Bio-Rad). Before RT-PCR, samples were adjusted with 0.1% (v/v) DEPC to obtain the same RNA concentrations. Synthesis of cDNA was performed with the SuperScript first-strand synthesis system (Invitrogen) using reverse primers (Table 1, Fig. 1) instead of oligo(dT). PCR parameters were as described above.

Sodium dodecylsulfate-polyacrylamide gel electrophoresis and zymograms analysis

Bacterial cultures with approximately the same number of cells were transferred to LB broth with ampicillin and grown overnight for a period corresponding to the time that yielded the highest endochitinase activity, as previously determined based on the results of studies on the kinetics of chitinase synthesis. Cultures were centrifuged, pellets discarded, and supernatants were concentrated by adding ammonium sulphate to 80% saturation with constant stirring overnight. Concentrated proteins were resuspended in 100 mmol l⁻¹ phosphate buffer and

dialysed overnight against the same buffer. Protein samples were denatured in Laemmli's (1970) disruption buffer and fractionated by sodium dodecylsulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) in a 12% (w/v) gel. After electrophoresis, proteins were renatured by removing SDS and 2-mercaptoethanol with casein-EDTA wash buffer (10 g l⁻¹ casein, 2 mmol l⁻¹ EDTA, 40 mmol l⁻¹ Tris-HCl, pH 9), and detection of in-gel chitinase activity was measured using 4-MU-(GlcNAc)₃, as previously described (Barboza-Corona *et al.* 2003).

Chitinase activity by reduction of 3,5-dinitrosalicylic acid

Endochitinase activities were determined by 3,5-dinitrosalicylic acid (DNS) reduction assays with chitin-derived oligosaccharides (OGS) released during the hydrolysis of colloidal chitin, based on the method described by Rojas-Avelizapa *et al.* (1999) with minor modifications; i.e. 1.7 ml of concentrated proteins preparations with chitinolytic activity of ~1.1 U ml⁻¹ was mixed with 0.1 ml of 10% (w/v) colloidal chitin, 0.2 ml of 120 mmol l⁻¹ phosphate buffer (pH 6.8), and incubated at 37°C or 55°C for at least 8 h to generate OGS. Subsequently, samples were centrifuged and 0.2 ml of supernatants were taken at 2 h intervals, mixed with 0.2 ml of 1% DNS (dissolved in 30% sodium potassium tartrate in 2 mol l⁻¹ NaOH), and boiled for 10 min. Samples were incubated for 5 min at room temperature and then 0.6 ml of water was added to each reaction. The mixtures were centrifuged at 17 000 g for 2 min, supernatants were collected, and absorbance was recorded at 535 nm. One unit (UR) was defined as the amount of enzyme required to release 1 µEq of reducing sugar in 1 h.

Thin layer chromatography analysis

Reactions containing crude ChiA74 and ChiA Nima chitinases and colloidal chitin were performed as described above. Samples were centrifuged and supernatant were concentrated in a DNA120 SpeedVac (Thermo-Savant). Pellets were resuspended in 50 µl of double distilled water and OGS were analysed by silica gel (Merck) thin layer chromatography (TLC) using 5 : 4 : 3 (v/v/v) *n*-butanol : methanol : 16% aqueous ammonia as the mobile phase. Samples were visualized by staining with 2.4% (w/v) phosphomolybdic acid, 5% (v/v) sulfuric acid, and 1.5% (v/v) phosphoric acid (phosphomolybdic acid reagent) (Kadokura *et al.* 2007b).

Antimicrobial activity

Antibacterial activity of OGS against food-borne pathogenic bacteria (*Bacillus cereus*, *Enterobacter cloacae*, *E. coli*,

Pseudomonas aeruginosa, *Staphylococcus aureus* and *S. xylo-sus*) was determined using the modified well-diffusion method (Barboza-Corona *et al.* 2007). Twenty-five millilitre of tryptic soy broth (TSB) with soft agar 0.7% (w/v) was mixed with 50 µl (~1 × 10⁹ cells ml⁻¹) of each bacterium and plated. Wells, 7 mm in diameter, were dug into the agar and 0.05–0.1 ml preparations of crude chitin-derived OGS (see above), control reactions without enzyme or chitin, and kurstacin 287, a bacteriocin synthesized by *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* (LBIT-287) (Barboza-Corona *et al.* 2007), were added to the wells. Plates were incubated for 12 h at 4°C, followed by an additional incubation at 28°C for 1 day, after which diameters of zones of inhibition were measured. The minimum detectable zone measured for analytical purposes was 1 mm beyond the well diameter. Assays were repeated in triplicate and the average was recorded for each sample. For quantitative purposes, we defined one chitin oligosaccharide inhibition unit (IU) as equal to 1 mm² of the zone of inhibition of growth of the indicator bacterium.

Results

Heterologous expression and synthesis of chitinases in *E. coli*.

To determine whether recombinant *E. coli* DH5αF' transformed with the pBSKS(+) or pHT3101 vectors (respectively, pBSNima and pBS74, and pEANima and pEHchiA74) harboring the *chiA Nima* and *chiA74* genes (Ruiz-Sánchez *et al.* 2005a; Casique-Arroyo *et al.* 2007) synthesized and secreted heterologous endochitinases, concentrated proteins from culture supernatants were fractionated by SDS-PAGE, and renatured proteins were assayed by zymogram analysis for chitinolytic activity using 4-MU-(GlcNAc)₃ (Barboza-Corona *et al.* 2003) (Fig. 2). As expected, *E. coli* DH5αF-pBS74 and *E. coli* DH5αF-pEHchiA74 produced an endochitinase with a molecular mass ~70 kDa, whereas for *E. coli* DH5αF-pEANima and *E. coli* DH5αF-pBSNima, an endochitinase of ~60 kDa was observed (Fig. 2, lanes 1–4). No endochitinase was detected in control nontransformed *E. coli* DH5αF' (Fig. 2, lane 5).

Kinetics of endochitinase gene expression and enzyme activities

The results shown in Fig. 2 demonstrated that recombinant strains synthesized and secreted the ChiA Nima and ChiA74 chitinases. To determine the time during bacterial growth where the highest yield of heterologous chitinases occurred, kinetic studies using fluorogenic

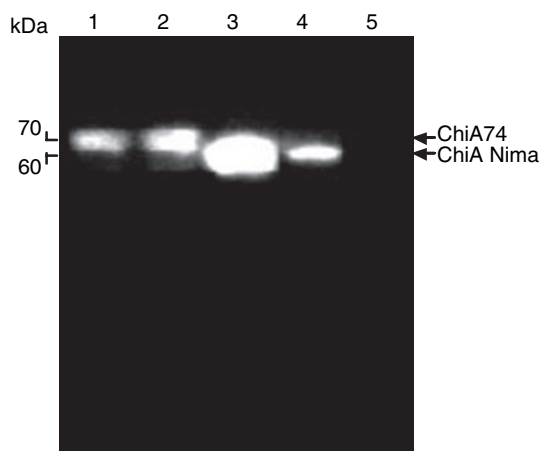


Figure 2 Zymogram analyses of recombinant endochitinases synthesized in *Escherichia coli*. Bacteria were cultivated in LB and secreted proteins were concentrated with ammonium sulfate. The same amount of proteins was separated in SDS-PAGE gel and chitinolytic activity was detected with 4-MU-(GlcNAc)₃. Lane 1, *E. coli* DH5 α F'-pBS74; lane 2, *E. coli* DH5 α F'-pEHchiA74; lane 3, *E. coli* DH5 α F'-pEANima; lane 4, *E. coli* DH5 α F'-pBSNima; lane 5; *E. coli* DH5 α F'. Molecular weights were determined based on Bench-Mark protein ladder (Invitrogen). Arrows indicate the position of ChiA74 and ChiA Nima.

4-MU-(GlcNAc)₃ were performed as described previously (Barboza-Corona *et al.* 2003; Ruiz-Sánchez *et al.* 2005a). At ~20 h, the highest chitinase production was observed for *E. coli* DH5 α F'-pEHchiA74, followed by *E. coli* DH5 α F'-pBS74, *E. coli* DH5 α F'-pEANima and *E. coli* DH5 α F'-pBSNima (Fig. 3a–d).

With dot-blot analysis using *chiA74* and *chiA Nima* gene sequences as probes, we detected the corresponding mRNAs at approximately 6 h of growth (data not shown). This result coincides well with the initiation of chitinolytic activity noted during the early stages of bacterial growth (Fig. 3a–d). Chitinase-specific mRNAs were also detected by RT-PCR at ~20 h at which time maximal levels of chitinase activities were observed (Fig. 3a–d). In similar studies, we have noted maximal synthesis of ChiA74 (Casique-Arroyo *et al.* 2007) and ChiA Nima (Ruiz-Sánchez 2005) at, respectively, ~48 and 90 h in *Bacillus thuringiensis* and *Serratia marcescens* Nima strains.

Production of oligosaccharides with ChiA Nima

A major objective of this study was to determine whether the endochitinases synthesized *E. coli* could be effectively used to generate oligosaccharides (OGS) from chitin. For this purpose, we used colloidal chitin [0.5% (w/v), final concentration] as a substrate in reactions with ~1 U of these enzymes (see Materials and methods), and the

relative activities were quantified in equivalents (eq) of reducing sugars produced from the generated OGS. The highest activity was observed with ChiA Nima produced by recombinant *E. coli* DH5 α F'-pEANima, an activity ~4 times higher than that of the other recombinant bacteria (Table 2). Because ChiA Nima showed the highest activity with colloidal chitin, we chose this enzyme to determine whether the oligosaccharides produced by its hydrolytic action had activity against food-borne pathogenic bacteria. Before bioassays, we evaluated two temperatures over a prolonged period of 8 h to determine the thermostability of this enzyme, i.e. 37°C as it is the optimal growth temperature for *E. coli* and *S. marcescens*, and 55°C because it is near the optimal temperature for ChiA Nima (Ruiz-Sánchez *et al.* 2005a) catalysis (Fig. 4). ChiA Nima remained active over 8 h, and incremental increases in OGS were observed. The highest activity was observed at 55°C, where it was ~1.5 times higher than that observed at 37°C. Thus we chose an incubation time of 8 h at 55°C for OGS production.

When colloidal chitin was digested with ChiA Nima for 8 h at 55°C similar OGS patterns were detected by TLC. Under the conditions used in the assay [(GlcNAc)₆], [(GlcNAc)₅] and [(GlcNAc)₃] derivative were detected (Fig. 5). However other derivatives with higher degrees of polymerization could have been produced as other components in the reaction did not migrate from the origin suggesting that they had molecular masses greater than the hexameric OGS (Fig. 5).

Antimicrobial activity

Crude chitin oligosaccharide mixtures produced by ChiA Nima were assayed for antibacterial activity against different food-borne pathogens using a modified well-diffusion method (Barboza-Corona *et al.* 2007). As a positive control we used kurstacin-287, a bacteriocin produced by *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* (LBIT 287) (Barboza-Corona *et al.* 2007). In these studies, antimicrobial activity was detected against both Gram-negative and Gram-positive bacteria, respectively, *Enterobacter cloacae* and *E. coli*, and *Staphylococcus aureus* and *S. xylosus*. No activity was observed against *Pseudomonas aeruginosa* and *B. cereus* (Table 3).

Discussion

In the present study, we expressed endochitinase genes, *chiA74* from *Bacillus thuringiensis* and *chiA Nima* from *Serratia marcescens* (Barboza-Corona *et al.* 2003; Ruiz-Sánchez *et al.* 2005a), in *Escherichia coli* and demonstrated that the encoded active enzymes were synthesized and secreted as early as 6 h and maximally at ~20 h of

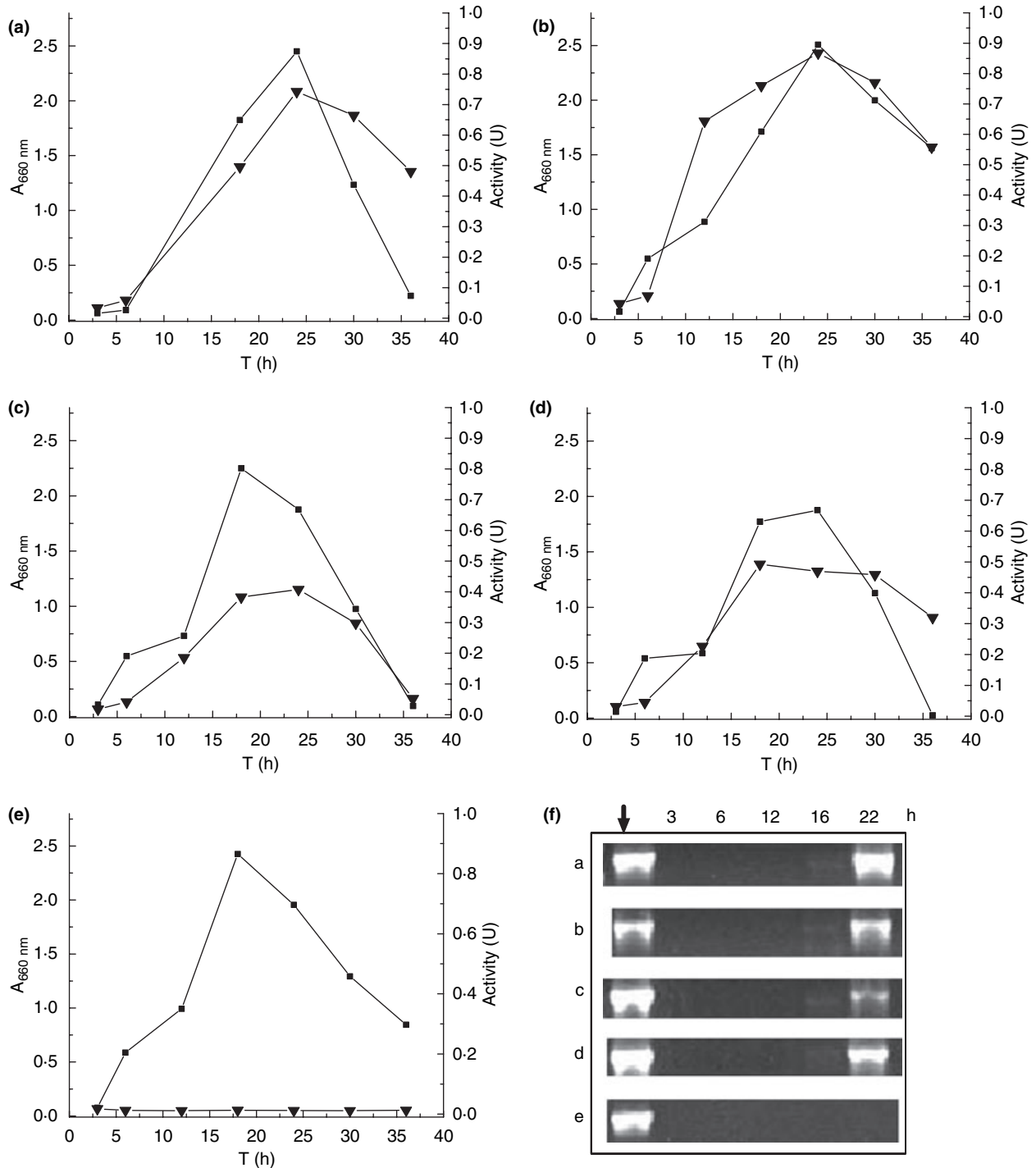
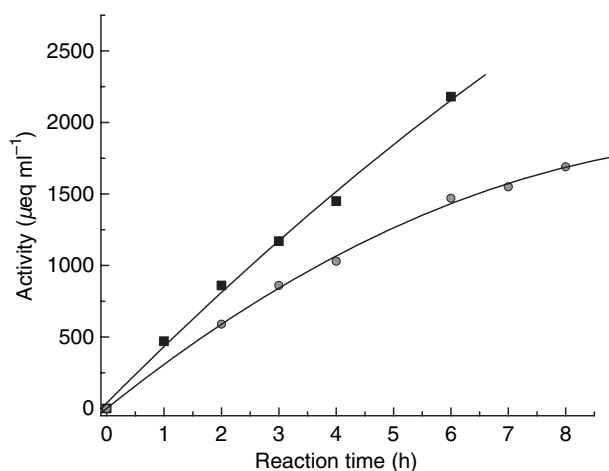


Figure 3 Growth curve and corresponding endochitinase production in culture medium of recombinant and wild-type strains of *Escherichia coli*. Bacteria were grown in LB with ampicillin and duplicate samples were collected at different time intervals. One sample was used for measuring optical density at 600 nm (■) and the other sample was used to evaluate endochitinase production in the supernatant using fluorogenic 4-MU-(GlcNAc)₃ (▼) and for *chiA74*- and *chiA Nima*-specific RT-PCR studies. (a, Fa), *E. coli* DH5 α F'-pBS74; (b, Fb), *E. coli* DH5 α F'-pEH*chiA74*; (c, Fc), *E. coli* DH5 α F'-pBS*Nima*; (d, Fd), *E. coli* DH5 α F'-pEAN*Nima*; (e, Fe), *E. coli* DH5 α F' and (f) RT-PCR detection of *chiA74* and *chiA Nima* transcripts at different times. Arrow indicates signals obtained with *chiA74* (a, b) and *chiA Nima* (c-e) used as positive control. One unit (U) is defined as the amount of enzyme required to release 1 μ mol of 4-methylumbelliferone in 1 h. Standard deviations were smaller than the size symbols used for each point.

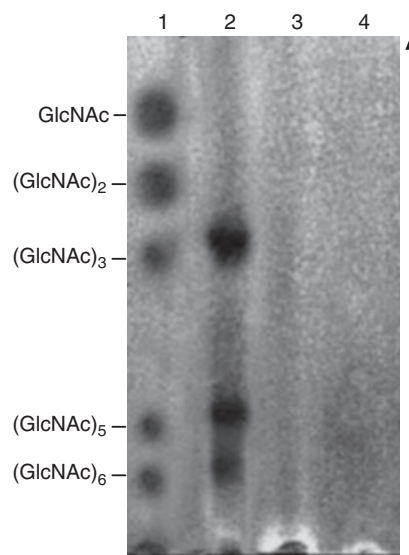
Table 2 Determination of chitinolytic activity by the release of reducing sugars (UR) at 55°C using colloidal chitin as the substrate

Strains	UR × 10 ⁶	Ratio
<i>Escherichia coli</i> DH5 α F'-pBS74	1.74	1.12
<i>E. coli</i> DH5 α F'-pEHchiA74	2.08	1.34
<i>E. coli</i> DH5 α F'-pBSNima	1.55	1.00
<i>E. coli</i> DH5 α F'-pEANima	6.15	3.98

**Figure 4** Activity ($\mu\text{Eq ml}^{-1}$) of ChiA Nima at different times. Chitinolytic activity was evaluated by measuring reducing sugar at two temperatures 55°C (■) and 37°C (●). Colloidal chitin was used as substrate.

incubation. In particular, we showed that heterologous expression of these genes in *E. coli* resulted in higher yields of enzymatic activities in a shorter period of time when compared to synthesis in *B. thuringiensis* (Casique-Arroyo *et al.* 2007) and *S. marcescens* Nima (Ruiz-Sánchez 2005), in which the corresponding activities occurred maximally at respectively ~ 48 and 90 h. Furthermore, from an applied perspective, our major objective was to determine whether these endochitinases, particularly ChiA Nima, could be used for the production of oligosaccharides (OGS) from chitin, a biopolymer widely distributed in nature, as OGS could be utilized as prebiotic ingredients and food preservatives (Campbell *et al.* 1997; Shabrukova *et al.* 2002; Barreateau *et al.* 2006; Kadokura *et al.* 2007a), and potentially as antitumorigenic, antiangiogenic, antimicrobial, hypocholesterolemic, and antihypertensive agents (Suzuki *et al.* 1986; Kobayashi *et al.* 1990; Choi *et al.* 2001; No *et al.* 2002; Chen *et al.* 2005; Bhattacharya *et al.* 2007; Wang *et al.* 2007).

Although chemical processing of chitin to produce OGS for use in the food and pharmaceutical industries is a viable methodology, there is a potential for chemical contamination in the final products (Wang *et al.* 2006).

**Figure 5** Thin-layer chromatography analysis of products from hydrolysis of colloidal chitin by ChiA Nima. Lane 1, molecular marker (Sigma) containing a mixture of β -(1,4) *N*-acetyl-D-glucosamine (GlcNAc), chitobiose (GlcNAc)₂, chitotriose (GlcNAc)₃, chitopentaose (GlcNAc)₅, and chitohexaose (GlcNAc)₆. Oligosaccharides produced from colloidal chitin with ChiA Nima (lane 2). Control reaction supplemented with ChiA Nima but not with chitin (lane 3), or supplemented with chitin but not with endochitinase (lane 4).**Table 3** Inhibitory activity (IU) of chitin-derived oligosaccharides produced by ChiA Nima compared to IU of the bacteriocin, Kurstacin 287

Pathogenic bacteria	Chitiligosaccharides	Kurstacin 287
<i>Bacillus cereus</i>	–	481
<i>Enterobacter cloacae</i>	126	441
<i>Escherichia coli</i>	104	402
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	–	565
<i>Staphylococcus aureus</i>	103	–
<i>S. xylosum</i>	104	610

–, without activity.

Thus, OGS preparations derived from chemical processing of chitin require strict monitoring to ensure the absence of toxic components and to validate that toxins are within acceptable ranges. Alternatively, enzymatic cleavage of chitin to produce OGS could offer a more suitable approach that significantly reduces or eliminates the presence of toxic components that accrue from chemical processing. Secreted crude proteins containing natural chitinase-producing strains of bacteria and fungi have been exploited for producing OGS. However, their use is limited due to the possibility that contamination of final products could pose health risks to consumers. For example, wild-type strains of *B. thuringiensis*, a Gram-positive

sporeformer, harbour genes, including cryptic genes, that code for various toxins including entomopathogenic crystal toxins (Cry protein) and cytotoxins (e.g. A and K), and haemolytic (e.g. HblACD) and nonhemolytic toxins (e.g. NheA, B, C), enterotoxins that are toxigenic for mammal (Federici 2005; Swiecicka *et al.* 2006). In addition, the use of *B. thuringiensis* is disadvantageous as it is known to secrete hydrolytic enzymes, such as proteases which complicate downstream processes and affect product stability (Simonen and Palva 1993). Similarly, the use of *S. marcescens* in OGS production is limited, as this Gram-negative enteric bacillus is an opportunistic pathogen of humans, being an etiologic agent of several diseases including urinary tract infections, and superficial and systemic infections (Ruiz-Sánchez *et al.* 2005b; Rodriguez *et al.* 2006).

In contrast, laboratory strains of *E. coli* have been used extensively for the production of recombinant proteins, either intracellularly or extracellularly, and in particular, it has been demonstrated that this bacterium has similar molecular mechanisms for protein export as those observed in *Bacillus* spp. (Yamabhai *et al.* 2008). The latter is conducive for mass producing active ChiA74 and ChiA Nima from culture supernatants, as we have observed here (Figs 2 and 3), indicating that their native signal peptides are effective for export once synthesized in *E. coli*. Thus, heterologous synthesis of recombinant endochitinases in *E. coli* is especially advantageous. Furthermore, ChiA 74 and ChiA Nima do not appear to be susceptible to rapid proteolytic degradation or aggregation as have been reported for several proteins heterologously synthesized in *E. coli* (Nishihara *et al.* 1998; Zhang *et al.* 2007).

In this regard, we have also observed that ChiA74 and ChiA Nima retain high levels of enzymatic activity in crude samples prepared from wild-type strains, respectively, *B. thuringiensis* and *Serratia marcescens*, and *E. coli* after prolonged exposure to room temperature and frozen storage in the absence protease inhibitors (Jose E. Barboza-Corona, unpublished data). Although the specific reason(s) for resistance of ChiA74 and ChiA Nima to proteolytic cleavage in *E. coli* is presently unknown, contributing factors could include: (i) escape from intracellular proteases as these endochitinases are efficiently secreted (Yamabhai *et al.* 2008); (ii) presence of salt bridges between domains in these enzymes that stabilize their overall structure (Masson *et al.* 2002); and (iii) the presence of glycosylated regions that protect these enzymes from proteolytic cleavage, as has been observed with bacterial cellulases (Langsford *et al.* 1987) and chitinases of *Manduca sexta* (Arakane *et al.* 2003).

The production of antimicrobial OGS derived from chitin after digestion with ChiA Nima (Table 3, Fig. 5)

suggests that this enzyme could have utility in generating large scale quantities of these derivatives for applied use in food and pharmaceutical products. The lack of activity against *P. aeruginosa* and *B. cereus* could be due to the absence of active OGS against these species, although suppression of bacterial growth by OGS is known to be concentration-dependent (No *et al.* 2002). As such, it is possible that higher quantities of OGS produced by ChiA Nima degradation could elicit an inhibitory response.

In similar studies, antibacterial and antitumoral activities of a chitin-derived OGS of 6 degrees of polymerization (DP) [(GlcNAc)₆] have been reported (Tokoro *et al.* 1988, 1989), and a mixture of chitin-derived oligosaccharides with DP of 1 to 6 produced by the hydrolytic action of a chitinase from *B. subtilis* W-118 had deleterious effects on the opportunistic fungal pathogen, *Fusarium oxysporum*, and human leukaemia cell lines (Wang *et al.* 2006). Our TLC data (Fig. 5) showed the production of at least three OGS derived from chitin that could act individually or synergistically to produce the observed antimicrobial effect against food-borne bacterial pathogens. Further studies are required to distinguish the fraction(s) responsible for antimicrobial activity and to determine whether any of these have antitumorigenic and other pharmaceutical utility.

In summary, we have clearly demonstrated that ChiA Nima and ChiA74 are endochitinases that can be secreted in a bioactive form by the protein export system of *E. coli*. Our future studies include developing methods to mass produce these endochitinases in *E. coli* and to separate and purify the different OGS components for antimicrobial and pharmaceutical assays.

Acknowledgements

This research was supported by a grant (SEP-2003-C02-44990, Mexico) to J.E.B.-C. The authors are grateful to R. Tania Amaral Naranjo (University of Guanajuato) for her technical assistance. OBGA, MIC and N de la FS, respectively, undergraduate and graduate students, are supported by fellowships from CONACyT, México. We are especially thankful for Dr Ramon Cruz-Camarillo (ENCB-IPN, Mexico), for his advice and discussions at the commencement of this study.

References

- Arakane, Y., Zhu, Q., Matsumiya, M., Muthukrishnan, S. and Kramer, K.J. (2003) Properties of catalytic, linker and chitin-binding domains of insect chitinases. *Insect Biochem Mol Biol* **33**, 631–648.
- Barboza-Corona, J.E., Nieto-Mazzocco, E., Velázquez-Robledo, R., Salcedo-Hernández, R., Bautista, M., Jiménez, B. and

- Ibarra, J.E. (2003) Cloning, sequencing, and expresión of the chitinase gene *chiA74* from *Bacillus thuringiensis*. *Appl Environ Microbiol* **69**, 1023–1029.
- Barboza-Corona, J.E., Vázquez-Acosta, H., Bideshi, D. and Salcedo-Hernández, R. (2007) Bacteriocin-like inhibitor substances production by Mexican strains of *Bacillus thuringiensis*. *Arch Microbiol* **187**, 117–126.
- Barreteau, H., Delattre, C. and Michaud, P. (2006) Production of oligosaccharides as promising new food additive generation. *Food Technol Biotechnol* **44**, 323–333.
- Bhattacharya, D., Nagpure, A. and Gupta, R.K. (2007) Bacterial chitinases: properties and potential. *Critical Rev Biotechnol* **27**, 21–28.
- Campbell, J.M., Fahey, G.C., Jr and Wolf, B.W. (1997) Selected indigestible oligosaccharide affect large bowel mass, cecal and fecal short-chain fatty acids, pH and microflora in rats. *J Nutr* **127**, 130–136.
- Casique-Arroyo, G., Bideshi, D., Salcedo-Hernández, R. and Barboza-Corona, J.E. (2007) Development of a recombinant strain of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD-73 that produces the endochitinase ChiA74. *Antonie van Leeuwenhoek* **92**, 1–9.
- Chen, A.S., Taguchi, T., Sakai, K., Matahira, Y., Wang, M.W. and Miwa, I. (2005) Effect of chitobiose and chitotriose on carbon tetrachloride-induced acute hepatotoxicity in rats. *Biol Pharm Bull* **28**, 1971–1973.
- Choi, B.K., Kim, K.Y., Yoo, Y.J., Oh, S.J., Choi, J.H. and Kim, C.Y. (2001) *In vitro* antimicrobial activity of a chito-oligosaccharide mixture against *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Streptococcus mutans*. *Int J Antimicrob Agents* **18**, 553–557.
- Federici, B.A. (2005) Insecticidal bacteria: an overwhelming success for invertebrate pathology. *J Invertebr Pathol* **89**, 30–38.
- Kadokura, K., Sakamoto, K., Saito, K., Ikegami, T., Hirano, T., Hakamata, W., Oku, T. and Nishio, T. (2007a) Production of a recombinant chitin oligosaccharide deacetylase from *Vibrio parahaemolyticus* in the culture medium of *Escherichia coli* cells. *Biotechnol Lett* **29**, 1209–1215.
- Kadokura, K., Rokutani, A., Yamamoto, M., Ikegami, T., Sugita, H., Itoi, S., Hakamata, W., Oku, T. and Nishio, T. (2007b) Purification and characterization of *Vibrio parahaemolyticus* extracellular chitinase and chitin oligosaccharide deacetylase involved in the production of heterodisaccharide from chitin. *Appl Microbiol Biotechnol* **75**, 357–365.
- Kobayashi, M., Watanabe, T., Suzuki, S. and Suzuki, M. (1990) Effect of *N*-acetylchitoheptaose against *Candida albicans* infection of tumor-bearing mice. *Microbiol Immunol* **34**, 413–426.
- Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680–685.
- Langsford, M.L., Gilkes, N.R., Singh, B., Moser, B., Miller, R.C., Jr, Warren, R.A. and Kilburn, D.G. (1987) Glycosylation of bacterial cellulases prevents proteolytic cleavage between functional domains. *FEBS Lett* **225**, 163–167.
- Lereclus, D., Arantes, O., Chaufaux, J. and Lecadet, M.M. (1989) Transformation and expression of a cloned δ -endotoxin gene in *Bacillus thuringiensis*. *FEMS Microbiol Lett* **60**, 211–218.
- Masson, L., Tabashnik, B.E., Mazza, A., Prefontaine, G., Potvin, L., Rossea, R. and Schwartz, J.L. (2002) Mutagenic analysis of a conserved region of Domain III in the Cry1Ac toxin of *Bacillus thuringiensis*. *Appl Environ Microbiol* **68**, 194–200.
- Nakakuki, T. (2002) Present status and future of functional oligosaccharide development in Japan. *Pure Appl Chem* **74**, 1245–1251.
- Nishihara, K., Kanemori, M., Kitawava, M., Yanagi, H. and Yura, T. (1998) Chaperone coexpression plasmid: differential and synergistic roles of DnaK-DnaJ-GrpE and GroEL-GroES in assisting folding of an allergen of Japanese cedar pollen, Cryj2 in *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol* **64**, 1694–1699.
- No, H.K., Park, N.Y., Lee, S.H., Hwang, H.J. and Meyer, S.P. (2002) Antibacterial activities of chitosans and chitosan oligomers with different molecular weight on spoilage bacteria isolated from tofu. *Food Microbiol Safety* **67**, 1511–1514.
- Ramírez-Coutiño, L., Marín-Cervantes, M.C., Huerta, S., Revah, S. and Shirai, K. (2006) Enzymatic hydrolysis of chitin in the production of oligosaccharides using *Lecanicillium fungicola* chitinases. *Process Biochem* **41**, 1106–1110.
- Rodríguez, A.P., Holanda, A.R., Lustosa, G.P., Nóbrega, S.M., Santana, W.J., Souza, L.B. and Coutinho, H.D. (2006) Virulence factors and resistance mechanisms of *Serratia marcescens*. *Acta Microbiol Immunol Hung* **53**, 89–93.
- Rojas-Avelizapa, L.I., Cruz-Camarillo, R., Guerrero, M.I., Rodríguez-Vázquez, R. and Ibarra, J.E. (1999) Selection and characterization of a proteo-chitinolytic strain of *Bacillus thuringiensis*, able to grow in shrimp waste media. *World J Microbiol Biotechnol* **15**, 261–268.
- Ruiz-Sánchez, A. (2005) *Characterization of the chitinolytic system of Serratia marcescens* Nima and cloning of a chitinase gene. PhD Dissertation, National School of Biological Science at Polytechnic Institute of Technology, México D.F.
- Ruiz-Sánchez, A., Cruz-Camarillo, R., Salcedo-Hernández, R., Ibarra, J. and Barboza-Corona, J.E. (2005a) Molecular cloning and purification of an endochitinase from *Serratia marcescens* (Nima). *Mol Biotechnol* **31**, 103–111.
- Ruiz-Sánchez, A., Cruz-Camarillo, R., Salcedo-Hernández, R. and Barboza-Corona, J.E. (2005b) Chitinases from *Serratia marcescens* Nima. *Biotechnol Lett* **27**, 649–653.
- Shabrukova, N.V., Shestakova, L.M., Zainetdinova, D.R. and Gamayurova, V.S. (2002) Research of acid hydrolyses of chitin-glucan and chitosan-glucan complexes. *Chem Comp Simul Butlerov Comm* **2**, 57–59.
- Simonon, M. and Palva, I. (1993) Protein secretion in *Bacillus species*. *Microbiol Rev* **57**, 109–137.

- Suzuki, K., Mikami, T., Okawa, Y., Tokoro, A., Suzuki, S. and Suzuki, M. (1986) Antitumor effect of hexa-*N*-acetylchito-hexaose and chito-hexaose. *Carbohydr Res* **151**, 403–408.
- Suzuki, K., Sugawara, N., Suzuki, M., Uchiyama, T., Katouno, F., Nikaidou, K. and Watanabe, T. (2002) Chitinases A, B, and C1 of *Serratia marcescens* 2170 produced by recombinant *Escherichia coli*: enzymatic properties and synergism on chitin degradation. *Biosci Biotechnol Biochem* **66**, 1075–1083.
- Swiecicka, I., Van der Auwera, G.A. and Mahillon, J. (2006) Hemolytic and nonhemolytic enterotoxin genes are broadly distributed among *Bacillus thuringiensis* isolated from wild mammals. *Microb Ecol* **52**, 544–551.
- Tokoro, A., Tatewaki, N., Mikami, T., Suzuki, S. and Suzuki, M. (1988) Growth-inhibitory effect of hexa-*N*-acetylchito-hexaose and chito-hexaose against Meth-A solid tumor. *Chem Pharm Bull* **36**, 784–790.
- Tokoro, A., Kobayashi, M., Tatewaki, N., Suzuki, K., Okawa, Y., Mikami, T., Suzuki, S. and Suzuki, M. (1989) Protective effect of *N*-acetylchito-hexaose on *Listeria monocytogenes* infection in mice. *Microbiol Immunol* **33**, 357–367.
- Wang, S.L., Lin, T.Y., Yen, Y.H., Liao, H.F. and Chen, Y.J. (2006) Bioconversion of shellfish chitin wastes for the production of *Bacillus subtilis* W-118 chitinase. *Carbohydr Res* **341**, 2507–2515.
- Wang, Z., Zheng, L., Yang, S., Niu, R., Chu, E. and Lin, X. (2007) *N*-acetylchito-oligosaccharide is a potent angiogenic inhibitor both *in vivo* and *in vitro*. *Biochem Biophys Res Comm* **357**, 26–31.
- Yamabhai, M., Emrat, S., Sukasem, S., Pesatcha, P., Jaruseranee, N. and Buranabanyat, M. (2008) Secretion of recombinant *Bacillus* hydrolytic enzymes using *Escherichia coli* expression systems. *J Biotechnol* **133**, 50–57.
- Zhang, H., Wu, H. and Zhang, H. (2007) A novel high-copy plasmid, pEC, compatible with commonly used *Escherichia coli* cloning and expression vectors. *Biotechnol Lett* **29**, 431–437.

Note

A new rapid fluorogenic method for measuring bacteriocin activity

Norma de la Fuente-Salcido^{a,b,c}, Rubén Salcedo-Hernández^a, Ma. Guadalupe Alanís-Guzmán^c,
Dennis K. Bideshi^{d,e}, J. Eleazar Barboza-Corona^{a,*}

^a Universidad de Guanajuato, Departamento de Ingeniería en Alimentos, Instituto de Ciencias Agrícolas, Irapuato, Guanajuato, 36500 Mexico

^b Universidad Autónoma de Coahuila, Escuela de Ciencias Biológicas, Torreón, Coahuila, 27440 Mexico

^c Universidad Autónoma de Nuevo León, Facultad de Ciencias Biológicas, San Nicolás de los Garza, Nuevo León, Mexico

^d California Baptist University, Department of Natural and Mathematical Sciences, 8432 Magnolia Avenue, Riverside, California 92504, United States

^e Department of Entomology, University of California, Riverside, California 92521, United States

Received 7 January 2007; received in revised form 29 March 2007; accepted 29 March 2007

Available online 11 April 2007

Abstract

We describe a novel bacteriocin screening assay based on fluorescence emitted by berberine following its influx into compromised cells. This technique showed agreement with the conventional well-diffusion method, and results can be obtained within one hour. This assay could facilitate the rapid identification of bacteriocinogenic bacterial isolates.

© 2007 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Bacteriocin activity; Berberine; Fluorescence; *Bacillus thuringiensis*

Bacteriocins are antimicrobial peptides that are synthesized and secreted by bacteria, and because they elicit an inhibitory effect on microbial populations they can potentially be used as natural food preservatives (Oscáriz and Pisabarro, 2001). As the search for viable and stable bacteriocins for use in the food industry is expanding (Alvarado et al., 2005), developing new rapid protocols could facilitate screening and identification of microbes that produce these peptides.

At present, the methods for determining bacteriocin activity are based on enzymatic and non-enzymatic procedures. Enzymatic methods rely on immediate measurement of intracellular enzymes released after cellular lysis upon exposure to bacteriocins. For example, elevated levels of lactate dehydrogenase (LDH) have been observed following lysis of susceptible strains by lactococcins (Morgan et al., 1995). Although enzymatic methods can generate rapid results, their accuracy can be compromised by the quality of crude bacteriocin preparations contaminated by the enzymes being assayed, which could yield false positive results.

In the non-enzymatic method, conventional techniques are the well-diffusion or disc diffusion methods, where bacteriocins

are added in wells dug into solid culture media, or on sterilized paper discs placed on the surface of agar pre-inoculated with an indicator strain (Tagg and McGiven, 1971; Bhunia et al., 1988). In the “spot-on-lawn” or “agar spot” method, bacteriocinogenic bacteria are flooded or cultivated on culture agar containing indicator strains (Barefoot and Klaenhammer, 1983; Venema et al., 1993; Schillinger and Lücke, 1989). Recently, a “deferred-antagonism” plate assay was reported in which bacteriocinogenic bacteria are inoculated in a straight line on agar medium and then the indicator strain is grown perpendicularly, inducing an inhibitory zone at the intersection, the distance which could be used for quantitative analyses (Mélançon and Grenier, 2003). With these methods, results are typically acquired within 2–3 days, and accuracy of these procedures may be compromised due to subjective measurements of inhibition zone (halos), or in determining the last (critical) dilution that produced detectable halos around wells or discs (Delgado et al., 2005; Barboza-Corona et al., 2007). In addition to these time-consuming procedures, errors in quantitative analyses can result from inconsistencies in the geometric progression of halos as bacteriocin concentration increase (Delgado et al., 2005).

Non-enzymatic methods using liquid medium and spectrophotometry or colony counts of indicator bacteria, also present limitations that can significantly affect the accuracy of results

* Corresponding author. Tel./fax: +52 462 624 2484.

E-mail address: josebar@dulcinea.ugto.mx (J.E. Barboza-Corona).

(Kumazaki and Ishii, 1982; Mayr-Harting et al., 1972). For example, even though these methods are more cost-effective and eliminate problems associated with agar diffusion methods, cell sedimentation, interference by sample color, and sigmoidal curve relationships between the bacteriocin concentration and inhibitory responses can adversely influence the accuracy of results (Delgado et al., 2005).

Here, we describe a new and rapid methodology for determining bacteriocin activity based on berberine fluorescence. We also show that this method correlates with the conventional well-diffusion method. Berberine is an alkaloid that fluoresces when located intracellularly. Although the mechanism for this peculiarity is unknown, it is well-established that berberine fluoresces when it binds to different biomolecules, including DNA and glycosaminoglycans (Reyes et al., 2004; Talwalkar et al., 2005). Berberine is smaller than ATP and can enter cells either through pores or after the disruption of the cytoplasmic membrane (Oscáriz and Pisabarro, 2001). In principle, membrane damage induced by bacteriocins will cause intracellular localization of berberine, and compromised cells will fluoresce. Therefore, our methodology could be applied for screening bacteriocins whose antimicrobial activities are based on membrane pore formation or disruption of membrane integrity.

In this study, we assayed different bacteriocins (Morricin 269, Kurstacin 287, Kenyacin 404, Entomocin 420, Tolworthcin 524) produced by Mexican strains of *Bacillus thuringiensis* (Barboza-Corona et al., 2007) to demonstrate the efficacy of this rapid fluorescence assay. The susceptible indicator strain was *Bacillus cereus* 183. To produce crude bacteriocins, strains were cultivated in tryptic soy broth (TSB) for 24 h at 28 °C, centrifuged at 10,000 $\times g$ for 15 min, and the supernatant was filtered through 0.20-mm filter (Barboza-Corona et al., 2007). Supernatants were concentrated with ammonium sulfate to 80% saturation and precipitated at 4 °C with constant stirring

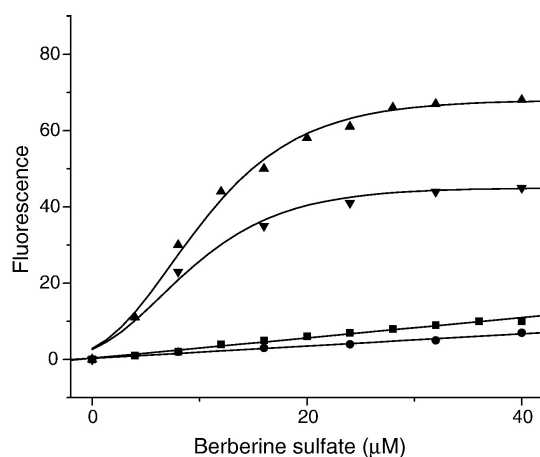


Fig. 1. Fluorescence emitted by berberine sulfate upon intracellular localization in *Bacillus cereus*. Inverted black triangles, 2×10^8 *B. cereus* cells treated with toluene:acetone; black triangles, 4×10^8 *B. cereus* treated with toluene:acetone; black circles, live 4×10^8 *B. cereus* cells; black squares, 50 mM phosphate buffer—5% glycerol. Standard deviations were smaller than the size symbols used in each point.

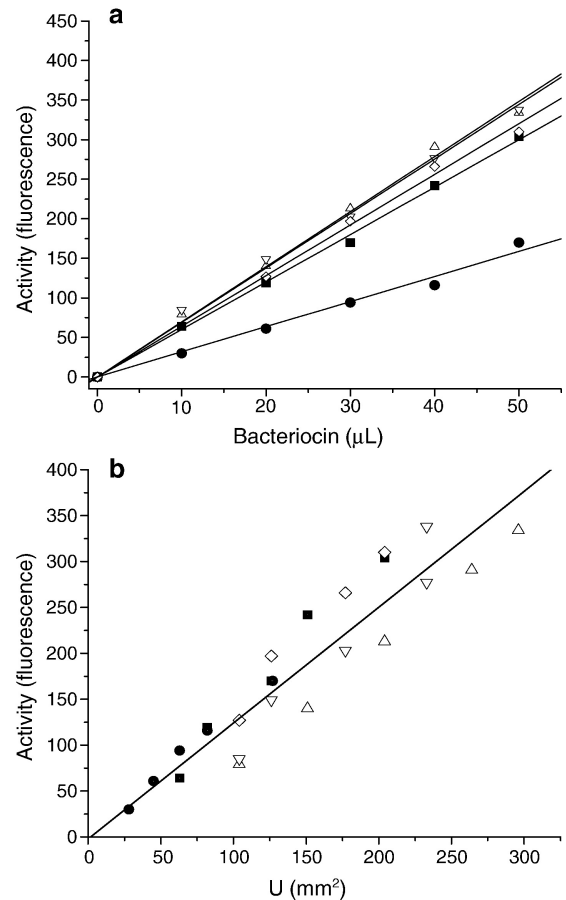


Fig. 2. a) Fluorescence emitted by berberine sulfate upon influx into *Bacillus cereus* cells treated with different bacteriocins. b) Correlation between the bacteriocin activity in mm^2 of inhibition area and fluorescence. Black squares, Morricin 269; black circles, Kurstacin 287; white triangles, Kenyacin 404; inverted white triangles, Entomocin 420; white diamonds, Tolworthcin 524. Standard deviations were smaller than the size symbols used in each point.

overnight. Precipitated proteins were pelleted by centrifugation at 16,000 $\times g$ for 30 min at 4 °C, resuspended in 100 mM phosphate buffer (pH 7.0), and dialyzed overnight against the same buffer using a mini-dialysis kit with a 1 kDa cut-off (Amersham Biosciences). The dialyzed proteins were stored at -20 °C.

To demonstrate that berberine could be used effectively in rapid bacteriocin assays, we first demonstrated that this compound would be able to fluoresce inside *B. cereus*, the indicator strain, upon permeabilization with toluene:acetone (London and Hausman, 1982). *B. cereus* was grown in TSB overnight at 28 °C, then 1 volume of this culture was added to 4 volumes of fresh TSB and incubated at 28 °C, with 200 rpm for 2 h. Cells were centrifuged at 10,000 $\times g$ for 15 min and the pellet was resuspended in 50 mM phosphate buffer with 5% (v/v) glycerol (PBG) to adjust the bacterial concentration to 2×10^8 or 4×10^8 cell/ml. Then, 200 μl of the culture was mixed with 20 μl of toluene:acetone (1:4), vortexed for 10 s and incubated at 4 °C (London and Hausman, 1982). Immediately, 20 μl of this sample was mixed with 50 mM PBG and with different volumes of 4 mM berberine sulfate (Sigma) dissolved in ethanol in a total final volume of 1000 μl . The mixtures were

incubated for 1 min at room temperature and fluorescence was determined in a Turner fluorometer (model 450; 340-nm interference filter and 415-nm cut filter). Assays were replicated in triplicates and average values were plotted against berberine concentrations (Fig. 1). Controls included cells that were not treated with toluene:acetone and reactions devoid of bacteria but with 50 mM PBG instead. In addition, controlled experiments with crude preparations of bacteriocins alone, showed no fluorescence signal (data not shown). Minimal fluorescence was detected in the controls; however, cells treated with toluene:acetone showed a marked increase in fluorescence demonstrating that cells were perforated, thereby allowing the influx of berberine. As shown in Fig. 1, higher levels of fluorescence occurred with increasing berberine concentrations or higher cell density. For subsequent experiments, we selected a bacterial concentration of 4×10^8 cell/ml and a final berberine concentration of 24 μ M based on the midpoint of the graph.

To show whether, a) bacteriocins could elicit the similar fluorescence response as cells permeabilized with toluene:acetone, and b) if this activity correlates well with standard agar diffusion methods, we performed similar experiments using the assays described above. Each experiment was repeated in triplicate and the average values used for comparative analyses. Assays were performed using bacteriocins from bacterial cultures obtained on the same or different days. In these experiments, 20 μ l ($\sim 4 \times 10^8$ cell/ml) of *B. cereus* was mixed with 0 to 50 μ l of bacteriocin preparation and volumes were adjusted to 100 μ l with 50 mM PBG. Reactions were incubated for 5 min at room temperature. Subsequently, 6 μ l of 4 mM berberine was added and adjusted to 1000 μ l with 50 mM PBG, for a final berberine concentration of 24 μ M. A linear increment of fluorescence using up to 50 μ l of each crude bacteriocin was observed, i.e., the higher bacteriocin concentration, the higher fluorescence. Correlation coefficients (r) were 0.99 for Morricin 269, Kurstacin 287, Kenyacin 404 and Tolworthcin 524 and 0.97 for Entomocin 420, (Fig. 2a).

To determine whether the fluorescence assay correlates with standard diffusion methods, two experiments were performed using the same amount of crude bacteriocin preparation as in Fig. 2a. The first experiment was carried out as described above. For the well-diffusion assay, 25 ml of TSB with soft agar 0.7% (wt/vol) was mixed with 50 μ l ($\sim 1 \times 10^9$ cells/ml) of *B. cereus* 183 and plated. Wells, 7 mm in diameter, were dug and different volumes (10, 20, 30, 40, 50 μ l) of filter-sterilized supernatants, corresponding to those used in the fluorescence assay, was added to each well and incubated for 12 h at 4 °C to allow the diffusion of the samples, followed by an additional incubation at 28 °C for 1 day before diameters of zones of inhibition were measured. One unit of activity was defined as 1 mm² of the zone of inhibition of growth of the indicator bacterium (Barboza-Corona et al., 2007). As shown in Fig. 2b, there was a high degree of correlation (i.e. $r=0.98$, 0.99, 0.96 for respectively, Morricin 269, Kenyacin 404, and Entomocin 420, and 0.97 for Kurstacin 287 and Tolworthcin 524) between the fluorescence emitted by berberine and activity in mm² of inhibition of each bacteriocin assayed separately. When those results were analyzed altogether, we obtained a correlation of 0.93. With

our protocols, a maximum inhibition area of 350 mm² corresponding to a relative fluorescence of 340 still give a linear response.

In addition, we assayed Nisin (Sigma) from *Streptococcus lactis*, a common bacteriocin used in food preservation, and Pediocin from *Pediococcus acidilactici*, to verify the efficacy of our methodology. Bacteriocin samples were prepared as described previously (Datta and Benjamin, 1997; Calderon-Santoyo et al., 2001). For Nisin, we found a robust correlation ($r=0.92$) between berberine fluorescence and mm² of inhibition area using *Listeria innocua* or *B. cereus* as indicator strains. When Pediocin was assayed with *L. innocua* the correlation was of 0.99.

In conclusion, the fluorogenic assay developed and described here, provides a novel rapid and reliable screening method to assay crude preparations containing substances that destabilize bacterial membranes, particularly bacteriocins. Data can be obtained well within an hour, and therefore the method can substitute for tedious and time-consuming conventional protocols, particularly the well-diffusion method.

Acknowledgements

We thank Gabriela Morales-Pérez and Janeth Adriana Martínez-Cardeñas for their technical assistance. This research was supported by grant DINPO 2006 from the University of Guanajuato. Norma de la Fuente-Salcido is a graduate student supported by CONACYT-México, fellowship.

References

- Alvarado, C., Garcia-Almendarez, B.E., Martin, S.E., Regalado, C., 2005. Anti-*Listeria monocytogenes* bacteriocin-like inhibitory substances from *Enterococcus faecium* UQ31 isolated from artisan Mexican-style cheese. *Curr. Microbiol.* 51, 110–115.
- Barboza-Corona, J.E., Vázquez-Acosta, H., Bideshi, D.K., Salcedo-Hernández, R., 2007. Bacteriocin-like inhibitor substances produced by Mexican strains of *Bacillus thuringiensis*. *Arch. Microbiol.* 187, 117–126.
- Barefoot, S.F., Klaenhammer, T.P., 1983. Detection and activity of lactacin B, a bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 45, 1808–1815.
- Bhunja, A.K., Johnson, M.C., Ray, B., 1988. Purification, characterization and antimicrobial spectrum of a bacteriocin produced by *Pediococcus acidilactici*. *J. Appl. Bacteriol.* 65, 261–268.
- Calderon-Santoyo, M., Mendoza-Garcia, P.G., Garcia-Alvarado, M.A., Escudero-Abarca, B.I., 2001. Effect of physical factors on the production of bacteriocin from *Pediococcus acidilactici* ITV 26. *J. Ind. Microbiol. Biotech.* 26, 191–195.
- Datta, A.R., Benjamin, M.M., 1997. Factors controlling acid tolerance of *Listeria monocytogenes*: effects of nisin and other ionophores. *Appl. Environ. Microbiol.* 63, 4123–4126.
- Delgado, A., Brito, D., Feveireiro, P., Tenreiro, R., Peres, C., 2005. Bioactivity quantification of crude bacteriocin solutions. *J. Microbiol. Methods* 62, 121–124.
- Kumazaki, T., Ishii, S., 1982. A simple photometric method for determination of the activity of pyrocin R 1. *J. Biochem.* 91, 817–823.
- London, J., Hausman, S., 1982. Xylitol-mediated transient inhibition of ribitol utilization by *Lactobacillus casei*. *J. Bacteriol.* 150, 657–661.
- Mayr-Harting, A., Herges, A.J., Berkeley, C., 1972. Methods for studying bacteriocins. In: Norris, J.R., Ribbons, D.W. (Eds.), *Methods in Microbiology*. Academic Press, New York.
- Mélançon, D., Grenier, D., 2003. Production and properties of bacteriocin-like inhibitory substances from the swine pathogen *Streptococcus suis* serotype 2. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 4482–4488.

- Morgan, S., Ross, R.P., Hill, C., 1995. Bacteriolytic activity caused by the presence of a novel lactococcal plasmid encoding lactococcins A, B, and M. *Appl. Environ. Microbiol.* 61, 2995–3001.
- Oscáriz, J.C., Pisabarro, A.G., 2001. Classification and mode of action of membrane-active bacteriocins produced by gram-positive bacteria. *Int. Microbiol.* 4, 13–19.
- Reyes, R., Ramírez, G., Delgado, N.M., 2004. Fluorescent berberine binding as a marker of internal glycosaminoglycans sulfate in bovine oocytes and sperm cells. *Arch. Androl.* 50, 327–332.
- Schillinger, U., Lücke, F.K., 1989. Antibacterial activity of *Lactobacillus sake* isolated from meat. *Appl. Environ. Microbiol.* 55, 1901–1906.
- Tagg, J.R., McGiven, A.R., 1971. Assay system for bacteriocins. *Appl. Microbiol.* 21, 943.
- Talwalkar, S.S., Vaidya, A.B., Godse, C., Vaidya, A., Vaidya, R., 2005. Plasmodium DNA fluoresces with berberine: a novel approach for diagnosis of malaria parasites. *Am. J. Clin. Pathol.* 124, 408–412.
- Venema, K., Abbe, T., Haandrikman, A.J., Leenhouts, K.J., Kok, J., Venema, G., 1993. Mode of action of lactococcin B, a thiol-activated bacteriocin from *Lactococcus lactis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 59, 1041–1048.

CHAPTER II

**General, high yield, and rapid purification method
for small, hydrophobic, cationic bacteriocins.
Purification of lactococcin B from *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* 9B4
and pediocin PA-1 from *Pediococcus acidilactici* PAC1.0.**

**Koen Venema, Michael L. Chikindas, Jos F.M.L. Seegers,
Alfred J. Haandrikman, Kees J. Leenhouts,
Gerard Venema and Jan Kok.**

CHAPTER II

General, high yield, and rapid purification method for small, hydrophobic, cationic bacteriocins.

Purification of lactococcin B from *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* 9B4
and pediocin PA-1 from *Pediococcus acidilactici* PAC1.0.

SUMMARY

Lactococcin B and pediocin PA-1, two small, approximately 5 kDa hydrophobic positively charged bacteriocins, produced by *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* 9B4 and *Pediococcus acidilactici* PAC1.0, respectively, were purified by ethanol precipitation, preparative isoelectric focusing and ultrafiltration. The procedure leads to reproducible high final yields (41% for lactococcin B and 29% for pediocin PA-1) in comparison to the low yields (from smaller than 1% to maximally 5%) when column chromatography is used for purification. Specifically, during isoelectric focusing no loss of bacteriocin activity occurs. The method should be generally applicable to small hydrophobic cationic bacteriocins. The *N*-terminal amino acid sequence of lactococcin B was determined. The sequence of the first 21 amino acids was: Ser-Leu-Gln-Tyr-Val-Met-Ser-Ala-Gly-Pro-Tyr-Thr-Trp-Tyr-Lys-Asp-Thr-Arg-Thr-Gly-Lys, which is in agreement with a proteolytic maturation step behind the consensus glycine doublet of the leader peptide.

INTRODUCTION

The ability of lactic acid bacteria (LAB) to inhibit the growth of other bacteria has been known for many years (26). A wide variety of compounds, such as low-molecular weight antibiotics, metabolic (end-) products, enzymes, defective bacteriophages, lytic agents and bacteriocins, are responsible for this antagonistic activity. Of the criteria defined by Tagg *et al.* (31) for a bacteriocin: (i) narrow inhibitory spectrum of activity against (closely) related bacterial species; (ii) the presence of an essential, biologically active protein moiety; (iii) bactericidal mode of action; (iv) attachment to specific cell receptors; and (v) plasmid-borne genetic determinants, usually only the second and third are taken into account nowadays. There are several examples of bacteriocins with a broad inhibitory spectrum of activity including unrelated species (f.i. 24), bacteriocins that act in a receptor-independent way (9,11), and bacteriocins whose genetic determinants are located on the chromosome (17,22). Several bacteriocins of LAB have been characterized biochemically and genetically

and in a number of cases their mode of action has been studied (for recent reviews see 7,16,18,19).

The ability of LAB to inhibit other bacteria by producing bacteriocins is of special interest to the food and feed industry, since some of these bacteriocins could potentially be used as food preservatives (5,25,30).

In our laboratory the operons containing genes for production of and immunity against lactococcin A, lactococcin B and lactococcin M (34,35) were cloned from *L.lactis* subsp. *cremoris* 9B4 and sequenced. Only lactococcin A has been purified and an *N*-terminal sequence has been determined (15), revealing that the lactococcin A structural gene specifies a prebacteriocin which is processed behind a glycine doublet to produce the mature form.

Because bacteriocins are secreted into the growth medium, most approaches for purification start with a concentration step from the culture supernatant, such as salt precipitation (e.g. ammonium sulphate; 15,17), acid precipitation (12), or by extraction with organic solvents (33). Subsequently, several chromatographic steps (including size exclusion, adsorption, and/or hydrophobic interaction) are necessary to achieve significant purification of the bacteriocins (23).

In order to be able to study their mode of action, we developed a purification procedure that should, in

principle, be applicable to all small, hydrophobic, cationic bacteriocins and that omits column chromatography. The procedure can easily be scaled-up for large scale purification for industrial purposes. It allowed the purification of lactococcin B, a bacteriocin that proved refractive to purification using column chromatography. The purified lactococcin B and pediocin PA-1 obtained in this way have been used to study their mode of action (3,37).

MATERIALS AND METHODS

Bacterial strains, plasmids and growth conditions.

The bacterial strains and plasmids used in this study are listed in Table 1. *L.lactis* was cultured in M17 broth (30), Elliker lactic broth (8), or in chemically

defined medium (CDM) supplemented with 0.5 % glucose or lactose. CDM was composed of the following: buffer (21 g Na-β-glycerophosphate, 1 g KH₂PO₄, 0.6 g (NH₄)₃citrate, 1g Na-acetate), amino acid mix (290 mg Tyr, 250 mg Cys, 237 mg Ala, 390 mg Gln, 350 mg Asn, 125 mg Arg, 437 mg Lys, 212 mg Ile, 125 mg Met, 275 mg Phe, 337 mg Ser, 225 mg Thr, 50 mg Trp, 325 mg Val, 175 mg Gly, 150 mg His, 475 mg Leu and 675 mg Pro), vitamin mix (4 μg pyridoxal, 2 μg nicotinic acid, thiamine dichloride, riboflavin, Ca-pantothenate, folic acid, 20 μg Na-p-aminobenzoate, biotin, 10 μg orotic acid, 2-deoxythymine, inosine, pyridoxamine dichloride and 5 μg DL-6.8-thioctic acid), metal mix (40 mg MgCl₂.6H₂O, 7.4 mg CaCl₂, 1 mg FeCl₂.4H₂O, 1 mg ZnSO₄.7H₂O, 500 μg CoCl₂.6H₂O, 20 μg CuSO₄.5H₂O and 2.8 mg MnSO₄.H₂O) and base mix (2 mg adenine, uracil, xanthine and guanine) per liter, pH 6.4. Pediococci were grown in casein glucose broth (1) or in MRS broth (6) containing 0.5% glucose. 1.5% agar was added to the media for plating. *L. lactis* subsp. *lactis* IL1403(pMB580) (35) and IL1414

Table 1: Bacterial strains and plasmids.

Bacterial strain or plasmid	Relevant properties	source or reference
Bacteria		
<i>Lactococcus lactis</i>		
IL1403	plasmid free indicator strain for lactococcin B	4
IL1414	IL1403 derivative, containing lactose plasmid	4
<i>Pediococcus</i>		
<i>acidilactici</i> PAC 1.0	wild type pediocin PA-1 producer	24
<i>pentosaceus</i> PPE 1.2	indicator strain for pediocin PA-1	24
Plasmids		
pMB580	Em ^r , containing the lactococcin B operon	35
pIpS	Sp ^r , pIIPol-derivative, carrying T7 RNA polymerase gene	this work
pMGCT7'580	Cm ^r , pMG36CT-derivative, containing the lactococcin B operon under control of the bacteriophage T7 promoter	this work
pIIPol	Em ^r , containing T7 RNA polymerase gene	40
pMG36CT	Cm ^r , pMG36e-derivative, lactococcal gene expression vector	C.M. Franke

Em: erythromycin; Sp: spectinomycin; Cm: chloramphenicol; r: resistance.

(pMGCT7'580, pIpS) were used as lactococcin B producers, *L. lactis* IL1403 was the indicator strain for

lactococcin B. *P. acidilactici* PAC 1.0 and *P. pentosaceus* PPE1.2 were the pediocin PA-1 producer (24) and indicator, respectively. Erythromycin (Em) was used at a final concentration of 5 µg/ml for both *L.lactis* and *Pediococcus*. Spectinomycin and chloramphenicol were used at final concentrations of 200 µg/ml and 5 µg/ml for *L.lactis*, respectively.

Bacteriocin assay.

The agar spot test was used to determine bacteriocin activity (37). In short, 16µl of a solution containing bacteriocin was spotted on an agar plate in serial two-fold dilutions in demineralized water, containing 0.5% Tween 20, and, for lactococcin B, 1 mM DTT. After the liquid had been completely adsorbed by the agar, a topagar layer seeded with 0.1% of an overnight culture of the indicator was poured over the plates. The plates were incubated for 12-14 hrs at 30 °C and examined for zones of growth inhibition. The highest dilution which gave a distinct zone of inhibition after 16 h was defined as 1 arbitrary unit (AU). Overlay tests on colonies were done as follows: Colonies were treated with chloroform vapour for 15 min. After exposure of the plates to air for another 30 min., softagar seeded with 0.1% of an overnight culture of the indicator was poured on the plates. After 12-14 hrs. of incubation at 30 °C the plates were examined for zones of growth inhibition.

Determination of optimal conditions for production of lactococcin B.

An overnight culture of *L.lactis* IL1403(pMB580) was used to inoculate (to approx. 10⁶ CFU/ml) several samples of GM17 broth containing increasingly more β-glycerolphosphate (from 0-2%, in steps of 0.5%), Elliker lactic broth, CDM, a GM17 dialysate, or double M17 with 0.5% glucose (G2M17). The inoculated media were incubated at 30 °C and samples were removed to determine bacteriocin activity and cell density (measured as optical density at 660nm.).

Lactococcin B production.

1 liter G2M17 was inoculated at 1% with an overnight culture of *L.lactis* IL1403(pMB580) and grown at 30 °C until early stationary phase (approx. 5.5 hrs.). Then, cells were removed by centrifugation and the supernatant was sterilized by heating at 100 °C for 30 min. Activity did not decrease during this step. Purification was done according to the procedure below.

Pediocin PA-1 production.

For purification of pediocin PA-1, 1 liter of dialysed casein glucose broth (2) was inoculated with 50 ml overnight culture of *P. acidilactici* PAC1.0 and grown overnight at 37 °C. Cells were removed by centrifugation and the supernatant was filter sterilized (0.45 µm Schleicher and Schuell, Inc., Keene, N.H.). The activity before and after filter sterilization did not differ.

General purification method.

The bacteriocins were precipitated by mixing the supernatant with an equal volume of cold (-20 °C) 96% ethanol. After 3 hrs at -20 °C the precipitate was collected by centrifugation (10,000 rpm, 30 min.) and resuspended in 50 ml demineralized water. Ampholytes (Bio-Rad, Richmond, Calif., pH range 3-10) were added to 1%, Tween-20 (Tween-80 for pediocin PA-1) to 0.1% and glycine to 5% and the final volume was made up to 55 ml. Subsequently, the proteins were loaded in the Rotofor isoelectric focusing cell (BioRad) for preparative isoelectric focusing at a constant power of 12W for approx. 5.5 hrs (until a plateau of constant voltage was obtained). The fractions were collected and the pH of each fraction was adjusted to approximately 7. The activity in each fraction was tested by the agar spot test. Fractions containing bacteriocin were mixed and ultrafiltrated through a membrane with a 3-kDa molecular weight cut off in a Spin-x UF concentrator (Corning Costar Corporation, Cambridge, MA) to remove ampholytes. Purity of the samples was tested by tricine-SDS-PAGE (29) and subsequent silver staining of the gel (BioRad). Protein concentrations were determined spectrophotometrically at 280nm.

Overexpression of lactococcin B using bacteriophage T7 RNA polymerase expression system.

Overexpression of lactococcin B was established by using the T7 overexpression system for *L.lactis* essentially as developed by Wells *et al.* (40). The system was adapted as follows:

In plasmid pILpol, containing the T7 RNA polymerase gene under control of the lactose-inducible lactococcal *lac* promoter, the the MLS marker was

replaced by a *ClaI-NdeI* fragment from pDL55 containing the spectinomycin resistance marker AAD(9) (20), resulting in plasmid pIpS. Instead of pMG280 (40) as the carrier of the *lac* operon, strain IL1414 (4; a derivative of IL1403 containing a lactose plasmid) was used. The T7 expression vector,

containing *lcnB* and *lciB* under control of the T7 promoter, was constructed by cloning the *HindIII-XbaI* fragment from pT7'580 (35) in pMG36CT cut with the same restriction endonucleases, resulting in pMGCT7'580. IL1414 was transformed with pIpS and pMGCT7'580. The resulting transformant was grown

A

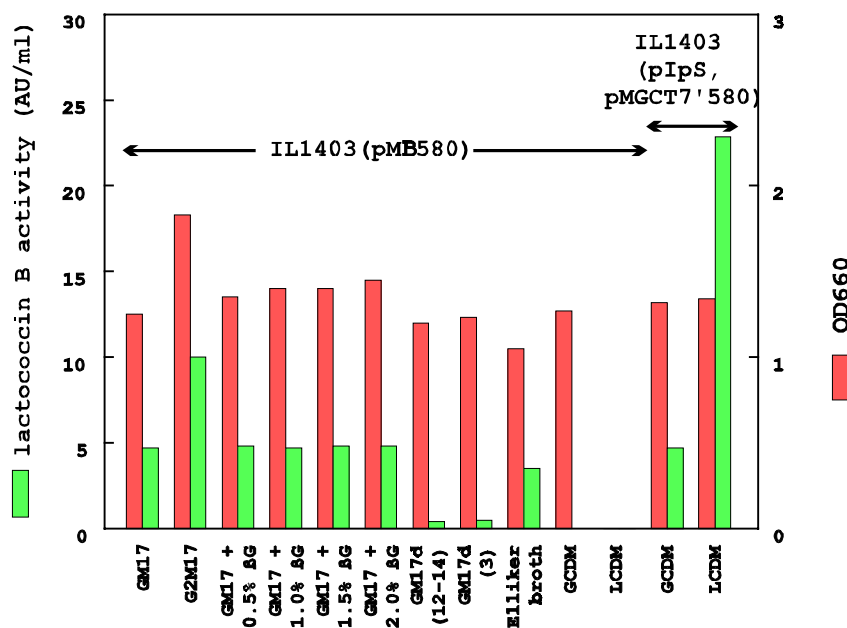
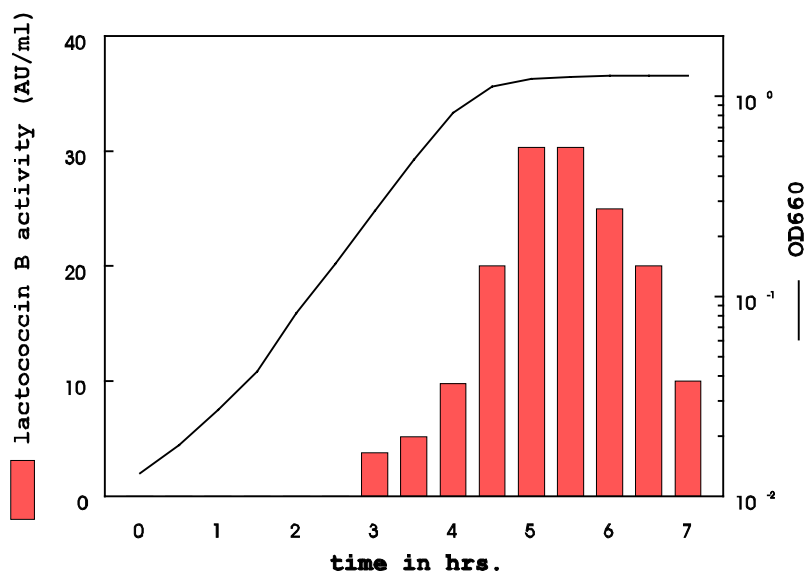


Figure 1: A: Lactococcin B production in various media. A 1% inoculum of *L.lactis* IL1403 (pMB580) was grown at 30 °C until early stationary phase in the media indicated. At that time samples were removed and the amount of bacteriocin was determined as well as the OD660. B: Lactococcin B production during growth of a 1% inoculum of *L.lactis* IL1403 (pMB580) in G2M17 at 30 °C. With 30 min. intervals the optical density at 660 nm. was determined as well as the amount of bacteriocin by the agar spot test.

B



on medium containing lactose, spectinomycin and chloramphenicol. Transformation of *L.lactis* was done as described earlier (21). General DNA cloning and manipulation techniques were carried out essentially as described by Sambrook *et al.* (28).

Purification of overexpressed lactococcin B.

Culture supernatants of IL1414(pIpS, pMGCT7'580) grown to early stationary phase on CDM containing 0.5% lactose (LCDM) were freeze dried (Lyph-lock[®]4.5, Labconco, Kansas City, MI). After redissolving the freeze dried material in one-fiftieth of the original volume, the sample was ultrafiltrated as described above.

N-terminal amino acid sequencing.

N-terminal amino acid sequencing was carried out by means of Edman degradation on an automated sequenator (Model 477A, Applied Biosystems, Foster City, Cal.) using protocols, chemicals and materials from Applied Biosystems. The phenylthiohydantoin-derived amino acids were identified using on-line coupled HPLC (Model 120A ABI, Applied Biosystems).

RESULTS

Optimal conditions for production of lactococcin B.

Growth of *L.lactis* IL1403(pMB580) and production of lactococcin B were studied in various media. Figure 1A shows that production was highest in G2M17. The bacteriocin was produced during logarithmic growth and highest activity was found in the early stationary phase (Fig. 1B). After that activity declined, probably by readsorption of lactococcin B to the producer cells, or by inactivation of the bacteriocin by the proteolytic/peptidolytic system of the producer. Contrary to what was reported by Geis *et al.* (10), production in Elliker lactic broth was lower than on GM17, even with the original strain *L.lactis* subsp. *cremoris* 9B4. No production was observed on CDM containing glucose (Fig. 1A). Because proteins and peptides present in a rich medium like GM17 complicate purification of bacteriocins, production was also tested in a GM17 dialysate. A 10 times concentrated M17 solution was dialysed in a dialysis bag with a molecular weight cut off of 12 to 14 kDa [resulting in GM17d(12-14)] or of 3 kDa [resulting in GM17d(3)]. To the dialysate

Table 2: Purification of lactococcin B and pediocin PA-1.

sample/fraction	volume (ml)	OD ₂₈₀	total activity (AU) ^a	specific activity (AU/ml*OD ₂₈₀)	purification (fold)	yield (%)
Pediocin PA-1						
culture supernatant	1000	3.3	1.6 * 10 ⁶	4.8 * 10 ²	1	100
ethanol precipitate	40	0.7	5.1 * 10 ⁵	1.8 * 10 ⁴	37	32
rotofor samples	11.4	0.7	4.7 * 10 ⁵	6.3 * 10 ⁴	131	29
retentate	11.4	0.5	4.6 * 10 ⁵	8.1 * 10 ⁴	169	29
Lactococcin B						
culture supernatant	1000	35	1.0 * 10 ⁴	0.3 * 10 ⁰	1	100
ethanol precipitate	50	50	3.0 * 10 ⁴	1.2 * 10 ¹	40	300
rotofor samples	20	3.1	2.9 * 10 ⁴	4.8 * 10 ²	1600	299
retentate	2.5	2.7	4.2 * 10 ³	6.1 * 10 ²	2033	41
Lactococcin B/CDM						
culture supernatant	1000	6.0	5.0 * 10 ⁴	8.3 * 10 ¹	1	100
lyophilisate	50	5.5	7.3 * 10 ⁴	6.6 * 10 ²	8	146
retentate	2.5	2.5	6.9 * 10 ⁴	5.6 * 10 ⁴	675	138

^a total activity in arbitrary units (AU) was determined in an agar spot test using *P.pentosaceus* PPE1.2 (for pediocin PA-1) or *L.lactis* IL1403 (for lactococcin B) as the indicator strain.

glucose was added to 0.5% and the lactococcin B producer was inoculated at 1%. Although both medium dialysates supported good growth of the producing strain, only 10% of the bacteriocin activity on GM17 was obtained (Fig. 1A). For purification of lactococcin B, therefore, G2M17 was taken.

Purification of pediocin PA-1.

After overnight growth of *P. acidilactici* PAC 1.0 the supernatant contained 1.6×10^6 AU of activity (Table IIa). About 32% could be precipitated with cold ethanol (Table IIa). The precipitate was dissolved in demineralized water and, after addition of carrier ampholytes, Tween 80, and glycine, subjected to preparative isoelectric focusing. After 5.5 hrs of running at a constant power of 12W, separation was complete (as indicated by the voltage reaching a plateau). Spot testing indicated that activity was present in fractions 17-20 with highest activity in fraction 20 (Fig. 2A). The pI of pediocin PA-1 was estimated to be approximately 9. The active fractions were pooled and ultrafiltrated. During isoelectric focusing almost no activity was lost and after ultrafiltration all activity remained. After these three steps the bacteriocin was pure as judged by tricine-SDS-PAGE and silver staining (Fig. 3, lane 1).

Purification of lactococcin B.

The supernatant after 5.5 hrs of growth of a 1% inoculum of *L.lactis* IL1403(pMB580) in G2M17 contained 1.0×10^4 AU/l of activity on *L.lactis* IL1403 as the indicator (see Table IIb). However, after ethanol precipitation 3.0×10^4 AU/l were present in the precipitate. This increase in activity is indicative of multimer formation, which has been reported for other bacteriocins (23).

After 5.5 hrs of isoelectric focusing, the activity was present in fractions 14-20, being highest in fraction 18 (Fig. 2B). The pI of the bacteriocin was estimated to be about 8.5. Fractions 14-20 were pooled and ultrafiltrated. The bacteriocin solution was devoid of ampholytes as shown by tricine-SDS-PAGE and subsequent silver staining (Fig 3, lane 2). During isoelectric focusing hardly any loss of activity was observed but, in contrast to pediocin PA-1, losses were considerable after ultrafiltration (Table IIb). The amount of lactococcin B purified was insufficient to determine an *N*-terminal amino acid sequence. Since the initial amount of activity was already low in supernatants of IL1403(pMB580), lactococcin B was overexpressed

using the bacteriophage T7 RNA polymerase expression system.

Overexpression and purification of lactococcin B on chemically defined medium.

Apart from the strong T7 promoter, plasmid pMGCT7'580 also contains the normal lactococcin B promoter. Therefore, lactococcin B production on GM17 and LM17 could be compared. On GM17 plates lactococcin B production by IL1414(pIpS, pMGCT7'580) was similar to that of IL1403(pMB580) as judged by the size of the zone of growth inhibition (halo) around a producing colony. However, on LM17 production of lactococcin B by IL1414(pIpS, pMGCT7'580) was similar to the amount produced on GM17 by the same strain: no overexpression was obtained. As documented above, production under control of the lactococcin B promoter was only observed in rich media. Also, no production was observed in GCDM by IL1414(pIpS, pMGCT7'580). However, the strain grown in CDM containing lactose produced amounts of lactococcin B similar to that in LM17. Since CDM does not contain any constituents with a molecular mass higher than approximately 1.2 kDa, and lactococcin B has a mass of approximately 5 kDa, the peptide was purified from the supernatant of IL1414(pIpS, pMGCT7'580) grown in LCDM by the method described here. The supernatant was freeze dried, and ultrafiltrated after redissolving in water. The purified sample of lactococcin B (yield 95%, Table IIc) was subjected to tricine-SDS-PAGE and silver staining and shown to be pure (Fig. 3, lane 3).

Purified lactococcin B was subjected to *N*-terminal amino acid sequencing. The first 21 *N*-terminal amino acids were: Ser-Leu-Gln-Tyr-Val-Met-Ser-Ala-Gly-Pro-Tyr-Thr-Trp-Tyr-Lys-Asp-Thr-Arg-Thr-Gly-Lys. Comparing this sequence with the sequence deduced from the *lcnB* gene revealed that pre-lactococcin B, like many other bacteriocins (13), is processed behind a glycine doublet.

DISCUSSION

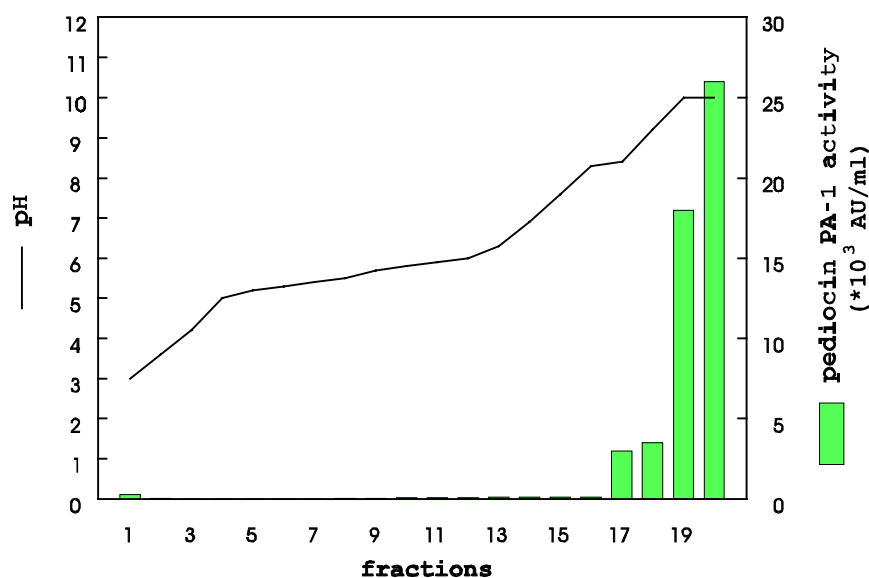
Lactococcin B production is medium dependent. Highest production is obtained in rich media like M17. Bacteriocin production is even higher when a medium containing the double amount of M17 is used. Production is low in an M17 dialysate, indicating that a factor(s) larger than 14 kDa is required for optimal

bacteriocin production. Contrary to the results obtained by Geis *et al.* (10) production on Elliker broth was lower than on M17. An explanation might be that the constituents of the media used in these two studies came from different suppliers. Medium-dependent bacteriocin production has been observed before (f.i.

27).

L.lactis subsp. *cremoris* 9B4 produces at least three different bacteriocins: lactococcin A, B and M (34,35). All belong to the class II non-lanthionine-containing group of bacteriocins. Of these lactococcins, the mode of action of lactococcin A has been studied earlier

A



B

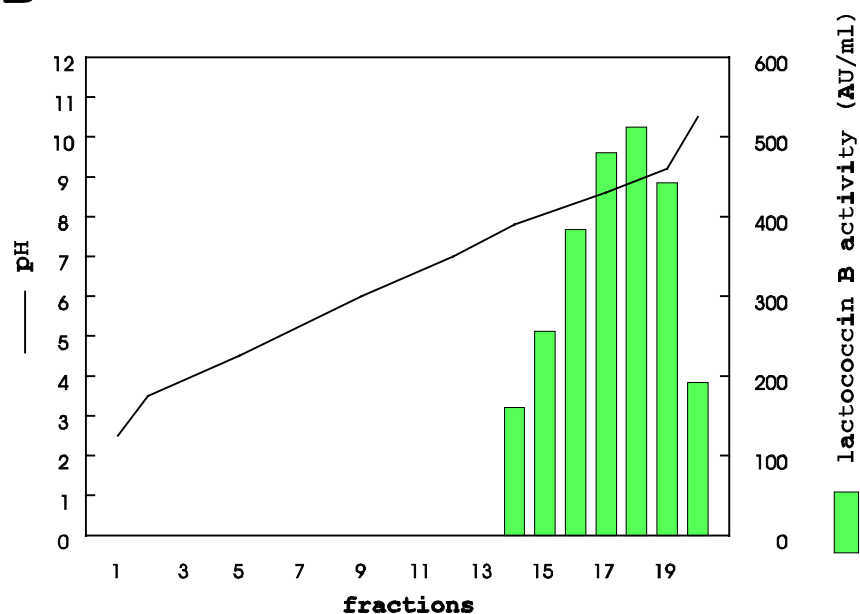


Figure 2: Activity distribution of pediocin PA-1 (A) and lactococcin B (B) after preparative isoelectric focusing. The amount (AU/ml) of bacteriocin in every fraction was determined in a spot test.

(36). Purified lactococcin B obtained with the purification protocol reported here has been used in mode of action studies as well (37). Both lactococcins permeabilize the cytoplasmic membrane of sensitive cells, most probably by the formation of pores. The mode of action of the third bacteriocin, lactococcin M, has not yet been determined. Two peptides are required for activity of this bacteriocin (34,39). Also, pediocin PA-1 purified with this method has been examined for its mode of action (3).

Since the use of columns to purify lactococcin B resulted in complete loss of activity, we decided to develop an alternative protocol for purification of this bacteriocin. Pediocin PA-1 has been purified previously (14), employing column chromatography. The yield in the procedure used by Henderson *et al.* was only 0.6%. With our method we repeatedly obtained very pure bacteriocin preparations with yields between 30 and 40 percent for lactococcin B and pediocin PA-1 (excluding the yield obtained using the lactococcin B overexpression system and CDM, which was 138%). Usually yields are between 0.5 and 1 percent with other purification protocols. The great advantage of the present procedure is the omission of columns. Usually, the hydrophobic bacteriocins stick to the matrix of columns causing great losses (23). Instead, we used preparative isoelectric focusing for

Figure 3: Silver staining of a 16% Tricine-SDS-PAA gel containing purified samples of pediocin PA-1 (lane 1), and lactococcin B (lanes 2 and 3, purified from G2M17 and CDM, respectively). lane 4: molecular weight marker (BioRad) the sizes of which are indicated in the right margin.

purification with minimal losses (less than 1% for lactococcin B, 3% for pediocin PA-1, compared to 40% to 80% loss on cation and/or anion exchange columns). The increase in activity after ethanol precipitation of lactococcin B from culture supernatants is probably due to dissociation of aggregates. Almost all bacteriocins have a tendency to aggregate (23).

We believe that the procedure described here could also be used for other (small) hydrophobic, positively charged bacteriocins. A trial with lactococcin A (previously purified by Holo *et al.* (15) with a yield of 16%) showed that it could be purified with a yield over 30% (not shown). Also, mutant lactococcin B molecules have been purified using this method (38).

Bacteriocins are of potential interest to the food industry because of their ability to inhibit food-related pathogens and spoilage organism. Some applications (e.g. mode of action studies) would require highly purified bacteriocin preparations, whereas in other applications (e.g., use as a biopreservative) it may be preferable to use a less purified sample. In both cases a high final yield is desirable. Cost and reproducibility will also influence the industries choice for a specific purification protocol. The method described here reproducibly provides high yields of purified bacteriocin and could be easily scaled-up for industrial purposes.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Henk Mulder for preparing the figures. This work was supported by the EC BRIDGE T-project on LAB. Jan Kok is the recipient of a fellowship of the Royal Netherlands Academy of Arts and Sciences (KNAW).

LITERATURE CITED

1. **Bhunja, A.K., Johnson, M.C. and Ray, B.** (1987) Direct detection of an antimicrobial peptide of *Pediococcus acidilactici* in sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis *J. Industr. Microbiol.* **2**:319-322.
2. **Bhunja, A.K., Johnson, M.C., and Ray, B.** (1988) Purification, characterization and antimicrobial spectrum of a bacteriocin produced by *Pediococcus acidilactici*. *J. Appl. Bacteriol.* **65**:261-268.
3. **Chikindas, M.L., García-Garcerá, M.J., Driessen, A.J.M., Ledebøer, A.M., Nissen-Meyer, J., Nes, I.F., Abee, T., Konings, W.N., and Venema G.** (1993) Pediocin PA-1, a bacteriocin from *Pediococcus acidilactici* PAC1.0, forms hydrophilic pores in the cytoplasmic membrane of target cells. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**:3577-3584.
4. **Chopin, A., Chopin, M.-C., Moillo-Batt, A., and Langella, P.** (1984) Two plasmid-determined restriction and modification systems in *Streptococcus lactis*. *Plasmid.* **11**:260-263.
5. **Daeschel, M.A.** (1992) Applications and interactions of bacteriocins from lactic acid bacteria in foods. In: Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria (Hoover, D. and Steenson, L., Eds.), Academic Press, New York, NY, pp. 63-91.
6. **De Man, J.C., Rogosa, M., and Sharpe, M.E.** (1960) A medium for the cultivation of lactobacilli. *J. Appl. Bacteriol.* **23**:130-135.
7. **De Vuyst, L.** (1993) Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria: Microbiology, Genetics, and Applications. Elsevier Applied Science, Barking.
8. **Elliker, P.R., Anderson, A. and Hammesson, G.** (1956) An agar culture medium for lactic acid streptococci and lactobacilli *J. Dairy Sci.* **39**:1611-1612.
9. **Gao, F.H., Abee, T. and Konings, W.N.** (1991) The mechanism of action of the peptide antibiotic nisin in liposomes and cytochrome C oxidase proteoliposomes. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**:2164-2170.
10. **Geis, A., Singh, J. and Teuber, M.** (1983) Potential of lactic streptococci to produce bacteriocin. *Appl. Environ. Microbiol.* **45**:205-211.
11. **Hansen, J.N.** (1993) The molecular biology of nisin and its structural analogues. In: Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria (Hoover, D. and Steenson, L., Eds.), Academic Press, New York, NY, pp. 93-120.
12. **Hastings, J.W., Sailer, M., Johnson, K., Roy, K.L., Vederas, J.C. and Stiles, M.E.** (1991) Characterization of leucocin A-UAL 187 and cloning of the bacteriocin gene from *Leuconostoc gelidum*. *J. Bacteriol.* **173**:7491-7500.
13. **Havarstein, L.S., Holo, H., and Nes, I.F.** (1994) The leader peptide of colicin V shares consensus sequences with leader peptides that are common among peptide bacteriocins produced by Gram-positive bacteria. *Microbiology* **140**:2383-2389.
14. **Henderson, J.T., Chopko, A.L., and Van Wassenaer, P.D.** (1992) Purification and primary structure of pediocin PA-1 produced by *Pediococcus acidilactici* PAC1.0. *Arch. Biochem. Biophys.* **295**:5-12.
15. **Holo, H., Nilssen, O. and Nes, I.F.** (1991) Lactococcin A, a new bacteriocin from *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*: isolation and characterization of the protein and its gene. *J. Bacteriol.* **173**:3879-3887.
16. **Hoover, D. and Steenson, L.** (1993) Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria. Academic Press, New York, NY.
17. **Joerger, M.C. and Klaenhammer, T.R.** (1986) Characterization and purification of helveticin J and evidence for a chromosomally determined bacteriocin produced by *Lactobacillus helveticus* 481. *J. Bacteriol.* **167**:439-446.
18. **Klaenhammer, T.R.** (1993) Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* **12**:39-86.
19. **Kok, J., Holo, H., Van Belkum, M.J., Haandrikman, A.J. and Nes, I.F.** (1993) Nonnisin bacteriocins in lactococci: biochemistry, genetics and mode of action. In: Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria (Hoover, D. and Steenson, L., Eds.), Academic Press, New York, NY, pp. 121-150.
20. **LeBlanc, D.J., Lee, L.N. and Inamine, J.M.** (1991) Cloning and nucleotide base sequence analysis of a spectinomycin adenylyltransferase AAD(9) determinant from *Enterococcus faecalis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **35**:1804-1810.
21. **Leenhouts, K.J., Kok, J., and Venema, G.** (1989) Campbell-like integration of heterologous plasmid DNA into the chromosome of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*. *Appl. Environ. Microbiol.* **55**:394-400.
22. **Lyon, W.L. and Glatz, B.A.** (1993) Isolation and

- purification of propionicin PLG-1, a bacteriocin produced by a strain of *Propionibacterium thoenii*. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**:83-88.
23. **Muriana, P.M. and Luchanski, J.B.** (1993) Biochemical methods for purification of bacteriocins. In: *Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria* (Hoover, D. and Steenson, L., Eds.), Academic Press, New York, NY, pp. 41-61.
24. **Pucci, M.J., Vedamuthu, E.R., Kunka, B.S., and Vandenberg, P.A.** (1988) Inhibition of *Listeria monocytogenes* by using pediocin PA-1 produced by *Pediococcus acidilactici* PAC1.0. *Appl. Environ. Microbiol.* **54**:2349-2353.
25. **Ray, B. and Daeschel, M.** (1992) *Food Biopreservatives of Microbial Origin*. CRC Press, Boca Raton, FL.
26. **Rogers, L.A.** (1928) The inhibiting effect of *Streptococcus lactis* on *Lactobacillus bulgaricus*. *J. Bacteriol.* **16**:321-325.
27. **Rogers, A.H.** (1972) Effect of the medium on bacteriocin production among strains of *Streptococcus mutans*. *Appl. Microbiol.* **24**:294-295.
28. **Sambrook, J., Fritsch, E.F., and Maniatis, T.** (1989) *Molecular cloning: a laboratory manual*, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.
29. **Schägger, H., and Von Jagow, G.** (1987) Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal. Biochem.* **166**:368-379.
30. **Stiles, M.E. and Hastings, J.W.** (1991) Bacteriocin production by lactic acid bacteria: potential for use in meat preservation. *Trends Food Sci. Technol.* October: 247-251.
31. **Tagg, J.R., Dajani, A.S. and Wannamaker, L.W.** (1976) Bacteriocins of Gram-positive bacteria. *Microbiol. Rev.* **40**:722-756.
32. **Terzaghi, B.E., and Sandine, W.E.** (1975) Improved medium for lactic streptococci and their bacteriophages. *Appl. Microbiol.* **29**:807-813.
33. **Upreti, G.C. and Hinsdill, R.D.** (1973) Isolation and characterization of a bacteriocin from a homofermentative *Lactobacillus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **4**:487-494.
34. **Van Belkum, M.J., Hayema, B.J., Jeeninga, R.E., Kok, J. and Venema, G.** (1991) Organization and nucleotide sequence of two lactococcal bacteriocin operons. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**:492-498.
35. **Van Belkum, M.J., 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.
36. **Van Belkum, M.J. Kok, J., Venema, G., Holo, H., Nes, I.F., Konings, W.N. and Abee, T.** (1991) The bacteriocin lactococcin A specifically increases the permeability of lactococcal cytoplasmic membranes in a voltage-independent, protein-mediated manner. *J. Bacteriol.* **173**:7934-7941.
37. **Venema, K., Abee, T., Haandrikman, A.J., Leenhouts, K.J., Kok, J., Konings, W.N. and Venema, G.** (1993) Mode of action of lactococcin B, a thiol-activated bacteriocin from *Lactococcus lactis*. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**:1041-1048.
38. **Venema, K., Dost, M.H.R., Venema, G. and Kok, J.** (1995) Mutational analysis and chemical modification of lactococcin B, a bacteriocin produced by *Lactococcus lactis*. in preparation.
39. **Venema, K.** unpublished results.
40. **Wells, J.M., Wilson, P.W., Norton, P.M., Gasson, M.J. and Le Page, R.W.F.** (1993) *Lactococcus lactis*: high-level expression of tetanus toxin fragment C and protection against lethal challenge. *Mol. Microbiol.* **8**:1155-1162.