



NUEVO MÉTODO RÁPIDO PARA DETERMINAR LA ACTIVIDAD DE BACTERIOCINAS.

Norma de la Fuente-Salcido, Gabriela Morales-Pérez, Janeth Adriana Martínez-Cardenas, Rubén Salcedo-Hernández, Ma. Guadalupe Alanis-Guzmán y J. Eleazar Barboza-Corona*. Universidad de Guanajuato, Instituto de Ciencias Agrícolas. Ex Hacienda El Copal, carretera Irapuato-Silao Km 9, Irapuato Guanajuato, México. Fax: 01 462 624 2484, e-mail: josebar@dulcinea.ugto.mx

Palabras clave: Bacteriocinas, Fluorescencia, Berberina.

Introducción. Las bacteriocinas son péptidos antimicrobianos sintetizados y excretados por bacterias, y por su efecto inhibitorio sobre microorganismos patógenos se considera su potencial aplicación como conservadores naturales en alimentos (1). La eficiencia y rapidez en la determinación de la actividad de bacteriocinas se ven comprometidas cuando se sustentan en los métodos tradicionales enzimáticos (2) y no enzimáticos como la prueba de difusión de pozos (3, 4). En este trabajo desarrollamos una nueva y rápida metodología para determinar eficazmente la actividad de bacteriocinas basándonos en la fluorescencia intracelular de la berberina.

Metodología. Para comprobar que la berberina fluoresce en células dañadas a nivel de membrana, *Bacillus cereus* 183 (cepa indicadora) fue permeabilizado con tolueno:acetona, mezclada con sulfato de berberina y la fluorescencia determinada por triplicado. Células no tratadas con tolueno: acetona fueron mezcladas con diferentes volúmenes de extracto crudo de morricina 269 sintetizada por *Bacillus thuringiensis* subsp. *morrisoni* (LBIT 269) mas berberina. Se midió el efecto inhibitorio de la bacteriocina como una medida de la fluorescencia emitida por ese compuesto cuando ingresa a células dañadas por la bacteriocina. La actividad determinada por el método anterior fue comparada con el tradicional por difusión en pozos usando la misma bacteriocina y la correlación entre ellos fue determinada.

Resultados y Discusión. Se comprobó la eficacia de la berberina al fluorescer intracelularmente en células de *B. cereus* permeabilizadas con compuestos químicos, lo cual nos indicó que dicho compuesto era útil para determinar el daño a nivel de membrana en las células bacterianas. Por otro lado, la actividad de la morricina 269 sobre *B. cereus*, evaluada por la fluorescencia emitida por la berberina, mostró un efecto similar y proporcionó un incremento lineal en la determinación de fluorescencia (coeficiente de correlación, $r=0.998$). Cuando se comparó el método anterior con la actividad evaluada por

los mm^2 de inhibición (prueba de difusión), se observó un comportamiento lineal (Fig.1) con un alto grado de correlación ($r=0.983$). Lo anterior mostró la eficacia y rapidez de nuestro método para evaluar la actividad de bacteriocina.

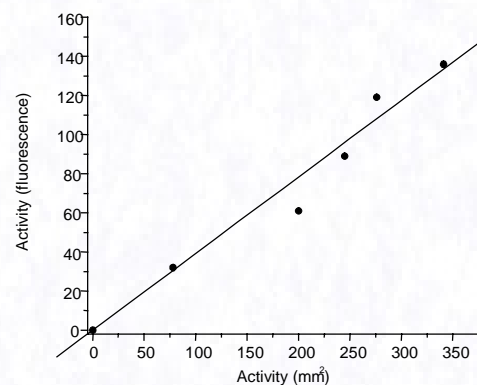


Fig. 1. Correlación entre la actividad en mm^2 de área de inhibición y fluorescencia.

Conclusiones. El método fluorogénico propuesto en este trabajo, es eficaz para la rápida cuantificación de bacteriocinas que dañan membrana celular. Esta nueva metodología puede sustituir a la prueba de difusión de pozos, método tradicionalmente usado para evaluar la actividad de bacteriocinas.

Agradecimiento: A la Dirección de Investigación de la Universidad de Guanajuato por el apoyo del proyecto DINPO 67/06.

Bibliografía.

1. Barboza-Corona, J.E., Vázquez-Acosta, H., Bideshi, D., Salcedo-Hernández, R. (2007). Bacteriocin-like inhibitor substances produced by mexican strains of *Bacillus thuringiensis*. Arch. Microb. 187: 117-126.
2. 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.
3. Tagg, J.R., McGiven, A.R. (1971). Assay system for bacteriocins. Appl. Microbiol. 21: 943.
4. Bhunia, A.K., Johnson, M.C., Ray, B. (1988). Purification, characterization and antimicrobial spectrum of a bacteriocin produced by *Pediococcus acidolactici*. J. App. Bacteriol. 65: 261-268.