



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO**

---

---

**INSTITUTO DE CIENCIAS AGROPECUARIAS**

**“Caracterización de metabolitos antimicrobianos  
producidos por *Xenorhabdus* spp. y/o *Photorhabdus*  
spp., con potencial de aplicación en la conservación  
de alimentos.”**

**TESIS**

**Para obtener el grado de:**

**Maestro en Ciencia de los Alimentos**

**PRESENTA:**

**Ing. Alim. Giovanni Gómez Aguilar**

**Director:**

**Dr. Norberto Chavarría Hernández**



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO  
Instituto de Ciencias Agropecuarias  
School of Forestry and Environmental Studies

**COORDINACION DE INVESTIGACION Y POSGRADO DEL ICAP**

Actas de la reunión del Comité de Tesis de Maestría en Ciencia de los Alimentos  
**Apertura:**

La reunión ordinaria para evaluar los avances de la tesis intitulada: **“Caracterización de metabolitos antimicrobianos producidos por Xenorhabdus spp. y/o Photorhabdus spp., con potencial de aplicación en la conservación de alimentos”**, que desarrolla el estudiante Giovanni Gómez Aguilar. No. Cuenta 262122.

**Asistentes:**

- Dr. Norberto Chavarría Hernández**
- Dra. Adriana Inés Rodríguez Hernández**
- Dra. Ma. del Rocío López Cuellar**
- Dr. Carlos Inocencio Cortés Martínez**

**Observaciones:** **A. Revisión de Trabajo de Tesis**

El comité revisó con antelación el trabajo de tesis en extenso propuesto por el estudiante, comunicando a el estudiante, Giovanni Gómez Aguilar, oportunamente las correcciones, adiciones y/o modificaciones que debería considerar para mejorar su trabajo y poder continuar con el proceso de obtención de grado. El estudiante atendió de forma conveniente las sugerencias del comité.

**B. Acuerdos**

En esta fecha, se comunica atentamente que el comité conformado por los profesores firmantes, otorgamos nuestra autorización para que el estudiante imprima su trabajo final de tesis, y continúe con los trámites necesarios para la obtención del grado de maestría respectivo.

ATENTAMENTE

“AMOR, ORDEN Y PROGRESO”

Tulancingo de Bravo, Hidalgo a 7 de octubre de 2022

Dr. Norberto Chavarría Hernández

Dra. Adriana Inés Rodríguez Hernández

Dra. Ma. del Rocío López Cuellar

Dr. Carlos Inocencio Cortés Martínez



# ÍNDICE

Resumen general .....	5
General Summary.....	6
CAPÍTULO 1 <i>Xenorhabdus nematophila</i> , metabolitos secundarios Una alternativa frente a microorganismos patógenos en la industria alimentaria.....	7
1.1 Introducción .....	8
1.2 Justificación .....	9
1.3 Objetivo general.....	9
1.3.1 Objetivos específicos.....	9
1.4 Enfoque metodológico .....	10
1.5 Bacteriocinas .....	0
1.5.1 Clasificación de las bacteriocinas .....	1
1.5.2 Aplicación de bacteriocinas en los alimentos.....	2
1.6 <i>Xenorhabdus</i> .....	2
1.7 Variación fenotípica .....	3
1.8 Complejos proteicos producidos por <i>Xenorhabdus</i> .....	4
1.8.1 Xenortido-Péptidos .....	5
1.8.2 Antibióticos.....	5
1.8.3 Fabclavinas .....	5
1.8.4 Depsipéptidos (xenematidos) .....	6
1.8.5 Péptidos antimicrobianos- <i>Xenorhabdus</i> .....	6
1.9 Otros metabolitos producidos por <i>Xenorhabdus</i> .....	6
1.10 Conclusiones .....	7
1.11 Anexos.....	8
1.12 Referencias.....	8
CAPÍTULO 2 Caracterización y purificación de péptidos antimicrobianos producidos por el fenotipo 1 de <i>Xenorhabdus nematophila</i> .....	16
2.1 Introducción .....	17
2.2 Materiales y métodos.....	19
2.2.1 Medios de cultivo .....	19
2.2.2 Microorganismos.....	19
2.2.3 Producción de nemátodos entomopatógenos .....	20
2.2.4 Cuantificación de nemátodos y concentración .....	22

2.2.5 Esterilización superficial de los IJ.....	22
2.2.6 Prueba de esterilidad superficial de IJ.....	23
2.2.7 Extracción de la bacteria simbiote.....	23
2.2.8 Identificación genética.....	25
2.2.9 Producción y purificación de metabolitos secundarios .....	25
2.2.10 Purificación de metabolitos secundarios (técnica adsorción desorción) .....	26
2.2.11 Cuantificación proteica Nanodrop .....	28
2.2.12 Prueba de inhibición por gota.....	28
2.2.13 Evaluación de la concentración mínima inhibitoria (MIC) .....	30
2.2.13.1 Medio de cultivo.....	30
2.2.13.2 Inóculo del indicador.....	31
2.2.14 Caracterización de BLIS .....	32
2.2.14.1 Efecto de la temperatura .....	32
2.2.14.2 Efecto del pH.....	33
2.3 Resultados y discusión .....	35
2.3.1 Producción de IJ .....	35
2.3.2 Esterilización superficial de los IJ.....	37
2.3.3 Identificación genética.....	41
2.3.4 Producción y purificación de metabolitos secundarios .....	42
2.3.5 Concentración de péptidos extraídos de <i>Xenorhabdus nematophila</i> .....	46
2.3.6 Prueba de inhibición por gota.....	47
2.3.7 Evaluación de la concentración mínima inhibitoria (MIC) .....	50
2.3.8 Caracterización de bacteriocina .....	52
2.3.8.1 Efecto de la temperatura .....	52
2.3.8.2 Efecto del pH .....	53
2.4 Conclusiones .....	57
2.5 Perspectivas .....	57
2.6 Referencias.....	59

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> Número de artículos relacionados con metabolitos producidos por <i>Xenorhabdus</i> spp. y/o <i>Photorhabdus</i> spp. en los últimos 25 años. ....	0
<b>Figura 2</b> Tipos de publicaciones encontradas con el criterio de búsqueda “metabolitos producidos por <i>Xenorhabdus</i> spp. y/o <i>Photorhabdus</i> spp.”.....	1
<b>Figura 3</b> Autores con mayor número de publicaciones relacionadas al tema “metabolitos producidos por <i>Xenorhabdus</i> spp. y/o <i>Photorhabdus</i> spp.”, en los últimos 25 años.....	2
<b>Figura 4</b> Países con publicaciones relacionadas al tema “metabolitos producidos por <i>Xenorhabdus</i> spp. y/o <i>Photorhabdus</i> spp.”.....	0
<b>Figura 5</b> Larvas de <i>G. mellonella</i> inoculadas con IJ a una concentración de 1000 IJ/Larva .....	20
<b>Figura 6</b> Trampa White con larvas infectadas.....	21
<b>Figura 7</b> Medio de cultivo sólido. Izq.) Agar extracto de levadura Der.) Agar nutritivo. ....	23
<b>Figura 8</b> Representación de corte transversal nemátodos con ayuda de bisturí. ....	24
<b>Figura 9</b> Representación producción de metabolitos secundarios producidos a partir de una colonia de la variante primaria (F1) de <i>xenorhabdus</i> en medio de cultivo sólido agar NBTA. A) Siembra por estría de variante primaria (F1) de <i>xenorhabdus</i> sobre medio de cultivo agar NBTA. B) Se inoculó con una colonia un matraz Erlenmeyer con 50 mL de caldo STB. C) Se incubó a 30 °C, 130 rpm 48 h.....	26
<b>Figura 10</b> Representación prueba de inhibición por gota o mancha en césped .....	30
<b>Figura 11</b> Esquema procedimiento MIC. ....	32
<b>Figura 12</b> Esquema tratamiento térmico BLIS.....	33
<b>Figura 13</b> Esquema efecto del pH sobre la BLIS .....	34
<b>Figura 14</b> Larvas de <i>G. mellonella</i> en cámaras de inoculación. ....	35
<b>Figura 15</b> Larvas de <i>Tenebrio molitor</i> durante producción la de IJ. ....	36
<b>Figura 16</b> A) Emergencia de IJ en larvas de <i>T. molitor</i> . B) IJ Vista microscopio aumento 40x.....	36
<b>Figura 17</b> Medio sólido 5 días después de la inoculación. ....	37
<b>Figura 18</b> IJ inoculados sobre medio de cultivo agar extracto de levadura 5 días después de inoculación. ....	37
<b>Figura 19</b> A- <i>Xenorhabdus</i> Fase I tiempo de cultivo 32h pH 8.0 B- <i>Xenorhabdus</i> Fase II tiempo de cultivo 32h. Aumento 1000x. ....	38
<b>Figura 20</b> Colonias de <i>Xenorhabdus</i> en medio solido NBTA. ....	39
<b>Figura 21</b> <i>Xenorhabdus</i> Medio de cultivo solido agar NBTA. A-Fase I B-Fase II.....	39
<b>Figura 22</b> Tinción Gram de colonias de <i>Xenorhabdus</i> crecidas en medio solido NBTA vista microscopio. Aumento 1000x.....	40
<b>Figura 23</b> Gel de agarosa 1.5 %, carril 4 marcador de peso molecular, primera banda es de 1500 pb.....	41
<b>Figura 24</b> Cinética de crecimiento de <i>Xenorhabdus nematophila</i> . Historial de pH durante la cinética.....	42
<b>Figura 25</b> Tinción Gram de <i>Xenorhabdus</i> durante cinética de 48 h. Vista al microscopio. Aumento 1000x. ....	43
<b>Figura 27.-</b> Siembra de muestreos cinética de crecimiento de 120 h de <i>Xenorhabdus nematophila</i> realizados cada 24 h. Medio de cultivo agar NBTA. ....	44

Figura 26.- Valores de densidad óptica obtenidos durante la cinética de crecimiento 120 h de <i>Xenorhabdus nematophila</i> .....	44
Figura 28.- Tinción Gram de los muestreos realizados en la cinética de crecimiento 120 h de <i>Xenorhabdus nematophila</i> . A) 24 h B) 48 h C) 72 h D) 96 h E)120 h .....	45
<b>Figura 29</b> Concentración de proteína en los metabolitos producidos por <i>Xenorhabdus nematophila</i> , cinética de crecimiento de 120 h.....	46
<b>Figura 30</b> .- Tinción Gram de los microorganismos de interés económico usados en este trabajo. A) <i>L. monocytogenes</i> B) <i>E. coli</i> C) <i>S. aureus</i> . Vista al microscopio. Aumento 1000x.....	47
<b>Figura 31</b> Radio halos de inhibición, medidos con vernier en medio de cultivo sólido de cada microorganismo indicador 24 h después de colocar la BLIS, producida por <i>X. nematophila</i> en cada tiempo de fermentación evaluado.....	48
<b>Figura 32</b> Halos de inhibición obtenidos por la BLIS de <i>X. nematophila</i> durante su cinética de crecimiento de 48 a 120 h y contra los 3 microorganismos indicadores. ....	49
<b>Figura 33</b> Concentración mínima inhibitoria de <i>S. aureus</i> , más un control positivo y otro negativo.....	50
<b>Figura 34</b> Concentración mínima inhibitoria de <i>E. coli</i> , más un control positivo y otro negativo.....	51
<b>Figura 35</b> Concentración mínima inhibitoria de <i>L. monocytogenes</i> , más un control positivo y otro negativo. ....	51
<b>Figura 36</b> Halos de inhibición obtenidos después de someter a la BLIS a intervalos de temperatura 90-130 durante 10 min más un control negativo (C).....	52
<b>Figura 37</b> Halos de inhibición obtenidos después de someter a la BLIS a distintos pH intervalos de 2 a 8 más un control negativo (C).....	53

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1</b> Metabolitos secundarios producidos por <i>Xenorhabdus</i> probados en distintos modelos y ensayos. ....	8
<b>Tabla 2</b> Concentración de microorganismos después de 6 h de incubación. ....	31
<b>Tabla 3</b> Concentración de BLIS en cada dilución de la MIC.....	50

## Resumen general

Los nemátodos entomopatógenos (NEP) reúnen atributos que los hacen potentes agentes de control biológico de insectos plaga, ya que pueden perseguir a sus presas en el suelo. Los NEP que han mostrado mejores resultados respecto al control biológico de plagas pertenecen a las familias *Steinernematidae* y *Heterorhabditidae*, que están mutualistamente asociados con bacterias de los géneros *Xenorhabdus* y *Photorhabdus*, respectivamente, durante el proceso de simbiosis se desarrollan numerosos metabolitos secundarios con propiedades antimicrobianas sobre un gran número de organismos competidores, por lo que son de gran interés caracterizar dichos metabolitos para tratar de incursionar en la industria alimentaria. El siguiente trabajo se dividió en dos secciones. El primer capítulo presenta una revisión bibliométrica en el periodo 2000-2020, de artículos de investigación originales sobre metabolitos secundarios producidos por *Xenorhabdus nematophila*, publicados en revistas JCR. Por otra parte, el segundo capítulo trata sobre el aislamiento de *Xenorhabdus* a partir de nemátodos entomopatógenos de la familia *Steinernematidae*, con la finalidad de encontrar actividad antimicrobiana, inicialmente contra bacterias de interés económico como *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*. Se aisló *Xenorhabdus nematophila* y se produjeron los metabolitos secundarios de ésta, se avanzó en la caracterización inicial de estos péptidos quedando pendiente la caracterización en su totalidad.

## General Summary

Entomopathogenic nematodes (ENPs) have attributes that make them potent agents for biological control of insect pests, since they can pursue their prey in the soil. The NEP that have shown the best results with respect to biological control of pests belong to the Steinernematidae and Heterorhabditidae families, which are mutually associated with bacteria of the genera *Xenorhabdus* and *Photorhabdus*, respectively. During the symbiosis process, numerous secondary metabolites with antimicrobial properties are developed on a large number of competing organisms, so it is of great interest to characterize these metabolites to try to make inroads in the food industry. The following work was divided into two sections. The first chapter presents a bibliometric review in the period 2000-2020, of original research articles on secondary metabolites, published in JCR journals. On the other hand, the second chapter deals with the isolation of *Xenorhabdus* from entomopathogenic nematodes of the Steinernematidae family, with the aim of finding antimicrobial activity, initially against bacteria of economic interest such as *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. *Xenorhabdus nematophila* was isolated and its secondary metabolites were produced; progress was made in the initial characterization of these peptides, pending the complete characterization.



---

# CAPÍTULO 1

---

*Xenorhabdus nematophila*, metabolitos secundarios.  
Una alternativa frente a microorganismos patógenos en  
la industria alimentaria.



## 1.1 Introducción

En las últimas décadas, se han buscado nuevos mecanismos para el control de patógenos en la industria alimentaria. las bacterias ácido lácticas (BAL) producen péptidos de síntesis ribosomal con un amplio espectro de acción contra los patógenos transmitidos por alimentos, a los cuales, se les han llamado bacteriocinas y cuando no se han caracterizado por completo se denominan sustancias inhibitorias similares a bacteriocinas (BLIS) (Herrera et al., 2013). Una ventaja de usarlas es que debido a su naturaleza se han considerado GRAS (Generally regarded as safe), su mecanismo de acción y su espectro de inhibición, hace que sea menos frecuente el surgimiento de cepas resistentes (Camargo, Todorov, Chihib, Drider, & Nero, 2018). Por lo que las bacteriocinas se han considerado como compuestos importantes en la prevención de infecciones alimentarias producidas por patógenos como *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* que actualmente son una preocupación para la salud a nivel mundial.

*Xenorhabdus nematophila* es una bacteria Gram-negativa, miembro de la familia *Enterobacteriaceae*, y simbiote de nemátodos entomopatógenos (NEP) del género *Steinernema*, cuya producción de metabolitos secundarios con actividad antimicrobiana es un activo potencial contra un gran número de microorganismos descomponedores o patógenos (Sergeant et al., 2006).

Con este estudio se pretende demostrar que la *Xenorhabdus* produce BLIS efectiva contra microorganismos de interés en la industria alimentaria.

## 1.2 Justificación

Los NEP están relacionados con una especie bacteriana simbiótica, por lo que es de interés aislarla y caracterizarla para estudiar su producción de metabolitos secundarios, no solo para el interés agrícola sino también para aplicaciones alimentarias o de salud humana.

## 1.3 Objetivo general

Caracterizar metabolitos con actividad antimicrobiana, producidos por *Xenorhabdus nematophila*, con potencial aplicación como aditivo alimentario.

### 1.3.1 Objetivos específicos

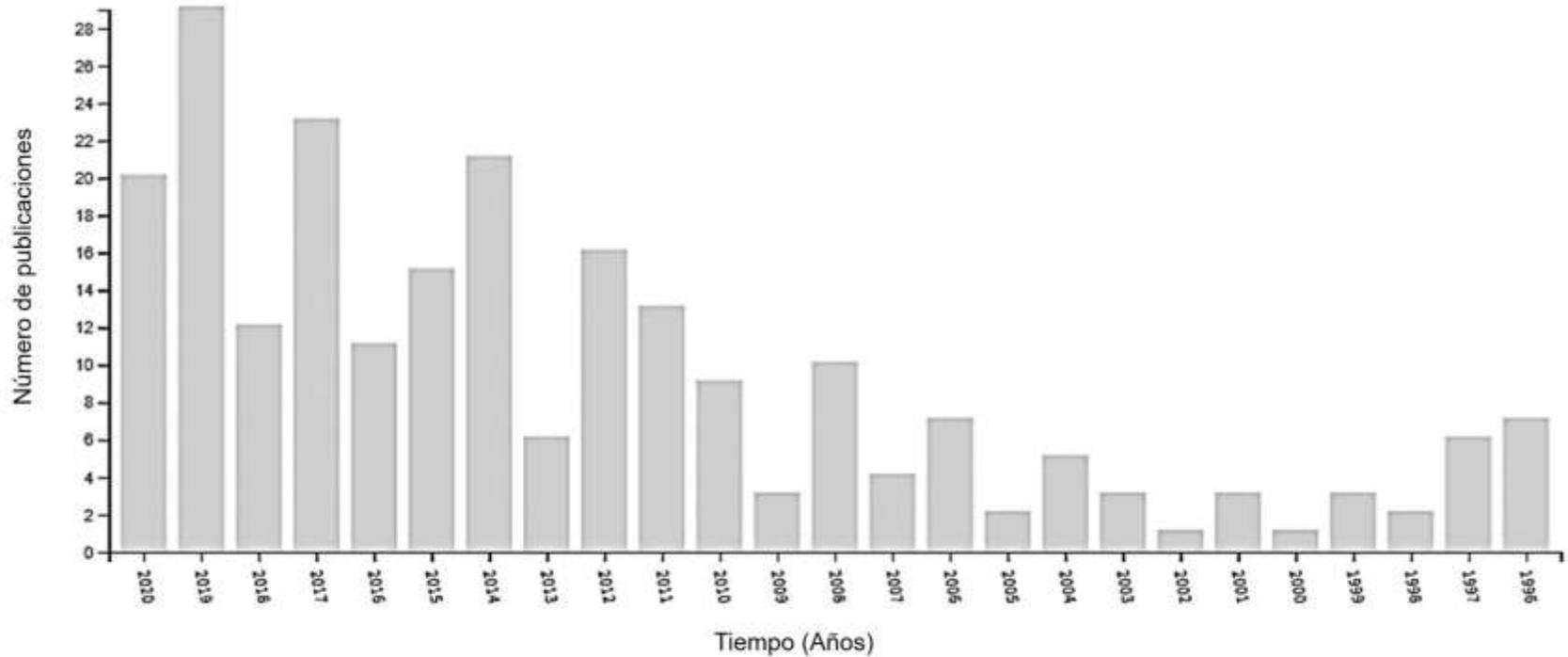
1. Determinar condiciones de cultivo líquido para la producción de actividad antimicrobiana por *X. nematophila*, contra bacterias indicadoras.
2. Diseñar un método de purificación de metabolitos antimicrobianos producidos por *X. nematophila* en cultivo sumergido, para su caracterización.

## 1.4 Enfoque metodológico

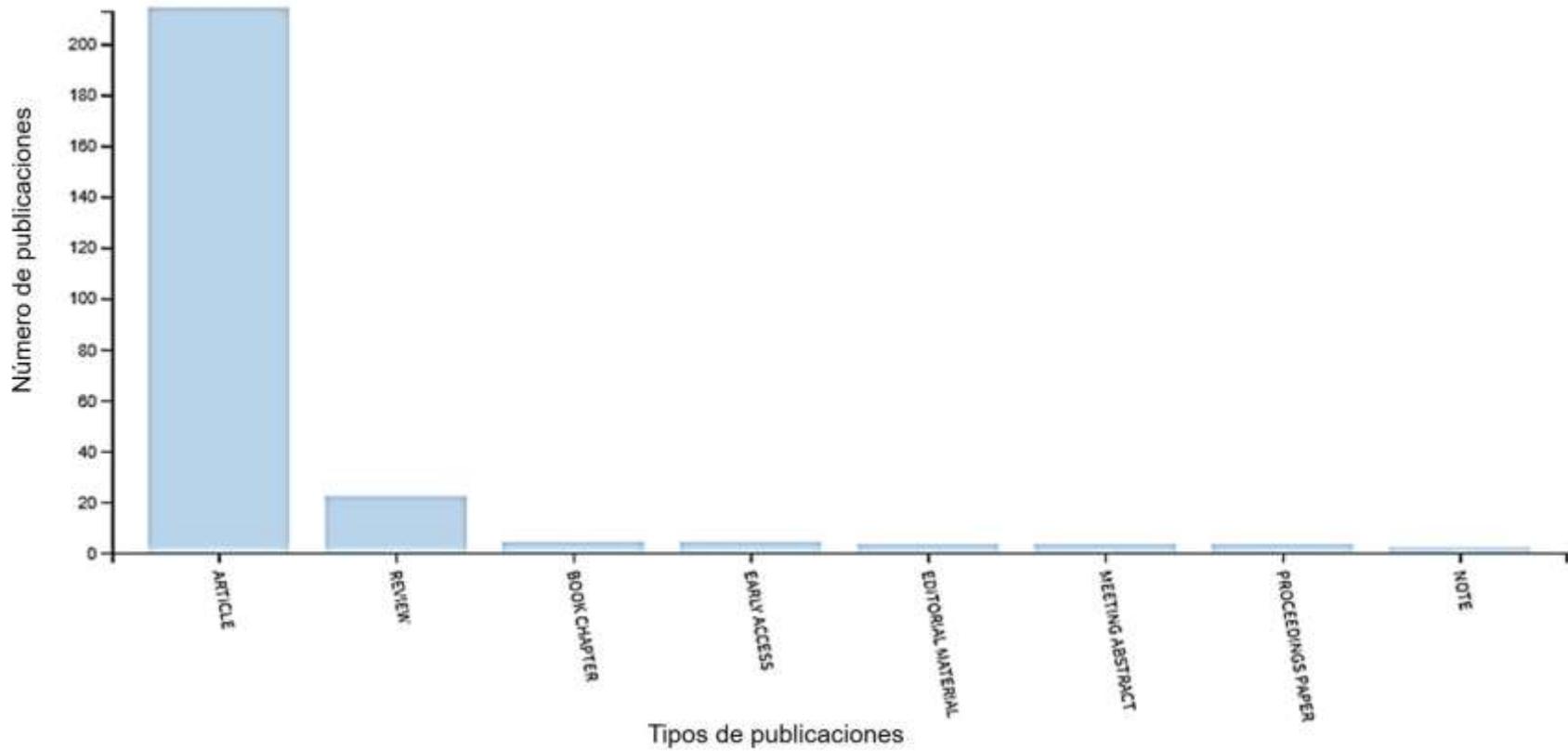
La búsqueda de literatura científica relacionada se realizó con los recursos disponibles del Consorcio Nacional de Recursos de Información (CONRICyT) del periodo 2000-2020, usando la base de datos Web of Science. Se usaron las palabras clave “Metabolites”, “*Xenorhabdus*” y “*Photorhabdus*” y el operador AND. Se obtuvo un total de 500 registros los cuales fueron filtrados para eliminar los artículos repetidos obteniendo un total de 239 documentos, los cuales fueron analizados por Web of Science, tomando 4 categorías en particular (Publication Years, Document Types, Authors y Countries/Regions).

Según la gráfica de publicaciones con respecto al tiempo (Fig. 1), se observa que la tendencia de la investigación está en ascenso en los últimos 25 años, con un mayor número de publicaciones en el año 2019 (29 artículos).

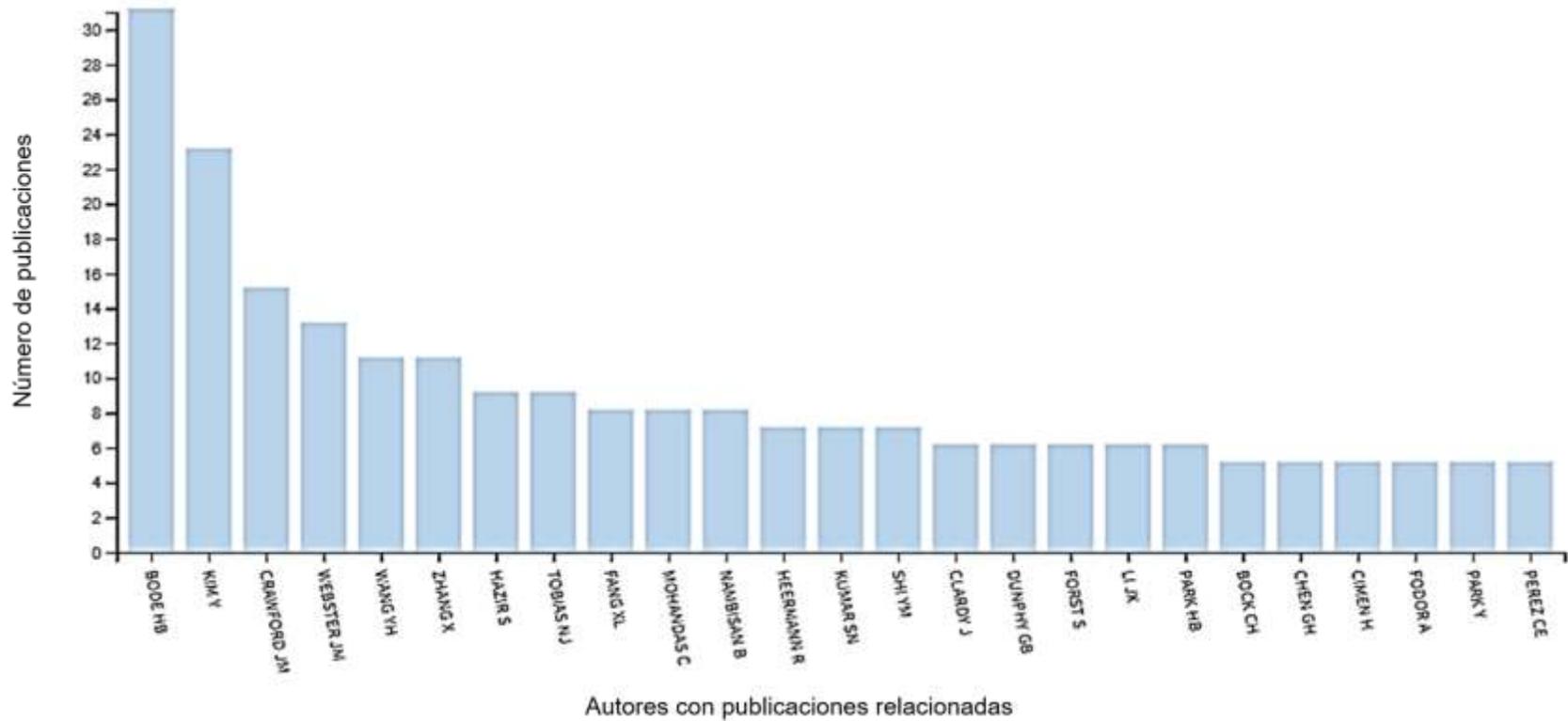
Dentro del tipo de publicaciones encontradas durante la búsqueda (Fig. 2), los artículos originales (213) son los que predominan en tanto que las revisiones son 21. Los autores que más publicaciones tienen (Fig. 3) son Bode HB y Kim Y con más de 20 publicaciones en el tema.



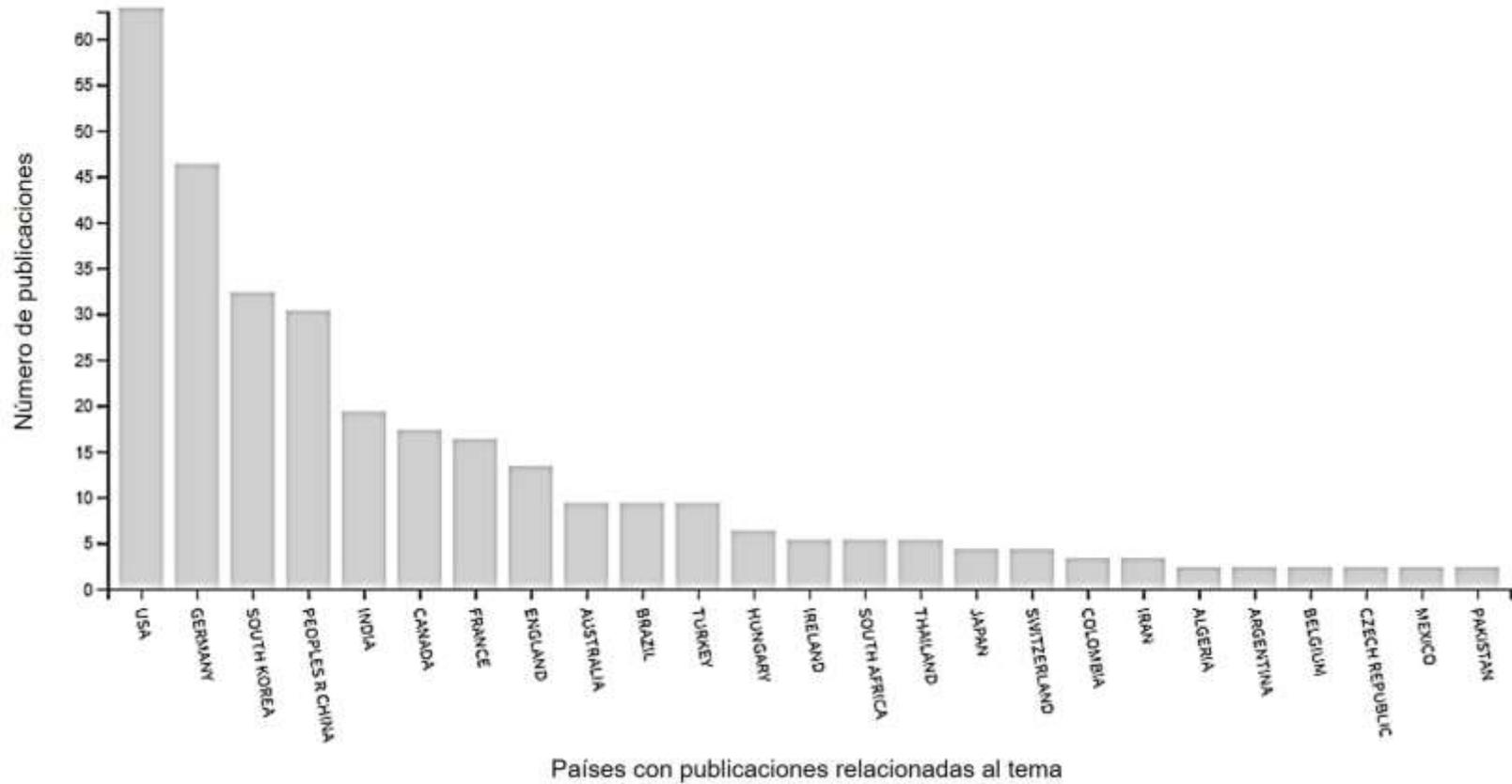
**Figura 1** Número de artículos relacionados con metabolitos producidos por *Xenorhabdus* spp. y/o *Photorhabdus* spp. en los últimos 25 años.



**Figura 2** Tipos de publicaciones encontradas con el criterio de búsqueda “metabolitos producidos por *Xenorhabdus* spp. y/o *Photorhabdus* spp.”



**Figura 3** Autores con mayor número de publicaciones relacionadas al tema “metabolitos producidos por *Xenorhabdus* spp. y/o *Photorhabdus* spp.”, en los últimos 25 años.



**Figura 4** Países con publicaciones relacionadas al tema "metabolitos producidos por *Xenorhabdus* spp. y/o *Photorhabdus* spp."

Finalmente, la categoría de países/regiones (Fig.4) donde se han realizado estudios relacionados con “metabolitos producidos por *Xenorhabdus* spp. y/o *Photorhabdus* spp.”, se encontró que Estados Unidos y Alemania cuentan con más de 40 publicaciones relacionadas.

Los estudios *in vitro* sugieren un papel prospectivo de las bacteriocinas y/o metabolitos producidos por *Xenorhabdus*, como alternativa para el control de diversos microorganismos patógenos. El ensayo de actividad antimicrobiana generalmente es el de difusión en agar con discos de papel Whatman® 3 MM colocados sobre el agar con bacterias indicadoras.

## **1.5 Bacteriocinas**

Las bacteriocinas son un sustituto potencial de conservantes químicos debido a su naturaleza, ya que provienen de bacterias ácido lácticas. El uso de bacteriocinas como bio conservantes se atribuye a sus propiedades de inhibición sobre diversos microorganismos patógenos, su acción en amplios rangos de pH y termo estabilidad, planteando así, diferentes aplicaciones en la industria alimentaria (Fons, 2000).

Existe una gran diversidad de bacteriocinas reportadas en muchas especies bacterianas, también dentro de una misma especie podrían redituarse distintos tipos de bacteriocinas, las más estudiadas son las producidas por bacterias ácido lácticas (BAL), éstas participan en la fermentación y conservación de alimentos, aumentando su calidad higiénica al inhibir la microbiota competitiva, incluyendo

microorganismos patógenos como *L. monocytogenes*, *S. aureus*, *Bacillus cereus*, *Clostridium botulinum* y *Salmonella* entre otras (Beshkova & Frengova, 2012).

### 1.5.1 Clasificación de las bacteriocinas

Estas se clasifican de acuerdo con sus características bioquímicas y genéticas (Egan et al., 2016):

- ✚ Clase I: Lantibióticos. Péptidos pequeños (<5 kDa)
- ✚ Clase I a: Péptidos elongados, catiónicos, moléculas anfipáticas y flexibles. Masa molecular entre 2-4 kDa. Ejemplos: Lacticina 3147 y la nisina.
- ✚ Clase I b: Péptidos con características globulares e hidrófobos. Su masa molecular está entre 2-3 kDa.
- ✚ Clase II: No lantibióticos. Péptidos pequeños (<10 kDa) lineales y termoestables.
- ✚ Clase II a: Son péptidos activos contra listeria, ejemplo: pediocina PA-1.
- ✚ Clase II b: Formadores de complejos, requieren de dos péptidos para una mejor actividad antimicrobiana. Ejemplos: lactococcina G y Lactacin F.
- ✚ Clase II c: Péptidos pequeños y termoestables. Ejemplos: divergicina A y acidocina B.
- ✚ Clase III: Péptidos grandes (>30 kDa) termolábiles. Ejemplos: Helveticina J y lactacinas A y B.
- ✚ Clase IV: Péptidos con una parte proteica y una o más fracciones lipídicas o glucosídicas.

### 1.5.2 Aplicación de bacteriocinas en los alimentos

Métodos de aplicación convencionales (Londoño, Tabora, López, & Acosta, 2015):

- 1) Inoculación directa de BAL en el alimento para producir bacteriocinas en el producto.
- 2) Aplicación de la bacteriocina purificada como conservador en el alimento.
- 3) Uso de un producto fermentado previamente con la producción de bacteriocina como un ingrediente en el procesado de un alimento.

### 1.6 *Xenorhabdus*

El género *Xenorhabdus* son bacterias Gram-negativas de la familia *Enterobacteriaceae*, y simbioses de NEP del género *Steinernema* con una secuencia de nucleótidos TTCG en las posiciones 208-211 (Gaugler & Kaya, 1990; Szallas et al., 1997).

El nematodo *Steinernema carpocapsae* es colonizado por *Xenorhabdus nematophila* en una asociación mutualista, esta no es obligada ya que ambos pueden sobrevivir en ausencia del otro, sin embargo, se requiere de *X. nematophila* para que los nemátodos de *S. carpocapsae* se reproduzcan de manera efectiva (Wang & Bedding, 1996).

*X. nematophila* es ingerida y se aloja dentro de la vesícula de *S. carpocapsae*, este actúa como vector, transportando a *X. nematophila* a un insecto susceptible en el

que se libera y mata al insecto. Los nemátodos se encuentran en el suelo, el estadio que actúa como vector se llama juvenil infectivo (IJ), este está encerrado en una doble cutícula y no se alimenta debido a que tiene la boca y el ano cerrados. El cadáver del insecto proporciona nutrientes para la propagación de nemátodos y de bacterias, cuando estos se agotan *X. nematophila* se vuelve a asociar con el nematodo y este busca un nuevo insecto huésped para repetir el ciclo (Fimbres Cubillas & Flores Lara, 2016)

Una característica importante en el género *Xenorhabdus* es una variación de fenotipos que son producidos en un periodo de tiempo donde el ciclo de desarrollo es estacionario en estos organismos (Fase 1 & Fase II) (Joyce et al., 2008), la variación se identifica por dos principales propiedades, 1) la adsorción de colorante y 2) la producción de antibióticos.

## **1.7 Variación fenotípica**

Se ha reportado que estas variantes no presentan diferencia respecto a su actividad antimicrobiana, sin embargo, la variante secundaria (F2) no tolera el progreso del nematodo, en ese sentido se propone que F2 está ajustada para sobrevivir fuera del nematodo. Las bacterias aisladas de IJ se designaron como variante primaria F1, estas producen actividad antimicrobiana y absorben colorantes cuando crecen en agar (Forst, Dowds, Boemare, & Stackebrandt, 1997).

Existen variaciones esenciales entre fases, F1 abastece y resguarda nutrientes esenciales para que los nemátodos puedan ejecutar y metabolizar al insecto (Fuchs, Proschak, Jaskolla, Karas, & Bode, 2011), así como para producir una variedad de

compuestos antimicrobianos y toxinas, las cuales son responsables de la degradación del insecto hospedero, presentan flagelos y producen enzimas para la descomposición de las proteínas, lípidos y carbohidratos del hospedero (Hinchliffe, Hares, & Dowling, 2010).

F2 también es capaz de matar al insecto y colonizar al nemátodo, pero no son eficientes al proporcionar condiciones de crecimiento, además que no se han encontrado asociaciones de origen natural con nemátodos. No tiene flagelos y suele presentarse dentro del hemocele tras la penetración y liberación por parte del IJ (Akhurst, 1980; Boemare & Akhurst, 2006).

La variación de fase puede ser fácilmente identificada por la adsorción de colorantes y la producción de antibióticos, F1 forma colonias pequeñas, en medios con agar, absorben rojo neutral en agar McConkey y el azul de bromotimol (BTB) en agar NBTA, de igual forma reducen el cloruro de trifeniltetrazolio (TTC), por otra parte, F2 no absorbe colorantes, las colonias son más grandes y se tiñen de rojo, ya que solo tienen la capacidad de reducir el TTC pero no absorbe el BTB (Ensign & Ciche, 2000).

## **1.8 Complejos proteicos producidos por *Xenorhabdus***

*Xenorhabdus* muestran un extenso metabolismo secundario durante la fase post-exponencial de crecimiento. Permitiendo así la asociación simbiótica con el nematodo y proporcionando condiciones de desarrollo óptimas (Laguna Fandiño, 2006). Como productos de esta simbiosis se obtienen moléculas pequeñas como

péptidos no ribosomales, además de bacteriocinas sideróforas y ácidos grasos (Tobias et al., 2016).

Por lo que uno de los productos de mayor interés son los metabolitos secundarios que se derivan de la simbiosis nematodo-bacteria (Tabla 1. Anexo). *Xenorhabdus* establece 6.5 % de sus genomas dedicados a la producción de metabolitos secundarios, esto es comparable con otros organismos como *Streptomyces* o *Myxobacteria* (Shi & Bode, 2018).

### **1.8.1 Xenortido-Péptidos**

Están compuestos de 2 a 8 aminoácidos, siendo la valina el aminoácido más frecuente, seguido de fenilalanina y leucina, teniendo como función la inhibición del sistema inmune del insecto (Reimer et al., 2013).

### **1.8.2 Antibióticos**

Como el cadáver del insecto es rico en nutrientes, estos se deben proteger de los competidores naturales para que los nemátodos puedan completar su ciclo de vida, por lo que *Xenorhabdus* produce metabolitos activos contra hongos, protozoos y otras bacterias (Reimer, Luxenburger, Brachmann, & Bode, 2009).

### **1.8.3 Fabclavinas**

Estos metabolitos muestran una actividad antimicrobiana de amplio espectro, tanto en bacterias como en eucariotas (Fuchs, Grundmann, Kurz, Kaiser, & Bode, 2014).

#### **1.8.4 Depsipéptidos (xenematidos)**

Muestran actividad contra bacterias Gram-positivas y Gram-negativas (Lang, Kalvelage, Peters, Wiese, & Imhoff, 2008).

#### **1.8.5 Péptidos antimicrobianos-*Xenorhabdus***

Muestran actividad contra hongos patógenos de humanos y plantas (Fuchs et al., 2011).

### **1.9 Otros metabolitos producidos por *Xenorhabdus***

Enzimas de tipo proteasas son secretadas por F1, el número de proteasas y el nivel de actividad varía entre poblaciones de los aislados. Su actividad involucra la degradación de proteínas de los insectos que proveen de nutrientes a la bacteria y al nematodo (Bode, 2009).

De igual forma, se encuentran exoenzimas producidas por *X. nematophila* principalmente la lecitinasa (Wang & Bedding, 1996). Las moléculas antibióticas más pequeñas muestran actividad contra hongos y otras bacterias mientras que las macromoléculas como las bacteriocinas, inhiben el desarrollo de especies competidoras relacionadas con *Xenorhabdus* (Burnell & Stock, 2000).

La diversidad de metabolitos bioactivos producidos por esta bacteria, sugiere ser fuente potencial de nuevas moléculas con actividad distinta a las convencionales, por lo que se debe de continuar investigando estos compuestos antimicrobianos alternos que puedan ser incluidos a la industria alimentaria con la finalidad de

disminuir el uso de aditivos de naturaleza química que afecta a la salud y al ambiente indirectamente.

## 1.10 Conclusiones

Los metabolitos producidos por bacterias simbiotes es un campo muy poco explorado en México, menos del 5 % de los artículos reportan haber explorado los metabolitos producidos por *X. nematophila*.

A nivel mundial existen resultados relevantes acerca del estudio de los metabolitos secundarios producidos por *Xenorhabdus nematophila* con potenciales aplicaciones en el sector agrícola, alimentario y de la salud. En lo que respecta a la purificación de metabolitos se han logrado caracterizar gran parte de ellos, cultivos a nivel matraz aún no se han evaluado contra patógenos de interés en la industria alimentaria, se han enfocado principalmente en evaluar su actividad contra indicadores fitopatógenos.

En fermentaciones a nivel biorreactor Inman & Holmes (2012) evaluaron la actividad de los metabolitos producidos por *Xenorhabdus* contra 14 microorganismos, entre los cuales se encontraban indicadores de interés en la industria de alimentos, por lo que es imprescindible realizar investigaciones de dichos metabolitos, por ejemplo, como posible sustituto de aditivos químicos usados como controladores de patógenos en la industria alimentaria.

## 1.11 Anexos

**Tabla 1** Metabolitos secundarios producidos por *Xenorhabdus* probados en distintos modelos y ensayos.

Cepa	Producción	Ensayo de actividad antibacteriana	Recuperación	Resultados	Referencia
<i>Xenorhabdus nematophila</i>	Se cultivó en caldo de soya tripticaseína (TSB) a 30 °C, pH 7.5, agitación 140 rpm y 0.25 vvm en un fermentador de 300 L.	Ensayo zona de inhibición. Discos 6 mm (papel Whatman 3MM) con 500 µL de sobrenadante incubados a 30 °C durante 24 h. Probados contra bacterias patógenas para plantas ( <i>Agrobacterium vitis</i> , <i>Pectobacterium carotovorum</i> subsp. <i>carotovorum</i> , <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tabaci</i> , and <i>Ralstonia solanacearum</i> ).	El caldo de cultivo de 48 h se centrifugo a 10,000 g durante 30 min y el sobrenadante se utilizó para la extracción de metabolitos.	Ensayo de actividad antimicrobiana: caldo de cultivo de 48 h, con una absorbancia a 600 nm de 1.8-1.9, zonas de inhibición diámetro promedio de 2 mm contra las 5 bacterias Fito patógenas.	Ji, D., Yi, Y., Kang, G. H., Choi, Y. H., Kim, P., Baek, N. I., & Kim, Y. (2004). Identification of an antibacterial compound, benzylideneacetone, from <i>Xenorhabdus nematophila</i> against major plant-pathogenic bacteria. <i>FEMS Microbiology Letters</i> , 239(2), 241-248.
<i>Xenorhabdus nematophila</i>	Se cultivó en caldo Luria Bertani (LB) a 30 °C, posteriormente fue cultivado en relación 1:20 en 5 mL en caldo LB.	Se cultivaron los microorganismos indicadores <i>E. faecalis</i> y <i>S. saprophyticus</i> en placas de 96 pocillos con medio LB, se adicionó 20 µL de sobrenadante estéril de <i>X. nematophila</i> , se incubaron a 30 °C durante 24 h.	Se tomaron muestras de 1 mL a las 6, 9, 12, 24, 48 y 72 h, se centrifugaron a 14,000 rpm, 1.5 min, el sobrenadante se filtró con filtros de 0.2 µm.	Se reportó inhibición solamente contra <i>S. saprophyticus</i> , los resultados expresados en % de inhibición arrojan niveles máximos de 84% a las 12 h, disminuyendo progresivamente hasta las 72 h.	Singh, S., Orr, D., Divinagracia, E., McGraw, J., Dorff, K., & Forst, S. (2015). Role of secondary metabolites in establishment of the mutualistic partnership between <i>Xenorhabdus nematophila</i> and the entomopathogenic nematode <i>Steinernema carpocapsae</i> . <i>Applied and environmental microbiology</i> , 81(2), 754-764.
<i>Xenorhabdus nematophila</i> (ATCC 39497)	Se cultivó en Biorreactor Sartorius Biostat A-plus empleando caldo de cultivo BHI (300 rpm, 1 vvm, pH 7.3, 28°C, 30% Oxígeno disuelto).	Alícuotas de 0.1 mL se esparcieron en placas Müller-Hinton. Los discos se colocaron sobre la superficie de agar, se inocularon a temperatura óptima del indicador y se midieron diámetros de inhibición. Se evaluaron contra 14 microorganismos indicadores entre los cuales se encuentran <i>Bacillus cereus</i> , <i>Escherichia coli</i> y <i>Staphylococcus aureus</i> .	El cultivo bacteriano se sometió a filtración utilizando un casete de filtro de corte de 50 kDa, el permeado se dividió en 3 alícuotas: 100 mL sin esterilizar, 100 mL esterilizados por filtración y 100 mL esterilizados por calor (autoclave)	<i>X. nematophila</i> secreta compuestos antibacterianos termolábiles y termoestables. Para el ensayo de actividad antibacteriana los compuestos termoestables generaron halos de inhibición de 7 mm diámetro y los termolábiles de 3 mm para <i>Bacillus cereus</i> y diámetros de 8 a 11 mm en metabolitos termoestables para <i>E. coli</i> y <i>S. aureus</i>	Inman, F. L., & Holmes, L. (2012). Effect of heat sterilization on the bioactivity of antibacterial metabolites secreted by <i>Xenorhabdus nematophila</i> . <i>Pakistan Journal of Biological Sciences</i> , 15(20), 997.

Cepa	Producción	Ensayo de actividad antibacteriana	Recuperación	Resultados	Referencia
<i>Xenorhabdus nematophila</i> YL001	Se llevó a cabo en un fermentador Setric de 7 L (volumen de trabajo 4.5 L), temperatura 28 °C, aireación 2-2.5 vvm, agitación 200-300 rpm, durante 72 h.	Se midió por difusión en agar contra <i>Bacillus subtilis</i> , 1 mL de cultivo de <i>B. subtilis</i> se aplicaron a una placa con agar nutritivo y se incubaron durante 2 h a temperatura ambiente, los sobrenadantes de <i>xenorhabdus</i> se filtraron utilizando un micro filtro de jeringa de 0.22 µm, se colocaron en discos de 6 mm (papel Whatman 3MM). Los discos secos se colocaron sobre las placas NA y se incubaron a 28 °C durante 24 h.	Se extrajeron muestras de 20 mL cada 3 h, de los cuales 10 mL se centrifugaron a 12,000 rpm, 20 min, 4 °C.	Con las condiciones de velocidad de agitación de 300 rpm y una aireación de 2.5 vvm se obtuvo una actividad antibiótica máxima de 232 U/mL a las 48 h.	Wang, Y. H., & Zhang, X. (2007). Influence of agitation and aeration on growth and antibiotic production by <i>Xenorhabdus nematophila</i> . <i>World Journal of Microbiology and Biotechnology</i> , 23(2), 221-227.
<i>Xenorhabdus bovienii</i>	Se cultivó en caldo de lisogenia (LB) a 30 °C	Se subcultivaron por separado en 5 mL de LB y cultivadas a 30 °C hasta una DO600 nm de 0.5 – 0.6. Los cultivos se diluyeron 1200 veces y se mezclaron 100 µL con 50 µL de cada precipitado de polietilenglicol (PEG). Los cultivos en microplaca se incubaron a 30 °C con agitación. La D.O. a 600nm se midió a las 0 y 24 h de incubación.	DO600 nm de 0.5–0.6 fueron inducidos con mitomicina C (5 µg mL) durante 18 h	El papel que juega la xenorhabdicina en la competencia entre especies y en la definición de la estructura de la comunidad puede variar en cepas individuales dependiendo de las diferencias en el nivel de Expresión del gen de síntesis de la cola del profago P2.	Morales-Soto, N., Gaudriault, S., Ogier, J. C., Thappeta, K. R., & Forst, S. (2012). Comparative analysis of P2-type remnant prophage loci in <i>Xenorhabdus bovienii</i> and <i>Xenorhabdus nematophila</i> required for xenorhabdycin production. <i>FEMS microbiology letters</i> , 333(1), 69-76.
<i>Xenorhabdus szentirmaii</i>	Se cultivó con caldo lisogenia (LB) a 30 °C, durante toda la noche.	Se evaluó contra <i>Escherichia coli</i> , la cual fue activada inoculando 250 µL de la cepa a 5 mL de caldo LB, el cual se creció hasta la fase exponencial, posteriormente se diluyó 1:200. Luego 200 µL del indicador diluido se mezclaron con 25 µL del sobrenadante en una placa de micro titulación de 96 pocillos y se incubó durante 24 h a 30 °C con agitación. La inhibición del crecimiento (% de inhibición) se calculó dividiendo el valor de la densidad óptica a 600 nm de las muestras tratadas por el OD600 valor de las muestras no tratadas.	Los sobrenadantes se recolectaron a las 24 y 48 h por centrifugación (16, 873 g, 2 min) y filtrados con filtros de acetato de celulosa (0.2 µm).	A las 24h presentó inhibición de 30 % medidos a una OD600 manteniendo el porcentaje a las 48 h.	Ciecki, K., Wesener, S., Jaber, D., Mirza, S., & Forst, S. (2019). ngrA-dependent natural products are required for interspecies competition and virulence in the insect pathogenic bacterium <i>Xenorhabdus szentirmaii</i> . <i>Microbiology</i> , 165(5), 538-553.

Cepa	Producción	Ensayo de actividad antibacteriana	Recuperación	Resultados	Referencia
<i>Xenorhabdus bovienii</i>	Las cepas de <i>Xenorhabdus</i> y <i>Escherichia coli</i> se cultivaron de forma rutinaria en caldo de lisogenia (LB; 1 % de triptona de Bacto, 0.5 % de NaCl, 0.5 % de extracto de levadura y 0,01 mM de MgSO <sub>4</sub> ) o en medios sólidos con la adición de 15 g de agar, a 30 o 37 C, respectivamente.	Se utilizaron cepas de <i>Xenorhabdus</i> y <i>Photorhabdus</i> . Se subcultivó un cultivo de una noche de cada cepa (1:20) en 5 mL de LB y crecido a 30 °C durante 5–6 h y normalizado a un DO 600 de 0.5. Los cultivos normalizados se diluyeron (1:1200 en LB) y se mezclaron 100 µL del cultivo diluido con 50 µL de la preparación de xenorhabdicolina Xb-Sj en una microplaca de 96 pocillos. Las microplacas se incubaron durante 24 h a 30 °C con agitación y se midió la DO600 de cada cultivo. Te xenorhabdicolina con 100 µL de cultivos de prueba diluidos 1200 veces y los volúmenes finales se ajustaron a 150 µL con LB para todos los ensayos.	Los cultivos de Xsz-Sr se incubaron durante la noche a 30 °C en LB. Se centrifugó 1 mL de cultivo y se sedimentaron las células. se lavaron con LB fresco y luego se suspendieron en 1 mL de LB. Luego se subcultivaron 250 µL de Xsz-Sr resuspendido en 5 ml de medio LB o de Grace en matraces por duplicado y se cultivaron con agitación a 30 °C. A las 6, 12, 24 y 48 h, muestras duplicadas de 750 µL de cultivo de cada matraz se centrifugaron a 16,873 g durante 2 min y el sobrenadante resultante se filtró a través de filtros de acetato de celulosa de 0.2 µm.	Desde las 12 h de cultivo se produjo la suficiente actividad antibiótica 64 % para suprimir el crecimiento del microorganismo indicador en ensayos de microplaca MIC, obteniendo un máximo a las 48 h de 96% de inhibición.	Thappeta, K. R. V., Ciezki, K., Morales-Soto, N., Wesener, S., Goodrich-Blair, H., Stock, S. P., & Forst, S. (2020). R-type bacteriocins of <i>Xenorhabdus bovienii</i> determine the outcome of interspecies competition in a natural host environment. <i>Microbiology</i> , 166(11), 1074-1087.
<i>Xenorhabdus nematophila</i>	Los cultivos puros se cultivaron en 5 mL de LB hasta una DO600 = 0.5, momento en el que se añadieron 0.5 µg/ml de mitomicina C para inducir químicamente las bacteriocinas.	Se mezclaron un extracto de bacteriocina y un cultivo inicial de células sensibles en una proporción de 1:5 por volumen. Cada mezcla se pipeteó en cuatro pocillos repetidos en una placa de 100 pocillos y se incubó en un lector óptico de placas Bioscreen a 28 °C, con agitación a amplitud media durante 24 h (GrowthCurves USA).	Después de la incubación durante la noche a 28°C, se recogieron extractos de bacteriocina centrifugando los cultivos a 1,620 g durante 5 min y filtrando el sobrenadante a través de filtros de 0.45 µm.	Las compensaciones observadas entre la virulencia y la producción de bacteriocinas pueden estar mediadas por sus correlaciones opuestas con el crecimiento.  La evolución de una mayor virulencia está asociada con una producción reducida de bacteriocinas y un crecimiento más rápido in vitro.	Bhattacharya, A., Toro Díaz, V. C., Morran, L. T., & Bashey, F. (2019). Evolution of increased virulence is associated with decreased spite in the insect-pathogenic bacterium <i>Xenorhabdus nematophila</i> . <i>Biology letters</i> , 15(8), 20190432.

Cepa	Producción	Ensayo de actividad antibacteriana	Recuperación	Resultados	Referencia
<i>Xenorhabdus nematophila</i>	Se añadió mitomicina (0.5 mg/mL) en cultivos de caldo Luria de fase I y II en la etapa logarítmica (A600 = 0.5 a 0.6) para inducir la producción de bacteriocina. En estas condiciones, la población celular completa de cada cultivo de fase se lisaba por completo después de 3 a 5 h de incubación a 28°C.		Se trataron con ADNasa y ARNasa (10 mg/mL, 30 min, 37 °C), y los restos celulares se eliminaron mediante centrifugación a baja velocidad (6,000 g, 10 min, 48 °C). Las proteínas de los sobrenadantes de las fases I y II se precipitaron con polietilenglicol (PEG) al 10 % y NaCl 0.5 M. Los precipitados se recogieron por centrifugación (10,000 g, 15 min, 48 °C). Los sedimentos se disolvieron suavemente en tampón B (0.1 M NaCl, 0.01 M tampón de fosfato; pH 6.8) al que se añadió fluoruro de fenilmetilsulfonilo 0.001 M. El material insoluble se eliminó mediante centrifugación a baja velocidad (5,000 g, 5 min, 48 °C) y las suspensiones se ultra centrifugaron (70,000 g, 60 min, 48 °C).	<p>Las partículas de la cabeza del fago estaban compuestas por una subunidad de proteína principal de aproximadamente 40 kDa y dos subunidades menos importantes de aproximadamente 50 y 34 kDa.</p> <p>La actividad bactericida de <i>X. nematophilus</i> contra las bacterias estrechamente relacionadas mencionadas anteriormente se debe a la xenorhabdicina purificada.</p>	Thaler, J. O., Baghdiguan, S., & Boemare, N. (1995). Purification and characterization of xenorhabdicolin, a phage tail-like bacteriocin, from the lysogenic strain F1 of <i>Xenorhabdus nematophilus</i> . <i>Applied and Environmental Microbiology</i> , 61(5), 2049-2052.
<i>Xenorhabdus nematophila</i> YL001	Se cultivó inoculando una colonia crecida en medio sólido NBTA en un matraz de 250 mL que contenía caldo nutritivo, pH 7.2, 28 °C, agitación 180 rpm durante 24 h, Densidad óptica 1.50-2.0	Ensayo zona de inhibición. Discos 6 mm (papel Whatman 3MM) con 60 µL de sobrenadante incubados a 28 °C durante 48 h. Probados contra seis bacterias <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Bacillus thuringiensis</i> , <i>Bacillus cereus</i> , <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>actinidiae</i> , <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>Oryzae</i> and <i>Erwinia carotovora</i> subsp. <i>Carotovora</i> .	Los cultivos se centrifugaron (12,000 g, 20 min, 4 °C) mezclando el caldo de cultivo con tres veces el volumen de acetato de etilo.	La actividad antibacteriana se expresó como unidades de actividad por mL de los sobrenadantes, donde 1 U se definió como una limpieza anular de 1,0 mm alrededor del disco de antibiótico. El caldo de cultivo mostro actividad contra <i>B. subtilis</i> , con un pH de 8.5 mostrando actividad de 3.3 a 3.9 U / mL.	Guo, S., Zhang, S., Fang, X., Liu, Q., Gao, J., Bilal, M., ... & Zhang, X. (2017). Regulation of antimicrobial activity and xenocoumactins biosynthesis by pH in <i>Xenorhabdus nematophila</i> . <i>Microbial cell factories</i> , 16(1), 1-14.

Cepa	Producción	Ensayo de actividad antibacteriana	Recuperación	Resultados	Referencia
<i>Xenorhabdus nematophila</i> YL001	Se cultivó una sola colonia de <i>X. nematophila</i> YL001 en un matraz de 250 mL que contenía 100 mL de medio fresco Luria-Bertani (LB)	Se optimizaron seis condiciones de fermentación, como la cantidad de semilla, la carga de líquido, el pH inicial, la velocidad de rotación de la mesa de agitación, la temperatura y el período de fermentación, para determinar las condiciones óptimas de fermentación para mejorar la producción de Xenocumacina 1 (Xcn1) en un factor a la vez.		El resultado indicó que la producción de Xcn1 en las condiciones óptimas de fermentación alcanzó 173.99 µg/mL, que fue 3.43 veces más que en las condiciones originales (medio TSB).	Han, Y., Gao, J., Zhang, S., Han, J., Yan, Z., Ta, Y., & Wang, Y. (2021). Increasing the Production of Xenocoumacin 1 by Optimizing the Fermentation Process of <i>Xenorhabdus nematophila</i> .
	Se incubó durante 48 h a 28 °C con agitación continua de 180 rpm				
<i>Xenorhabdus nematophila</i> YL001	Un asa de fase I X. <i>nematophila</i> YL001 de un cultivo de 72 h que crece en una placa NBTA (Nutrient Blue Tretrasodium Agar) en un Matraz de 250 mL que contiene 50 mL de medio YSG (Yeast, Starch, Glucose) fresco	Ensayo de placa de difusión en agar con <i>B. subtilis</i>	Microfiltración (100 µL), utilizando un microfiltro de jeringa de 0.22 µm	Los resultados indicaron que el caldo PP3 modificado (Proteosa Peptona nº3, 20 g/L; NaCl, 10 g/L) mostró una actividad antibiótica máxima (253,3 U/mL) seguido del caldo PP3 (246,7 U/mL) y el medio YSG (243,3 U/mL), y las actividades antibióticas no tuvieron diferencias significativas	Wang, Y. H., Li, Y. P., Zhang, Q., & Zhang, X. (2008). Enhanced antibiotic activity of <i>Xenorhabdus nematophila</i> by medium optimization. <i>Bioresource Technology</i> , 99(6), 1708-1715.
	Los matraces se incubaron a 25 °C en un agitador rotatorio Eberbach a 150 r/min durante 18 a 24 h, donde la DO (600nm) fue de 2 y pH 7	Los discos secos se colocaron en la placa NA (Nutrient Agar) y se incubaron a 28 °C durante 24 h para determinar la relación entre el tamaño de las zonas de crecimiento bacteriano inhibido y la concentración del antibiótico.			

## 1.12 Referencias

- Akhurst, R. (1980). Morphological and functional dimorphism in *Xenorhabdus* spp., bacteria symbiotically associated with the insect pathogenic nematodes *Neoaplectana* and *Heterorhabditis*. *Microbiology*, 121(2), 303-309.
- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., & Lipman, D. J. (1990). Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*, 215(3), 403-410. doi:10.1016/s0022-2836(05)80360-2
- Beshkova, D., & Frengova, G. (2012). Bacteriocins from lactic acid bacteria: microorganisms of potential biotechnological importance for the dairy industry. *Engineering in Life Sciences*, 12(4), 419-432.
- Bode, H. B. (2009). Entomopathogenic bacteria as a source of secondary metabolites. *Current opinion in chemical biology*, 13(2), 224-230.
- Boemare, N., & Akhurst, R. (2006). The Genera *Photorhabdus* and *Xenorhabdus*. In M. Dworkin, S. Falkow, E. Rosenberg, K.-H. Schleifer, & E. Stackebrandt (Eds.), *The Prokaryotes: A Handbook on the Biology of Bacteria Volume 6: Proteobacteria: Gamma Subclass* (pp. 451-494). New York, NY: Springer New York.
- Burnell, A., & Stock, S. P. (2000). *Heterorhabditis*, *Steinernema* and their bacterial symbionts—lethal pathogens of insects. *Nematology*, 2(1), 31-42.
- Camargo, A. C., Todorov, S. D., Chihib, N.-E., Drider, D., & Nero, L. A. (2018). Lactic acid bacteria (LAB) and their bacteriocins as alternative biotechnological tools to control *Listeria monocytogenes* biofilms in food processing facilities. *Molecular biotechnology*, 60(9), 712-726.
- da Silva, W. J., Pilz-Junior, H. L., Heermann, R., & da Silva, O. S. (2020). The great potential of entomopathogenic bacteria *Xenorhabdus* and *Photorhabdus* for mosquito control: a review. *Parasit Vectors*, 13(1), 376. doi:10.1186/s13071-020-04236-6
- Egan, K., Field, D., Rea, M. C., Ross, R. P., Hill, C., & Cotter, P. D. (2016). Bacteriocins: novel solutions to age old spore-related problems? *Frontiers in Microbiology*, 7, 461.
- Ennahar, S., Sashihara, T., Sonomoto, K., & Ishizaki, A. (2000). Class IIa bacteriocins: biosynthesis, structure and activity. *FEMS microbiology Reviews*, 24(1), 85-106.
- Ensign, J., & Ciche, T. (2000). *Release of Photorhabdus luminescens cells from infective juvenile nematodes of Heterorhabditis*. Paper presented at the 2nd US/Hungarian EPN/EPB Annual Meeting, Hungary.
- Fons, A. G., Tuomo Karjalainen, Michel. (2000). Mechanisms of colonisation and colonisation resistance of the digestive tract part 2: bacteria/bacteria interactions. *Microbial Ecology in Health Disease*, 12(2), 240-246.
- Forst, S., Dowds, B., Boemare, N., & Stackebrandt, E. (1997). *Xenorhabdus* and *Photorhabdus* spp.: bugs that kill bugs. *Annual review of microbiology*, 51(1), 47-72.

- Fuchs, S. W., Grundmann, F., Kurz, M., Kaiser, M., & Bode, H. B. (2014). Fabclavines: Bioactive Peptide–Polyketide–Polyamino Hybrids from *Xenorhabdus*. *ChemBioChem*, *15*(4), 512-516.
- Fuchs, S. W., Proschak, A., Jaskolla, T. W., Karas, M., & Bode, H. B. (2011). Structure elucidation and biosynthesis of lysine-rich cyclic peptides in *Xenorhabdus nematophila*. *Organic biomolecular chemistry*, *9*(9), 3130-3132.
- Garneau, S., Martin, N. I., & Vederas, J. C. (2002). Two-peptide bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *Biochimie*, *84*(5-6), 577-592.
- Gaugler, R., & Kaya, H. K. (1990). *Entomopathogenic nematodes in biological control* (Vol. 227): CRC press Boca Raton.
- Herrera, R. R., Preciado, G. M., Chávez, J. A. M., Castro, J. A. O., EscalanteMinakata, P., González, C. N. A., & Junquera, V. I. (2013). Bacteriocinas: características y aplicación en alimentos. *Investigación y Ciencia*, *21*(59), 64-70.
- Hinchliffe, S. J., Hares, M. C., & Dowling, A. J. (2010). Insecticidal toxins from the *Photorhabdus* and *Xenorhabdus* bacteria. *The Open Toxinology Journal*, *3*(1).
- Hou, Q., Bai, X., Li, W., Gao, X., Zhang, F., Sun, Z., & Zhang, H. (2018). Design of Primers for Evaluation of Lactic Acid Bacteria Populations in Complex Biological Samples. *Front Microbiol*, *9*, 2045. doi:10.3389/fmicb.2018.02045
- Joyce, S. A., Brachmann, A. O., Glazer, I., Lango, L., Schwär, G., Clarke, D. J., & Bode, H. B. (2008). Bacterial biosynthesis of a multipotent stilbene. *Angewandte Chemie International Edition*, *47*(10), 1942-1945.
- Kaya, H., & Stock, S. (1997). Techniques in insect nematology. In: Academic Press, London.
- Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C., & Tamura, K. (2018). MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms. *Mol Biol Evol*, *35*(6), 1547-1549. doi:10.1093/molbev/msy096
- Laguna Fandiño, E. (2006). Biología del nematodo *Steinernema* sp. cepa CIAT25 (Nematoda: Steinernematidae) y su bacteria simbiote.
- Lang, G., Kalvelage, T., Peters, A., Wiese, J., & Imhoff, J. F. (2008). Linear and cyclic peptides from the entomopathogenic bacterium *Xenorhabdus nematophilus*. *Journal of natural products*, *71*(6), 1074-1077.
- Londoño, N. A., Taborda, M. T., López, C. A., & Acosta, L. V. (2015). Bacteriocinas producidas por bacterias ácido lácticas y su aplicación en la industria de alimentos. *Alimentos hoy*, *23*(36), 186-205.
- Núñez, M., Tomillo, J., Gaya, P., & Medina, M. (1996). Bacteriocin quantification by the critical dilution method: a comparison of arbitrary units with diameter and area of the zone of growth inhibition. *Milchwissenschaft (Germany)*.
- Peng, X., Yu, K. Q., Deng, G. H., Jiang, Y. X., Wang, Y., Zhang, G. X., & Zhou, H. W. (2013). Comparison of direct boiling method with commercial kits for extracting fecal microbiome DNA by Illumina sequencing of 16S rRNA tags. *J Microbiol Methods*, *95*(3), 455-462. doi:10.1016/j.mimet.2013.07.015
- Reimer, D., Cowles, K. N., Proschak, A., Nollmann, F. I., Dowling, A. J., Kaiser, M., Bode, H. B. (2013). Rhabdopeptides as insect-specific virulence factors from entomopathogenic bacteria. *ChemBioChem*, *14*(15), 1991-1997.

- Reimer, D., Luxenburger, E., Brachmann, A. O., & Bode, H. B. (2009). A new type of pyrrolidine biosynthesis is involved in the late steps of xenocoumacin production in *Xenorhabdus nematophila*. *ChemBioChem*, *10*(12), 1997-2001.
- Sáenz, A. (2005). Importancia de los nemátodos entomopatógenos para el control biológico de plagas en palma de aceite. *Revista Palmas*, *26*(2), 41-57.
- Saitou, N., & Nei, M. (1987). The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular biology and evolution*, *4*(4), 406-425.
- Sergeant, M., Baxter, L., Jarrett, P., Shaw, E., Ousley, M., Winstanley, C., & Morgan, J. A. (2006). Identification, typing, and insecticidal activity of *Xenorhabdus* isolates from entomopathogenic nematodes in United Kingdom soil and characterization of the xpt toxin loci. *Appl Environ Microbiol*, *72*(9), 5895-5907. doi:10.1128/AEM.00217-06
- Shi, Y.-M., & Bode, H. B. (2018). Chemical language and warfare of bacterial natural products in bacteria–nematode–insect interactions. *Natural product reports*, *35*(4), 309-335.
- Szallas, E., Koch, C., Fodor, A., Burghardt, J., Buss, O., Szentirmai, A., . . . Stackebrandt, E. (1997). Phylogenetic evidence for the taxonomic heterogeneity of *Photorhabdus luminescens*. *International Journal of Systematic Evolutionary Microbiology* *47*(2), 402-407.
- Tobias, N. J., Mishra, B., Gupta, D. K., Sharma, R., Thines, M., Stinear, T. P., & Bode, H. B. (2016). Genome comparisons provide insights into the role of secondary metabolites in the pathogenic phase of the *Photorhabdus* life cycle. *BMC genomics*, *17*(1), 1-11.
- Wang, J., & Bedding, R. (1996). Population development of *Heterorhabditis* bacteriophora and *Steinernema carpocapsae* in the larvae of *Galleria mellonella*. *Fundamental Applied Nematology*, *19*(4), 363-368.
- Yang, R., Johnson, M., & Ray, B. (1992). Novel method to extract large amounts of bacteriocins from lactic acid bacteria. *Applied and environmental microbiology*, *58*(10), 3355-3359.



---

# CAPÍTULO 2

---

**Caracterización y purificación de péptidos antimicrobianos producidos por el fenotipo 1 de *Xenorhabdus nematophila*.**



## 2.1 Introducción

Los nemátodos entomopatógenos NEP pueden atacar a un gran número de insectos a quienes causan la muerte en un tiempo corto, una vez dentro de los insectos huéspedes logran una fácil y masiva multiplicación. Los NEP que han mostrado mejores resultados respecto al control biológico de plagas pertenecen a las familias *Steinernematidae* y *Heterorhabditidae*, que están asociados con bacterias de los géneros *Xenorhabdus* y *Photorhabdus*, respectivamente, las cuales ocasionan septicemia (condición mórbida causada por la invasión y multiplicación de microorganismos en la sangre) (Sáenz, 2005).

Estas especies bacterianas han sido objeto de investigaciones por poseer genes que son capaces de codificar toxinas de bajo peso molecular, metabolitos con actividad insecticida (Bacteriocinas), antibiótico, antifúngicos y antiparasitario (da Silva, Pilz-Junior, Heermann, & da Silva, 2020)

Las bacteriocinas son péptidos sintetizados ribosómicamente de bajo peso molecular, catiónicos, anfifílicos o hidrófobos, secretados por las células para matar a otras células competidoras (Field, Ross, & Hill, 2018). Entre las ventajas podemos encontrar que son reconocidas como sustancias seguras, no son tóxicas para células eucariotas, se inactivan por las proteasas digestivas, son tolerantes a pH bajos y termorresistentes, tienen amplio espectro contra bacterias patógenas entre otras (Gálvez, Abriouel, López, & Omar, 2007).

En los años recientes *Xenorhabdus*, ha sido estudiada debido a los metabolitos producidos durante su fase de desarrollo. En la fase primaria se han caracterizado

4 grupos químicos: derivados de indol, xenorridos, xenorhabdinas y xenocumacinas, a pesar de que algunos de estos grupos muestran estructuras simples, se ha demostrado que presentan una gran diversidad en cuanto a su actividad biológica (Bode, 2009; Boemare & Akhurst, 2006).

## 2.2 Materiales y Métodos

### 2.2.1 Medios de cultivo

Para la extracción de la bacteria se utilizó caldo de soya tripticaseína (STB por sus siglas en inglés). En el crecimiento selectivo y diferencial de la variante primaria (F1) de *Xenorhabdus* se utilizó Nutrient blue tetrasodium agar (NBTA). Para la activación de los microorganismos patógenos se utilizó caldo Infusión Cerebro Corazón (BHI) (Bioxon México). Para las pruebas antimicrobianas, se utilizó BHI - agar suave y para la llevar a cabo los ensayos de Concentración Mínima Inhibitoria (MIC) se utilizó caldo BHI (Bioxon México) para activar los microorganismos indicadores patógenos. Todos los medios de cultivo se prepararon con agua destilada y fueron sometidos a esterilización a 121°C durante 20 min en autoclave (AESA).

### 2.2.2 Microorganismos

Para la producción se emplearon nemátodos de la familia *Steinernematidae* y se utilizaron larvas de *Galleria mellonella* de 4º estadio; como la bacteria simbionte fue *Xenorhabdus nematophila*, para evaluar la actividad antimicrobiana se usaron *L. monocytogenes* CFQ-103, *S. aureus* ATCC-25923 y *E. coli* ATCC-25922 proporcionadas por el Cepario de la Facultad de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México, a través de la Dra. Gloria Ruiz Díaz. Todas las cepas bacterianas se almacenan a -80 °C en viales de conservación de 2 mL, con 1.5 mL de caldo nutritivo con crecimiento bacteriano de 24 h mezclado con glicerol al 25 % v/v.

### 2.2.3 Producción de nemátodos entomopatógenos

Se utilizaron larvas de *G. mellonella* de 4º estadio, para ello, se prepararon cámaras de inoculación, constituidas por cajas Petri de 100 x 15 mm marca Pyrex® con discos de papel filtro estéril, donde se colocaron 5 larvas de *G. mellonella* y se inocularon con una suspensión de IJ con concentración 1000 IJ/ Larva (Fig. 5). Se almacenaron en un desecador a temperatura ambiente, hasta lograr la infección de las larvas.



**Figura 5** Larvas de *G. mellonella* inoculadas con IJ a una concentración de 1000 IJ/larva

Las larvas muertas por infección de nemátodos muestran cambios en su fisiología, principalmente cambio de pigmentación (color marrón parcial). Estas larvas se colocaron en trampas White (Fig. 6) (Kaya & Stock, 1997), las cuales fueron almacenadas en un desecador a temperatura ambiente hasta la emergencia de los IJ y su posterior migración hacia el agua, logrando así la cosecha.



**Figura 6** Trampa White con larvas infectadas

Las cosechas de nemátodos se realizaron recolectando el agua de la caja Petri. La suspensión de IJ se colocó en tubos de centrifuga marca Corning® de 50 mL estériles. En promedio, se realizaron de 3 a 4 cosechas en intervalos de tiempo cada 4 días aproximadamente.

A los nemátodos recolectados en la cosecha se les realizaron dos enjuagues con agua destilada estéril (ADE). Los enjuagues se realizaron de la siguiente manera:

El volumen inicial de la suspensión de nemátodos se aforó a 50 mL con ADE, se dejaron sedimentar por gravedad (los nemátodos se aglomeran en el fondo del tubo), posteriormente, se retiró el agua sobrenadante y se llevó a un volumen final de 10 mL, para después almacenar en refrigeración a 8 °C.

## **2.2.4 Cuantificación de nemátodos y concentración**

Se tomó una alícuota de 100  $\mu$ L, distribuida en 5 gotas sobre un portaobjetos. Con ayuda de un microscopio tipo estereoscopio (Leica Zoom <sup>TM</sup>2000, Buffalo NY USA) se contabilizaron los IJ para determinar la concentración de nemátodos en la suspensión. Posteriormente, se ajustó a un volumen de 10 mL con una concentración de 1000 IJ/mL.

## **2.2.5 Esterilización superficial de los IJ**

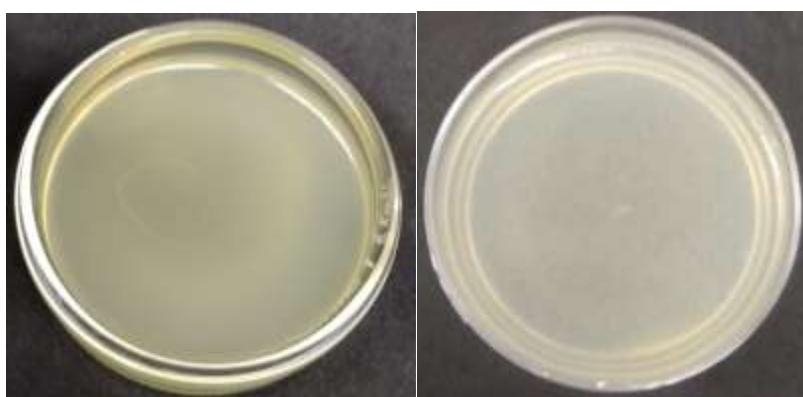
Se empleó una solución de cloruro de bencetonio. Una vez recolectados y realizado el enjuague inicial de JI, se adicionó 0.1mL de cloruro de bencetonio con una concentración 10% (p/v) mas 9.9 mL de la suspensión de IJ y se sometió a agitación mecánica durante 10 min en movimiento suave (aprox. 30 rpm) con ayuda de un agitador de laboratorio (Lab-Line bi-directional rotator, Dubuque, Iowa USA.) Para lograr abarcar la mayor superficie de contacto, luego, se adicionó 30 mL de ADE y se dejó sedimentar los IJ hasta observar la mayoría en el fondo, finalmente se retiró el agua hasta un volumen final de 5 mL.

Posteriormente, se realizaron dos enjuagues para lo cual se adicionaron 25 mL de ADE y se dejaron sedimentar hasta observar la mayoría en el fondo del tubo, finalmente, se retiró el agua sobrenadante hasta un volumen final de 5 mL, repitiendo los pasos anteriores para el segundo enjuague, con la diferencia que en este último enjuague el volumen final fue de 10 mL.

### 2.2.6 Prueba de esterilidad superficial de IJ

Se tomó una alícuota de 100 mL de la suspensión de IJ y se colocó sobre placas de medio de cultivo agar extracto de levadura y agar nutritivo (Fig.7), extendiendo la muestra con ayuda de un asa de Drigalski.

Las placas se incubaron a 30 °C, si no hay crecimiento de microorganismos en un tiempo mínimo de 48 h se puede confirmar que la sanitización superficial fue exitosa.



**Figura 7** Medio de cultivo sólido. Izq.) Agar extracto de levadura Der.) Agar nutritivo.

### 2.2.7 Extracción de la bacteria simbiote

Se utilizaron IJ frescos y estériles. Se tomó una alícuota de 100  $\mu$ L de la suspensión de nemátodos esterilizados, la cual se colocó en un segmento de un portaobjetos excavado y con ayuda de un microscopio tipo estereoscopio (Leica Zoom <sup>TM</sup>2000, Buffalo NY USA) y un asa bacteriológica con terminación en punta, se fueron colocando uno a uno los IJ hasta completar 10 individuos sobre una gota de caldo

STB, la cual se colocó sobre el fondo de la base de una caja Petri estéril de 60 x 15 mm

Con un microscopio tipo estereoscopio (Leica Zoom <sup>TM</sup>2000, Buffalo NY USA) y con ayuda de un bisturí estéril, se trozaron los IJ para liberar la bacteria contenida en su tracto digestivo (Fig.8). A la base de la caja Petri con la gota de STB y los IJ troceados se adicionaron 10 mL de caldo STB cuyo pH era de 7, finalmente se llevó a incubación en oscuridad a 30 °C durante 24 h.



**Figura 8** Representación del corte transversal de nemátodos IJ con ayuda de un bisturí.

Después de 24 h se midió pH y se realizó tinción Gram para verificar crecimiento y morfología.

### **2.2.8 Identificación genética**

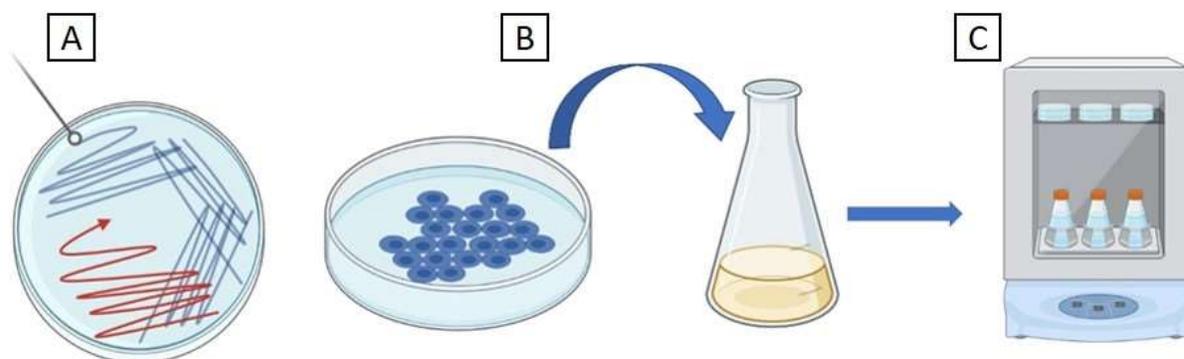
Se realizó mediante biología molecular, el ADN se extrajo con base a lo reportado por (Peng et al., 2013). Se desarrolló la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de amplificación de ADN en un termociclador, la identificación del genotipo de la cepa bacteriana se efectuó mediante el análisis de la secuencia del gen ARNr 16S usando 27F (Forward) y 1492R (Reverse) primers (Hou et al., 2018). Después, se realizó electroforesis de ADN en gel de agarosa al 1.5 % para confirmar la presencia y/o ausencia de ADN, finalmente, se purificó la banda de ADN con Wizard® plus maxipreps DNA purification system. La identificación bacteriana mediante secuenciación del ARNr 16S se realizó utilizando la química BigDye Terminator v3.1 y la secuenciación se realizó en sistema multicapilar automático con el equipo AB3730. La secuencia de 1462 pb obtenida por la amplificación del 16S rRNA se le hizo un alineamiento en Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) (Altschul, Gish, Miller, Myers, & Lipman, 1990). La historia evolutiva se infirió utilizando el método Neighbor-Joining (Saitou & Nei, 1987) usando el software MEGA X (Kumar, Stecher, Li, Knyaz, & Tamura, 2018).

### **2.2.9 Producción y purificación de metabolitos secundarios**

Se llevó a cabo una fermentación partiendo de una colonia con las características del fenotipo I de *Xenorhabdus* crecida en medio de cultivo agar NBTA (colonias circulares de color azul), esta se colocó dentro de un matraz Erlenmeyer Pyrex® de 500 mL con un volumen de 25 mL de medio de cultivo caldo STB, se incubó a 30

°C y 130 rpm durante 24 h, cumplidas las 24 h se realizó un segundo pase, esta vez con un 1% del inóculo del caldo de cultivo de 24 h en un matraz Erlenmeyer Pyrex® de 500 mL, y se incubó a 30 °C y 130 rpm hasta alcanzar una densidad óptica (DO) de 0.8-0.9 a 630 nm (Fig.9).

Una vez alcanzada la DO se inócula al 1% con el caldo de cultivo 50 mL de medio de cultivo STB contenido en un matraz Erlenmeyer Pyrex de 500 mL, el cual se incubó en oscuridad a 30 °C y 130 rpm durante 48 h. Esto se realizó con 6 repeticiones y 3 réplicas.



**Figura 9** Representación producción de metabolitos secundarios producidos a partir de una colonia de la variante primaria (F1) de *xenorhabdus* en medio de cultivo sólido agar NBTA. A) Siembra por estría de variante primaria (F1) de *xenorhabdus* sobre medio de cultivo agar NBTA. B) Se inoculó con una colonia un matraz Erlenmeyer con 50 mL de caldo STB. C) Se incubó a 30 °C, 130 rpm 48 h.

### 2.2.10 Purificación de metabolitos secundarios por la técnica adsorción desorción

Yang, et al., (1992) desarrollaron un tratamiento alternativo basado en la propiedad de las bacteriocinas producidos por bacterias lácticas que son asiduamente

adsorbidas en las células de las cepas productoras. Si se ajusta el pH del caldo de cultivo de una cepa productora, después de un tratamiento térmico para inactivar la función biológica de las células, a un valor al que ocurre la adsorción en niveles máximos de la bacteriocina a la superficie celular (comúnmente pH 6), se facilita una separación de las moléculas (adsorbidas en las células) del caldo de cultivo por centrifugación. Después, los péptidos son liberados de las células a pH bajos (1.5 – 2). Este método expone una técnica que es capaz de obtener péptidos en forma más concentrada.

La técnica se llevó a cabo en dos etapas, la primera de adsorción a la membrana celular se realizó de la siguiente manera:

Se distribuyó el caldo de fermentación en frascos de scotch de 50 mL estériles y se ajustó el pH a 6.5, la muestra se sometió a baño térmico durante 25 min a 70 °C, posteriormente, se sometió a agitación en un agitador de laboratorio a 30 rpm por 2 h, se centrifugó por 30 min a 8500 rpm y 4 °C. Posteriormente, se retiró el sobrenadante en tubos de centrifuga de 50 mL estériles, al pellet pegado en el tubo se re suspendió con 25 mL de buffer de fosfatos pH 6.5, después, se realizaron dos lavados con buffer de fosfatos pH 6.5, el pellet de células se sometió a la etapa de desorción, la cual consta de realizar un enjuague al pellet de células con NaCl 100 mM, pH 2, se realizó una centrifugación por 30 min a 8500 rpm a 4 °C para obtener el sobrenadante conteniendo la Sustancia inhibitoria parecida a bacteriocina (BLIS, por sus siglas en inglés) del proceso de purificación.

### **2.2.11 Cuantificación proteica Nanodrop**

La BLIS se sometió a un proceso de cuantificación proteica la cual se realizó en un espectrofotómetro (Thermo Scientific *NanoDrop* 2000c). Este equipo permite realizar medidas de espectrofotometría en un amplio rango de longitudes de onda (220-750 nm) con exactitud y reproducibilidad. Requiere un volumen de muestra de 1-2  $\mu\text{L}$  y debido a su pequeño tamaño y fácil manejo permite medir un gran número de muestras en poco tiempo.

Volúmenes en función del tipo de muestra:

- ✓ Soluciones acuosas de ácidos nucleicos: 1 $\mu\text{L}$
- ✓ Proteínas purificadas: 2 $\mu\text{L}$
- ✓ Método de Bradford, BCA o Lowry: 2 $\mu\text{L}$
- ✓ Suspensiones celulares: 1-2  $\mu\text{L}$

### **2.2.12 Prueba de inhibición por gota**

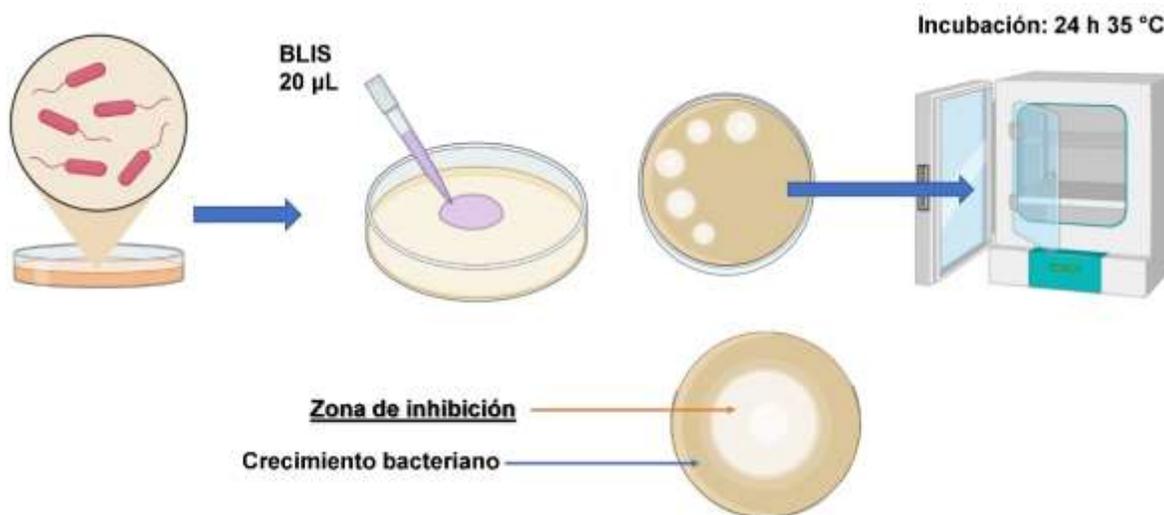
La cuantificación de la actividad de la bacteriocina en los fluidos sobrenadantes de los cultivos productores de bacteriocinas se puede realizar usando medios líquidos o sólidos, generalmente siendo preferidos los sólidos.

El método de dilución crítica es el procedimiento más utilizado para cualificar la actividad bacteriocina en medios sólidos. En la técnica de “mancha en el césped”, se esparcen gotas uniformes (5-10  $\mu\text{L}$ ) sobre un césped del organismo indicador (Nuñez, Tomillo, Gaya, & Medina, 1996).

La actividad bacteriocina en filtrados de cultivo se ha informado ocasionalmente indicando el diámetro o el área de la zona de inhibición del crecimiento correspondiente al filtrado sin diluir.

Esta prueba se llevó a cabo con 3 microorganismos patógenos de interés económico como lo son *L. monocytogenes*, *S. aureus* y *E. coli*. Siguiendo la metodología propuesta por (Nuñez et al., 1996), se llevó a cabo de la siguiente manera:

En un vial de 8 mL se colocaron 5 mL de caldo STB estéril y se inóculo al 1% con el microorganismo indicador se incubaron a 35 °C durante 24 h. Se preparó en tubos de ensaye con tapa de rosca 10 mL de agar BHI-suave y se esterilizó en autoclave a 15 PSI, temperatura de 121 °C durante 15 min. Se agregaron 58 µL del microorganismo patógeno indicador (previamente activada) en el tubo de ensaye con medio de cultivo y se vertió en cajas Petri estériles. Una vez sólido el agar se adicionaron 10 µL de cada sobrenadante obtenido en el proceso adsorción desorción (Caldo de fermentación, Lavado 1, Lavado 2, BLIS y Células), las gotas se dejaron en reposo en una campana de flujo laminar durante 40 min para posteriormente incubar la caja a 35 °C durante 24 h (Fig. 10). La actividad antimicrobiana se reportó en Unidades Arbitrarias (UA) por mL. Se considera una UA, en la cual se obtendrá un halo claro de inhibición (Nuñez et al., 1996).



**Figura 10** Representación prueba de inhibición por gota o mancha en césped

### 2.2.13 Evaluación de la concentración mínima inhibitoria (MIC)

Las técnicas de dilución en caldo, se utilizan para medir la actividad “*in vitro*” de un compuesto antimicrobiano frente a un cultivo indicador, estas se basan en la preparación de una serie de placas con caldo, a las cuales se les adiciona el compuesto antimicrobiano en distintas concentraciones, posteriormente se inoculan cada una de las placas con una suspensión estandarizada del microorganismo indicador, las pruebas se analizan después de incubar las placas y con los resultados se determina la MIC del compuesto antimicrobiano frente al microorganismo indicador (Wiegand, Hilpert, & Hancock, 2008). Para esta prueba se utilizaron placas ELISA (CORNING® Costar®) de 96 pozos (Fig.11).

#### 2.2.13.1 Medio de cultivo

Caldo de cultivo BHI para crecimiento de los 3 microorganismos indicadores (*Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* y *Escherichia coli*).

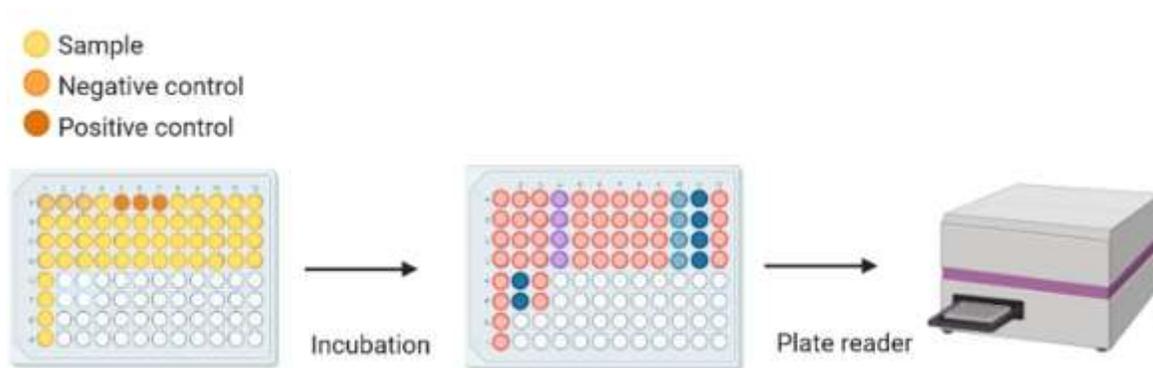
### 2.2.13.2 Inóculo del indicador

Cada microorganismo fue activado en medio BHI estéril, 5 mL del medio se inoculó con 50 µL de la suspensión bacteriana tomada de un vial de conservación, se incubaron a 35 °C durante 24 h pasado este tiempo se realiza un segundo pase a la misma concentración de inóculo esta vez el tiempo de incubación dependerá de cada microorganismo esperando alcanzar las concentraciones siguientes (Tabla 2) (Pérez-Arauz, Rodríguez-Hernández, del Rocío López-Cuellar, Martínez-Juárez, & Chavarría-Hernández, 2021):

**Tabla 2** Concentración de microorganismos después de 6 h de incubación.

Microorganismo indicador	UFC/mL
<i>L. monocytogenes</i> CFQ-103	$8.3 \times 10^8$
<i>S. aureus</i> ATCC-25923	$5.6 \times 10^8$
<i>E. coli</i> ATCC-25922	$4.45 \times 10^9$

Los 3 microorganismos indicadores se diluyeron, utilizando solución salina (NaCl 1% p/v) como diluyente para alcanzar una concentración final de  $4.4 \times 10^5$  UFC/mL, Para el control negativo, se adicionaron 20 µL de ADE + 200 µL de caldo BHI estéril, para el control positivo se colocaron 20 µL de caldo BHI estéril + 50 µL de la suspensión bacteriana ajustada ( $10^5$  UFC/mL) para cada microorganismo indicador más ADE, aforando a un volumen final de 220 µL/pozo.



**Figura 11** Esquema procedimiento MIC. Inicialmente se coloca la muestra junto con dos controles uno positivo y otro negativo, se llevan a incubación y durante este tiempo se realizan las mediciones de DO.

Una vez llenado los pozos se midió la absorbancia de la placa en un equipo AWERNEES Technology Inc (Stat Fax 2100) a una absorbancia de 630 nm correspondientes al tiempo 0, La placa ELISA fue puesta a incubación a 35 °C durante 24 h, midiendo la absorbancia bajo las mismas condiciones a los tiempos 20, 22, 24 h.

## 2.2.14 Caracterización de BLIS

### 2.2.14.1 Efecto de la temperatura

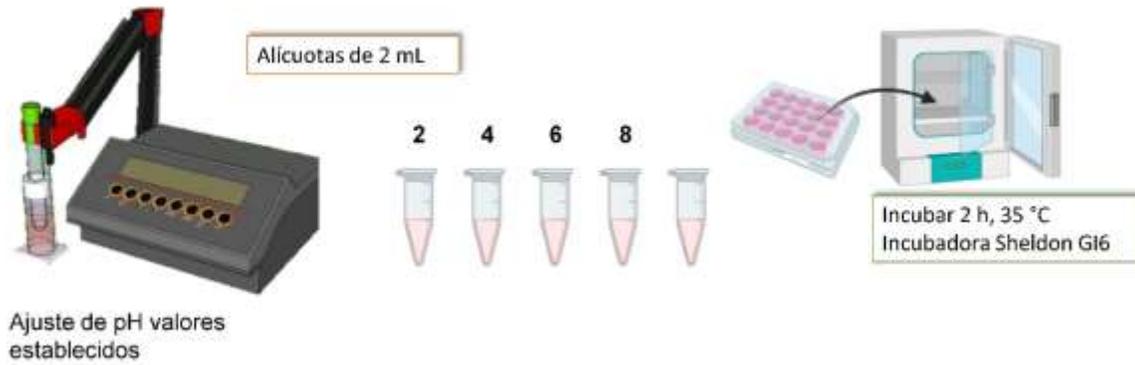
Para evaluar la estabilidad térmica, la BLIS se sometió a diversas temperaturas durante 10 min. Se tomaron muestras de 100 µL que fueron colocadas en tubos Eppendorf® de 2 mL estériles, se sometieron a temperaturas de 90, 100, 110, 120 y 130 °C durante 10 min en un thermoblock (Benchmark, Mod. BSH1002) (Fig.12), posteriormente, se evaluó la actividad antimicrobiana contra los tres microorganismos indicadores por el método de difusión en agar (Mimila-Méndez, 2017).



**Figura 12** Esquema tratamiento térmico BLIS. La muestra se coloca en tubos Eppendorf de 2 mL estériles, estos se someten a distintos intervalos de temperatura y tiempo en un thermoblock.

#### 2.2.14.2 Efecto del pH

El efecto del pH sobre la BLIS se evaluó ajustando el pH de la muestra en valores de 2, 4, 6 y 8, para ello se tomaron alícuotas de 2 mL (volumen necesario para cubrir el electrodo del potenciómetro), para acidificar se usó una solución de HCl [2 M] y para alcalinizar se usó NaOH [2 M], se incubaron las muestras durante 2 h a 35 °C en incubadora (Sheldon, GI6) (Fig. 13), una vez concluido el tiempo de incubación se ajustó nuevamente el pH a la neutralidad (pH 7) y se evaluó la actividad antimicrobiana contra los 3 microorganismos indicadores por el método de difusión en agar (Mimila-Méndez, 2017; Sánchez-Reyes, 2014). Se realizaron 3 repeticiones por muestra.



**Figura 13** Esquema efecto del pH sobre la BLIS

### **Análisis estadísticos**

Los resultados cuantitativos obtenidos se analizaron mediante análisis de varianza (ANOVA). Las medias se compararon por el método de Tukey con un intervalo de confianza de  $P < 0.05$ . Los análisis se ejecutaron con el programa estadístico Sigma Plot 12.0.

## 2.3 Resultados y discusión

### 2.3.1 Producción de IJ

Tres días después de haber incubado las cámaras de inoculación las larvas murieron por infección de nemátodos (Fig. 14), mostrando los signos característicos

Se obtuvieron 4 cosechas de IJ, dando un total de 158,400 individuos (Fig. 15 & 16),

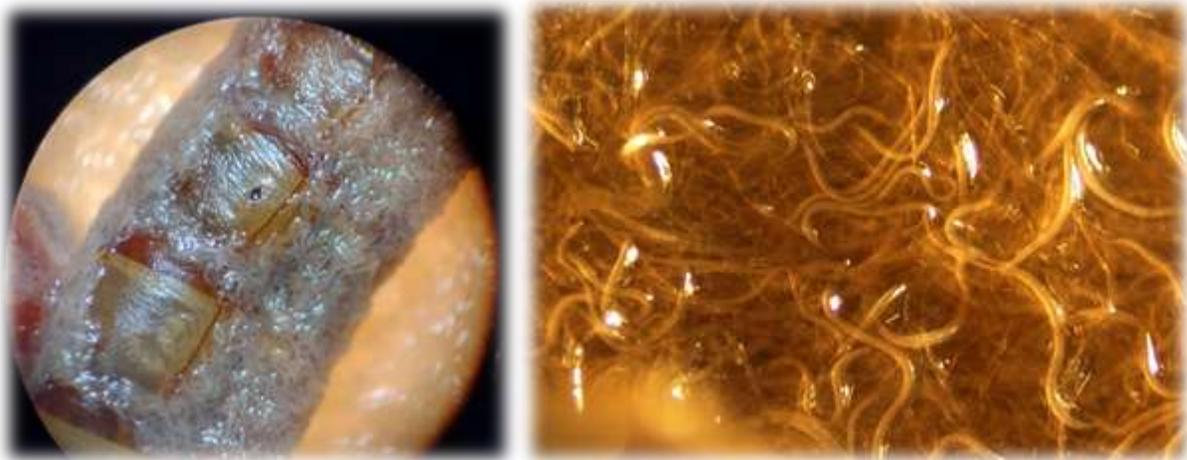
los cuales se sometieron a una sanitización superficial con cloruro de bencetonio.



**Figura 14** Larvas de *G. mellonella* en cámaras de inoculación.



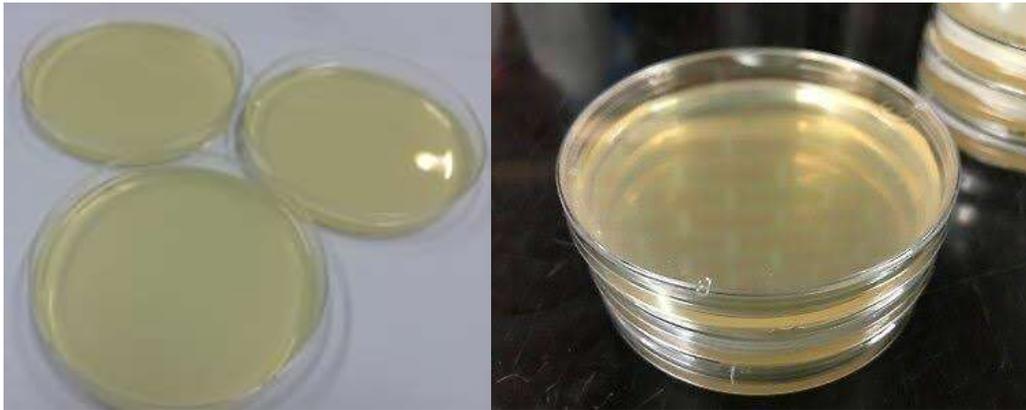
**Figura 15** Larvas de *Tenebrio molitor* durante producción la de IJ.



**Figura 16** A) Emergencia de IJ en larvas de *T. molitor*. B) IJ Vista microscopio aumento 40x.

### 2.3.2 Esterilización superficial de los IJ

El procedimiento realizado fue eficiente y se logró una esterilización exitosa, se constató que los medios de cultivo sólido inoculados con IJ, no presentaron crecimiento de microorganismos en un lapso de 5 días (Fig.17) y la viabilidad de los IJ contenidos en el medio fue de 100% (Fig. 18).



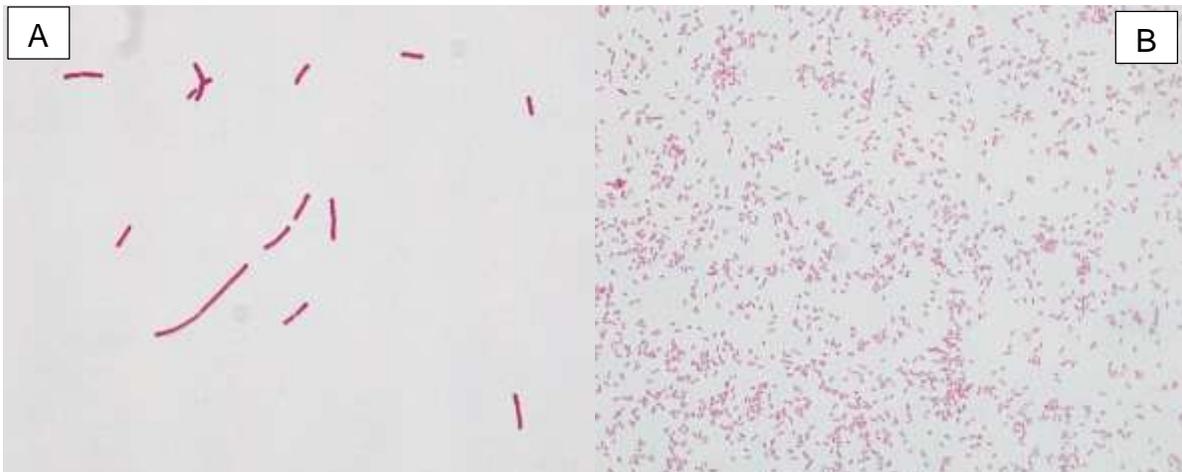
**Figura 17** Medio sólido después de 5 días después de la inoculación con la suspensión de IJ esterilizados.



**Figura 18** IJ inoculados sobre medio de cultivo agar extracto de levadura 5 días después de inoculación.

Para la extracción de la bacteria simbiote los IJ troceados y colocados en cajas Petri estériles de 60x15 mm con medio líquido STB fueron monitoreados durante su incubación, mostrando enturbiamiento a las 24 h. El monitoreo se realizó cada 3 h hasta que el cultivo alcanzara un pH de 8 o cercano a este valor.

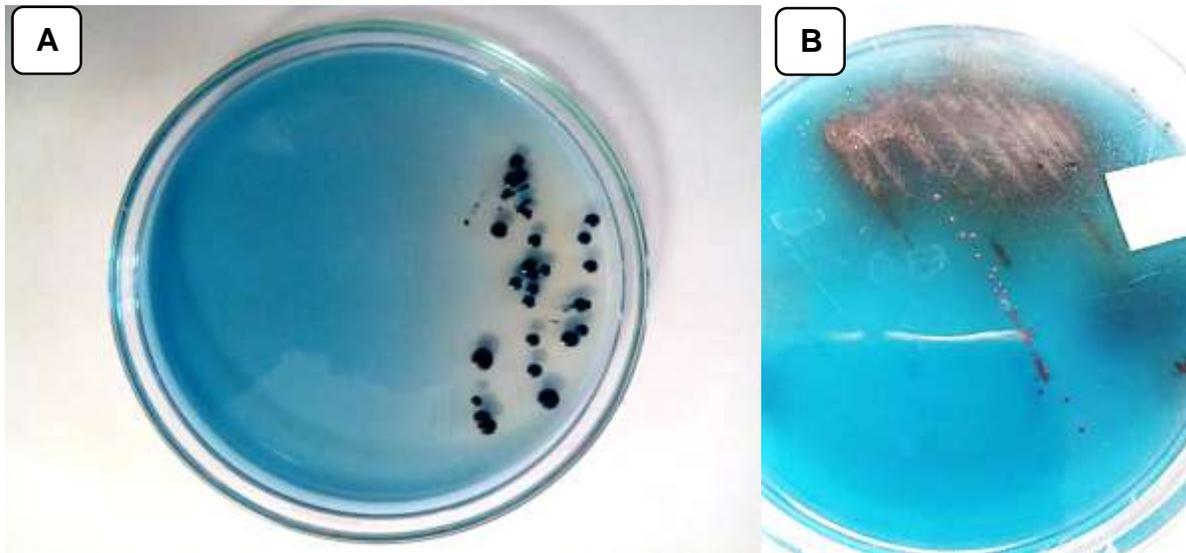
Durante el monitoreo se realizó la tinción Gram para verificar el cultivo. En todos los casos se observaron bacilos Gram negativos grandes de 2  $\mu\text{m}$  de tamaño y con abundantes formaciones de cadenas, lo que de acuerdo con la literatura podemos asegurar que se trató de la fase primaria de la bacteria, ya que la fase II son bacilos más cortos sin formación de cadenas (Figura 19).



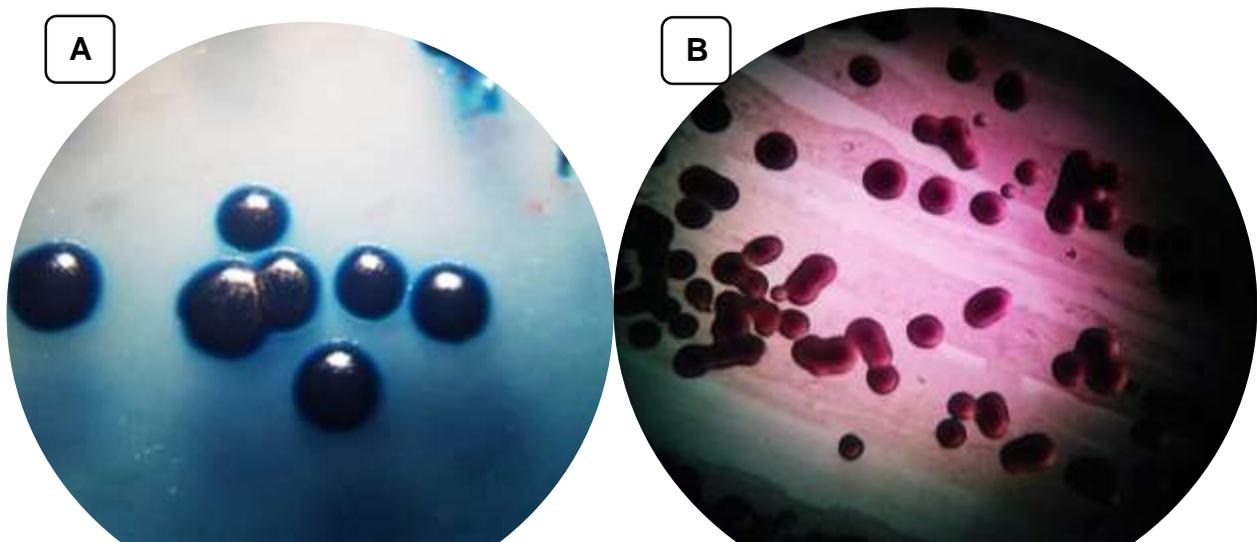
**Figura 19 A-** *Xenorhabdus* Fase I tiempo de cultivo 32h pH 8.0 **B-** *Xenorhabdus* Fase II tiempo de cultivo 32h. Aumento 1000x.

De igual forma se realizó una siembra por la técnica de agotamiento en agar NBTA para verificar el crecimiento. Obteniendo colonias azules para la fase I y colonias

rojas para la fase II (Fig.20). Macroscópicamente, se observa diferencia en los colores de las colonias y de igual forma se confirman fenotipos en el microscopio tipo estereoscopio (Figura 21) así como por la tinción Gram (Fig. 22).



**Figura 21** *Xenorhabdus* Medio de cultivo solido NBTA. **A**-Fase I **B**-Fase II



**Figura 20** Colonias de *Xenorhabdus* en medio de cultivo sólido NBTA.

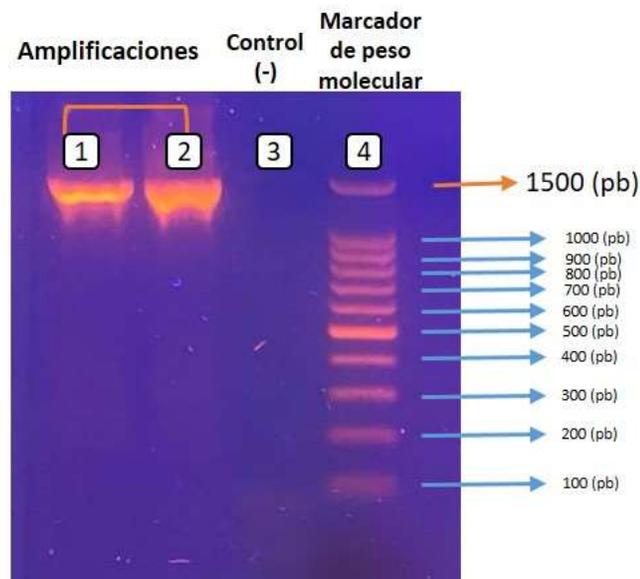
**A**-Fase I **B**-Fase II. Vista estereoscopio. Aumento 30x.



**Figura 22** Tinción Gram de colonias de *Xenorhabdus* crecidas en medio sólido NBTA vista microscopio. Aumento 1000x.

### 2.3.3 Identificación genética

Se procedió a desarrollar la identificación genética mediante 16s ribosomal. Una vez extraído el ADN se desarrolló la PCR y se realizó electroforesis de ADN en gel de agarosa para confirmar la presencia y/o ausencia de ADN; se logró amplificar un fragmento de 1500 pb (Fig. 23) que corresponde a lo esperado con base a los primers usados.



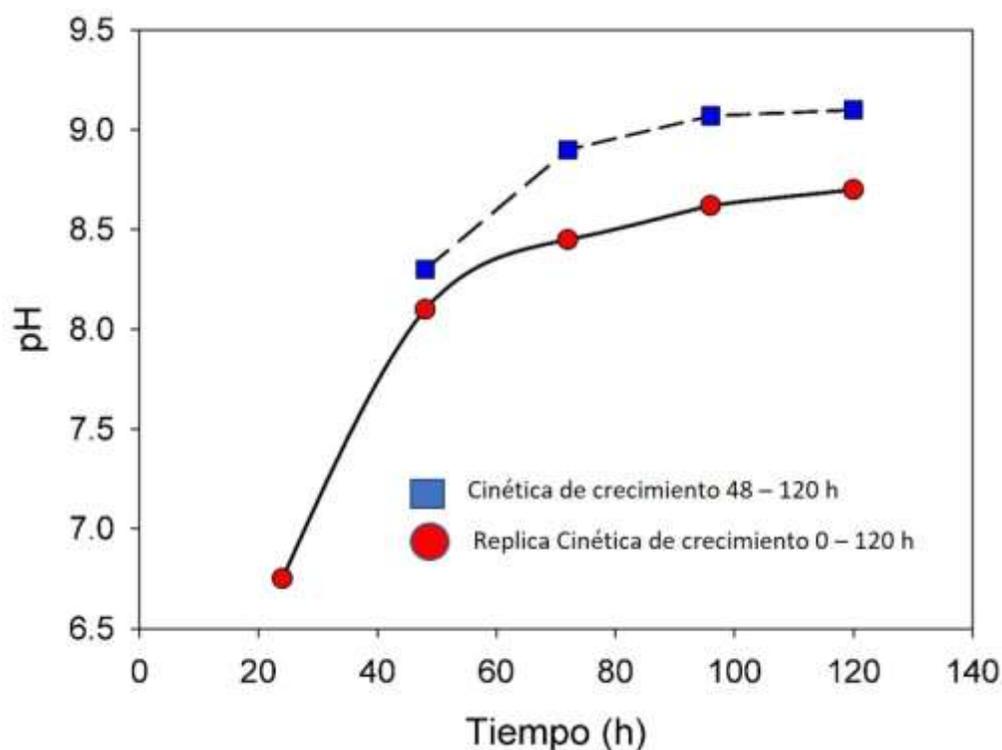
**Figura 23** Gel de agarosa 1.5%, carril 4 marcador de peso molecular, primera banda es de 1500 pb obtenida por la amplificación de 16s rRNA.

A la secuencia de 1500 pb obtenida por la amplificación del 16s rRNA se le hizo un alineamiento en el software BLAST, obteniendo un alineamiento con *Xenorhabdus nematophila* cepa FR241 secuencia parcial. El valor E obtenido fue de 0.0, con un porcentaje de identidad de 99.84 % y una cobertura de consulta del 100 %. Cuando el valor E es menor, más significativa es la coincidencia y por consiguiente el

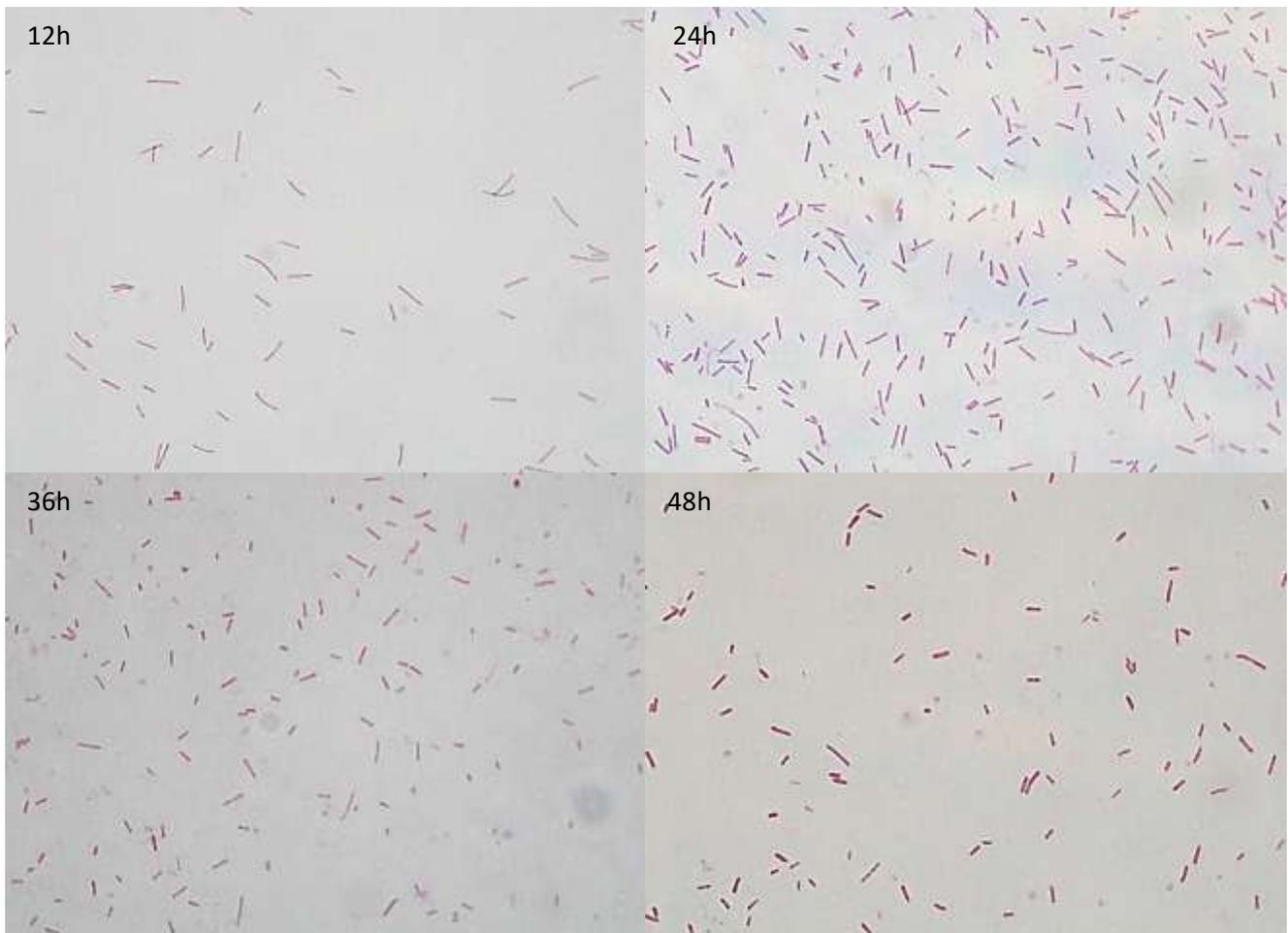
alineamiento, también un porcentaje de identidad mayor es más significativa la coincidencia; además, la cobertura de consulta fue del 100 % (Morgulis et al., 2008).

### 2.3.4 Producción y purificación de metabolitos secundarios

Para la purificación de metabolitos se realizó una cinética de crecimiento durante 48 h en el cual se tomó muestra cada 12 h y se sometió al protocolo de adsorción desorción. A cada muestra se le midió pH (Fig. 24) obteniendo el más alcalino 8.66 a las 48 h y se realizó tinción Gram a cada muestra (Fig. 25).



**Figura 24** Cinética de crecimiento de *Xenorhabdus nematophila*. Historial de pH durante la cinética.



**Figura 25** Tinción Gram de *Xenorhabdus* durante cinética de 48 h. Vista al microscopio. Aumento 1000x.

Posteriormente, se realizó una cinética de crecimiento de 120 h para verificar la producción de metabolitos secundarios, para ello, se realizaron muestreos cada 24 h, sometiendo la muestra a purificación de metabolitos, evaluando pH y densidad óptica, de igual forma se realizó tinción Gram y siembra en medio NBTA.

La Fig. 26 muestra el crecimiento exponencial debido a la multiplicación de bacterias, la Fig. 28 muestra tinción Gram de 5 muestreos realizados durante la cinética de crecimiento donde se identifica el fenotipo I durante las 120 h y en la Fig.27 se observan las colonias azules en medio NBTA, confirmando el fenotipo.

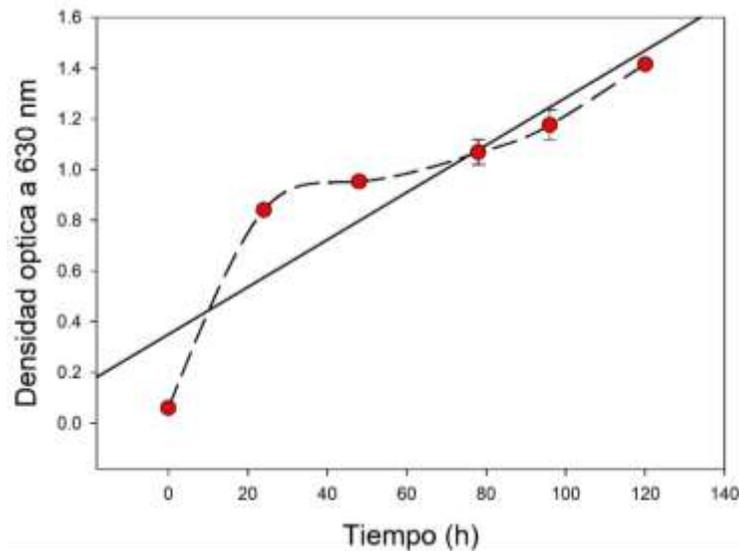


Figura 27.- Valores de densidad óptica obtenidos durante la cinética de crecimiento 120 h de *Xenorhabdus nematophila*.

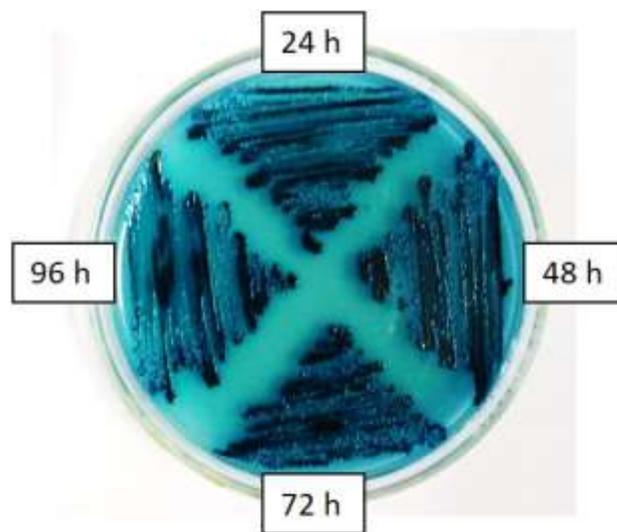


Figura 26.- Siembra de muestreos cinética de crecimiento de 120 h de *Xenorhabdus nematophila* realizados cada 24 h. Medio de cultivo agar NBTA.

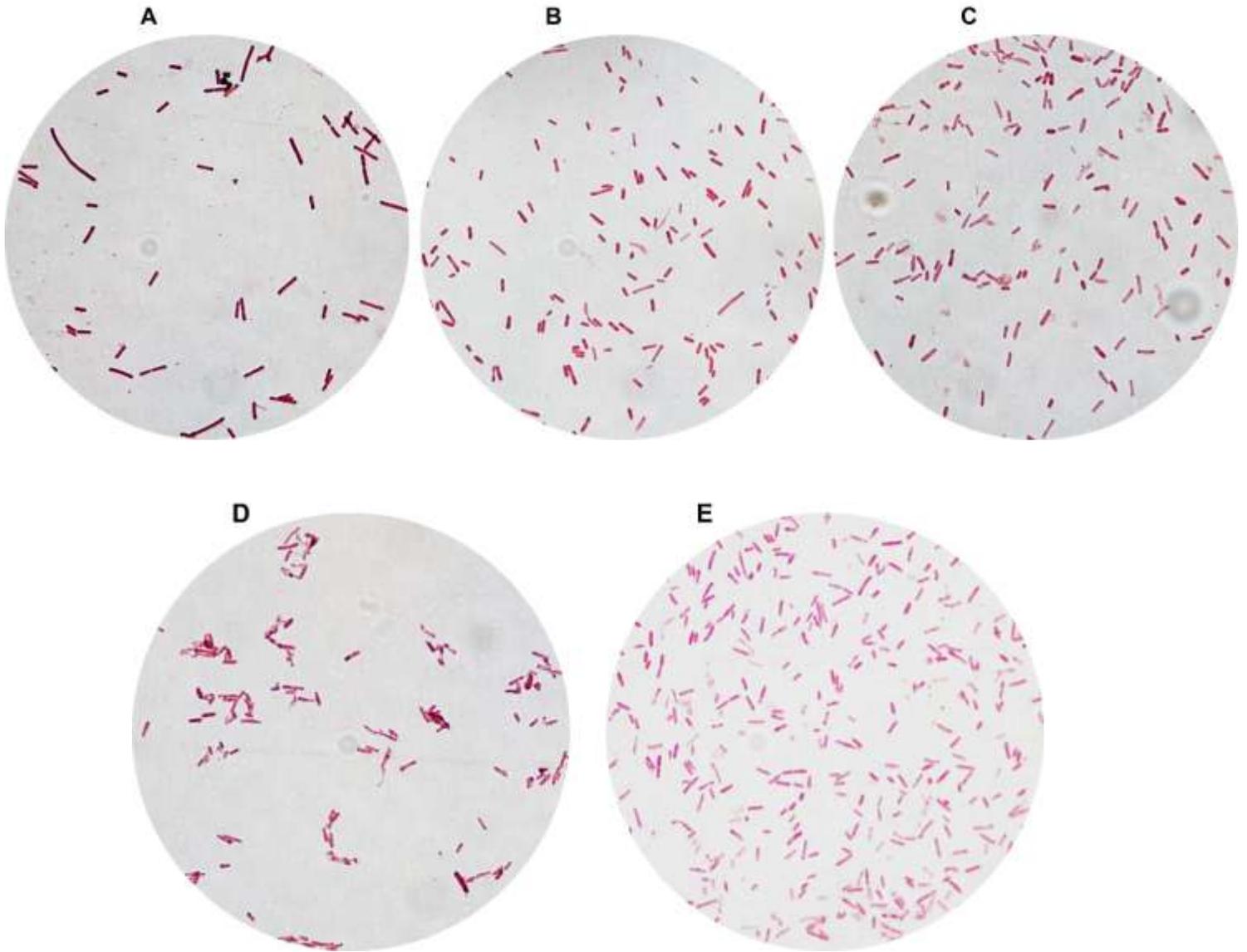
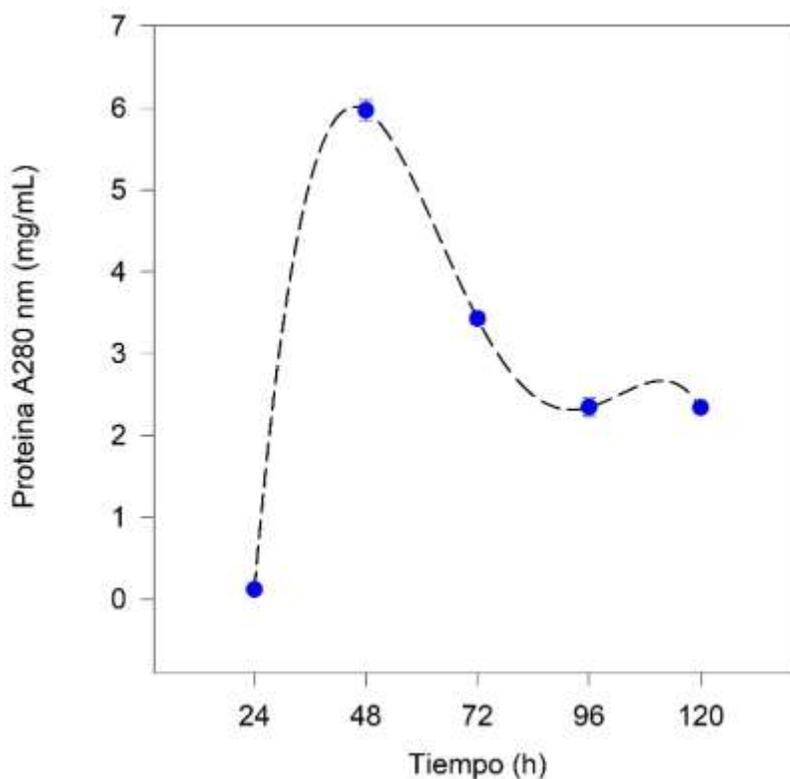


Figura 28.- Tinción Gram de los muestreos realizados en la cinética de crecimiento 120 h de *Xenorhabdus nematophila*. Vista microscopio. Aumento 1000x A) 24 h B) 48 h C) 72 h D) 96 h E) 120 h

### 2.3.5 Concentración de péptidos extraídos de *Xenorhabdus nematophila*

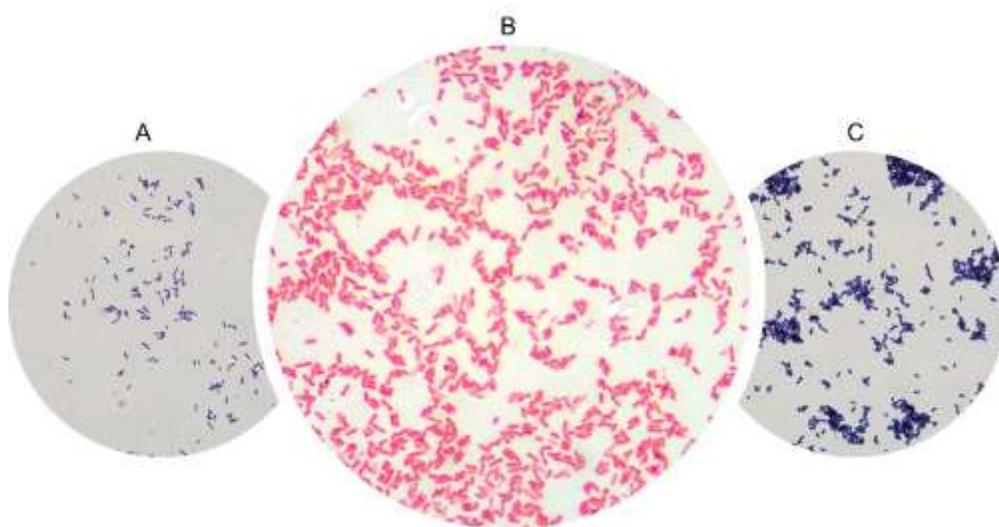
Se obtuvieron lecturas de concentración de proteínas a 280 nm (Fig. 29) obteniendo el punto máximo a las 48 h con 5.94 mg/mL, posteriormente, empieza a descender la concentración hasta 2.3 mg/mL. Lo que confirma que los metabolitos producidos por *X. nematophila* son de naturaleza peptídica.



**Figura 29** Concentración de proteína en los metabolitos producidos por *Xenorhabdus nematophila*, cinética de crecimiento de 120 h

### 2.3.6 Prueba de inhibición por gota

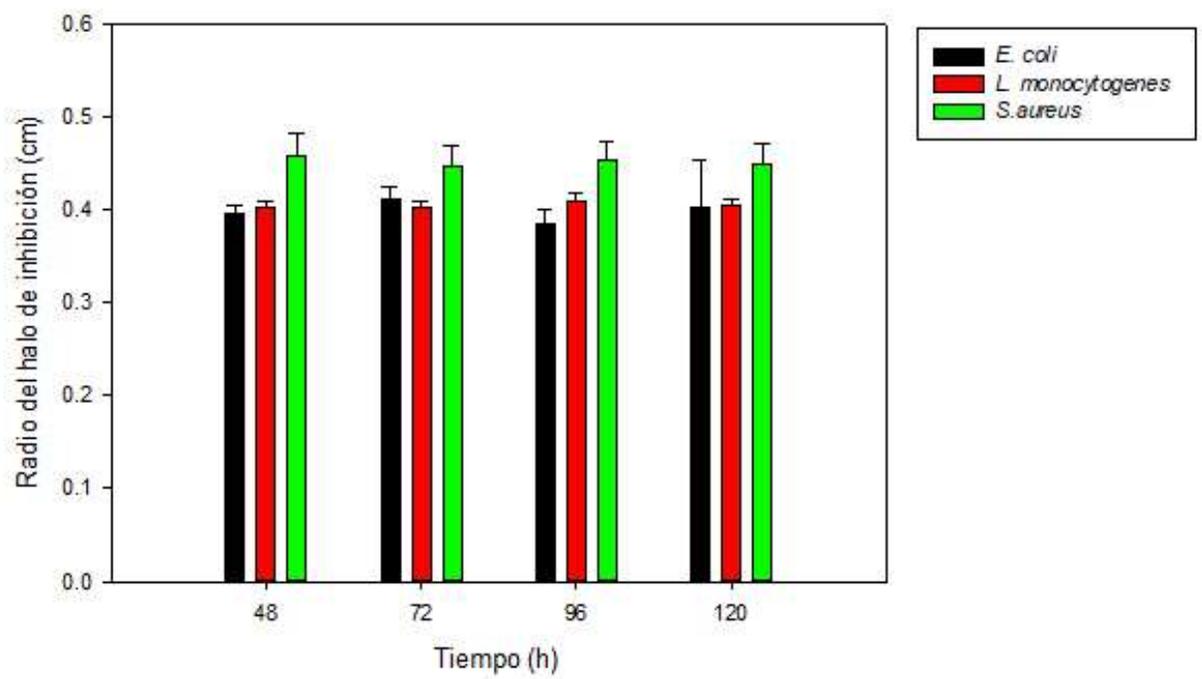
Se realizó la prueba de inhibición contra tres patógenos de interés económico (*E. coli*, *L. monocytogenes* y *S. aureus*) utilizando cepas pertenecientes a la colección del Cuerpo académico de Biotecnología Agroalimentaria (CABA). Inicialmente, se realizó una tinción Gram (Fig. 30) para verificar el estado de viabilidad de cada cepa microbiana.



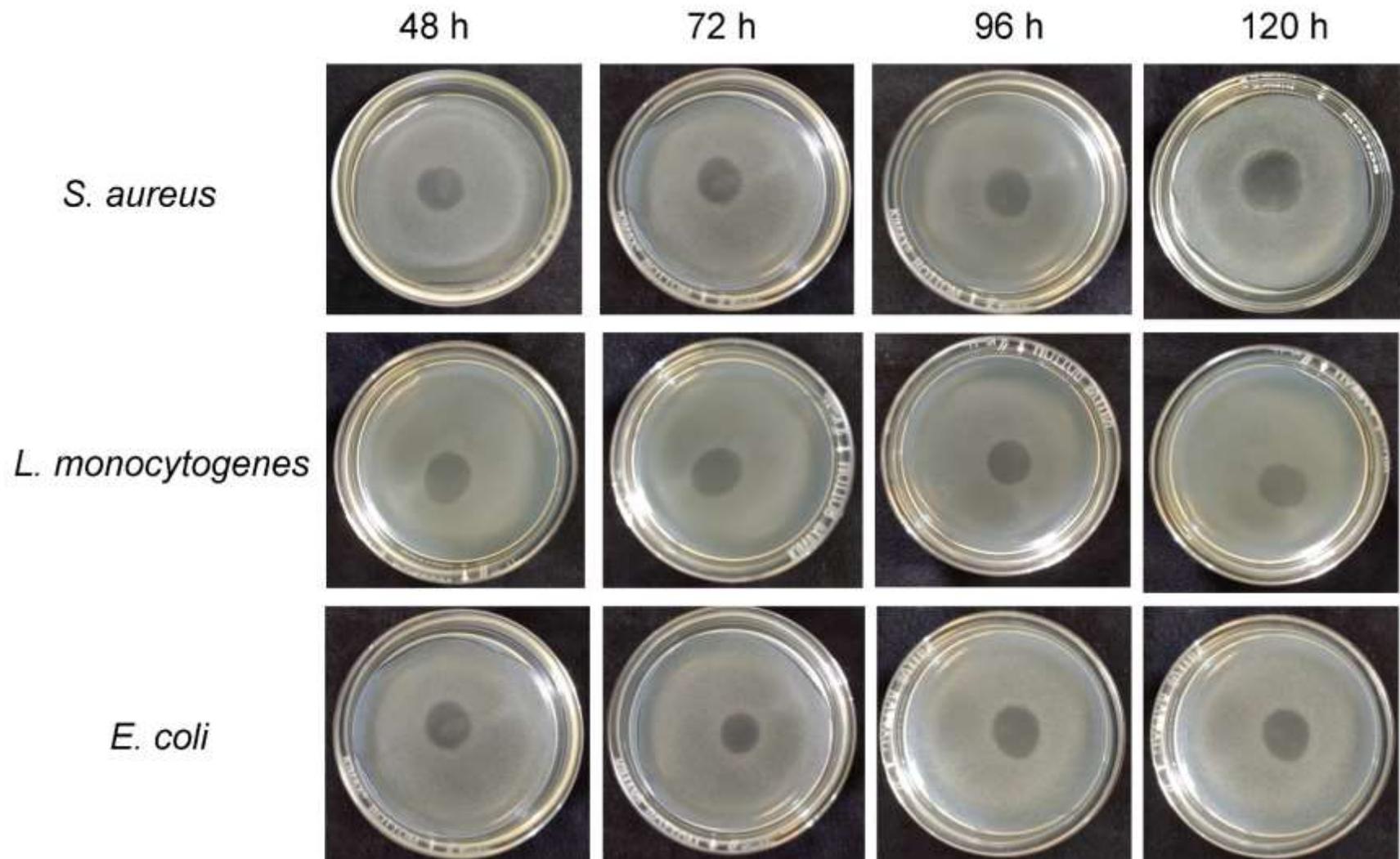
**Figura 30.-** Tinción Gram de los microorganismos de interés económico usados en este trabajo. A) *L. monocytogenes* B) *E. coli* C) *S. aureus*. Vista al microscopio.

Aumento 1000x

En la figura 31 se presentan los radios de los halos de inhibición medidos con ayuda de un calibrador vernier digital (Knova) , obtenidos a partir de las muestras de 48 h de crecimiento microbiano y manteniéndose hasta las 120 h, lo que nos indica que a partir de las 48 h se sintetizan estos metabolitos. Por otra parte, en la figura 33 se observa que los halos de inhibición son muy similares contra los 3 indicadores probados, lo que sugiere tiene la misma eficiencia.



**Figura 31** Radio de los halos de inhibición en medio de cultivo sólido de cada microorganismo indicador, 24 h después de colocar la BLIS, producida por *X. nematophila* en cada tiempo de fermentación evaluado.



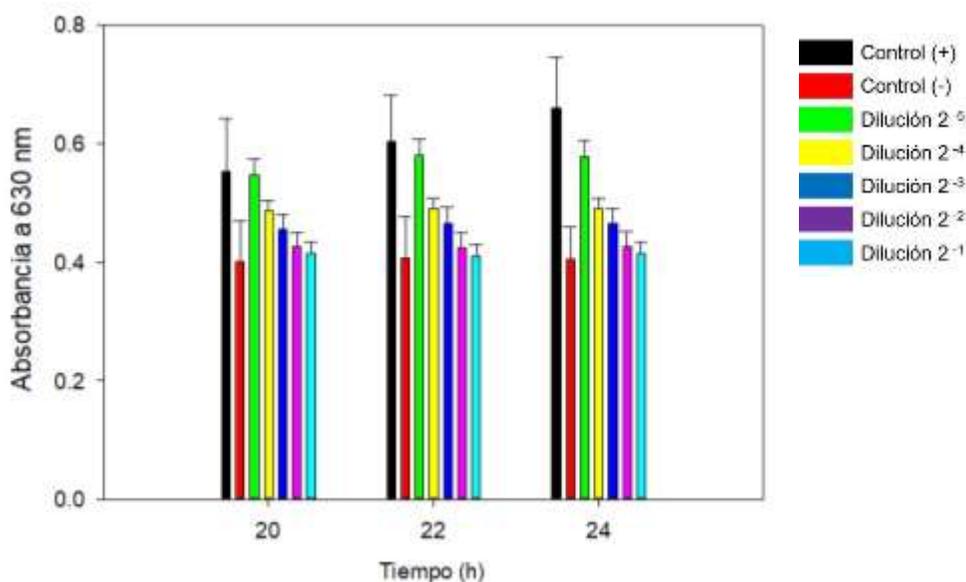
**Figura 32** Halos de inhibición obtenidos por la BLIS de *X. nematophila* durante su cinética de crecimiento de 48 a 120 h y contra los 3 microorganismos indicadores.

### 2.3.7 Evaluación de la concentración mínima inhibitoria (MIC)

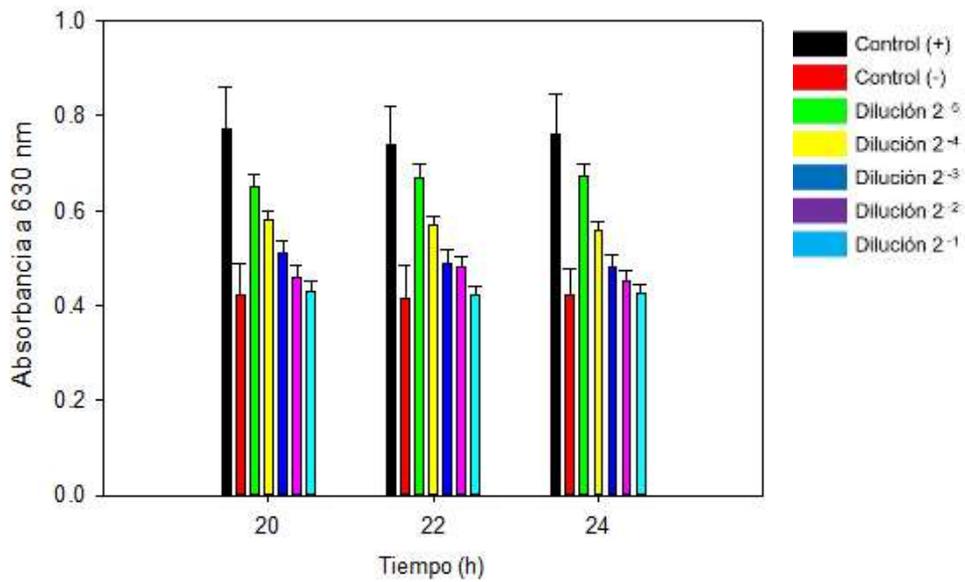
Después de analizar los resultados de cada medición de absorbancia, se encontró que con una dilución máxima de  $10^{-4}$  (Fig. 33 - 35) el crecimiento del microorganismo indicador aún está controlado, ya que después de este valor la lectura de absorbancia supera el valor de 0.5, por lo que se puede concluir que con una concentración de 20  $\mu\text{g/mL}$  (Tabla 3) la actividad se ve inhibida en los 3 indicadores patógenos.

**Tabla 3** Concentración de BLIS en cada dilución de la MIC

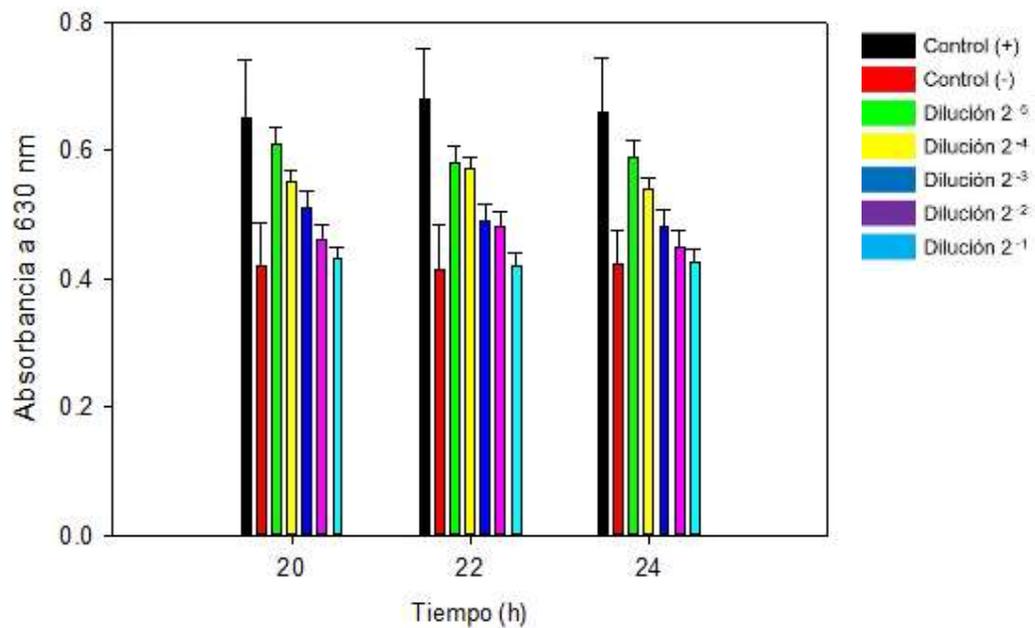
Dilución	Concentración (mg/mL)
$2^1$	160
$2^2$	80
$2^3$	40
$2^4$	20
$2^5$	10
$2^6$	5



**Figura 33** Concentración mínima inhibitoria de *S. aureus*, más un control positivo y otro negativo.



**Figura 34** Concentración mínima inhibitoria de *E. coli*, más un control positivo y otro negativo.

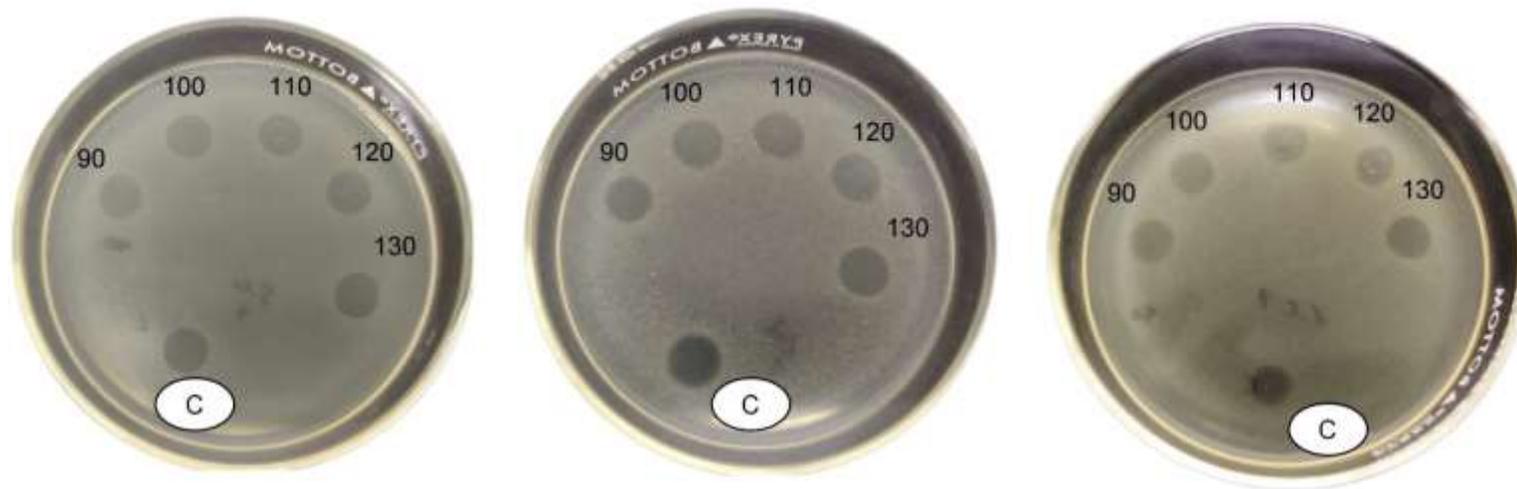


**Figura 35** Concentración mínima inhibitoria de *L. monocytogenes*, más un control positivo y otro negativo.

## 2.3.8 Caracterización de bacteriocina

### 2.3.8.1 Efecto de la temperatura

Los resultados obtenidos de acuerdo a la estabilidad térmica de la BLIS presumen que es resistente a temperaturas de hasta 130 °C ya que continua con el mismo comportamiento que la muestra control (Fig.36), contra los 3 microorganismos indicadores antes mencionados.



*Staphylococcus aureus*

*Listeria monocytogenes*

*Escherichia coli*

**Figura 36** Halos de inhibición obtenidos después de someter a la BLIS a intervalos de temperatura 90-130 durante 10 min más un control negativo (C).

### 2.3.8.2 Efecto del pH

Los resultados obtenidos sobre el efecto de pH sobre los compuestos antimicrobianos presentan que a intervalos de pH alcalinos continúa teniendo el efecto inhibitorio sobre los indicadores (Fig.37), mientras que a pH ácidos pierde por completo la actividad antimicrobiana.



**Figura 37** Halos de inhibición obtenidos después de someter a la BLIS a distintos pH intervalos de 2 a 8 más un control negativo (C).

En este sentido, con este trabajo se pretendió contribuir a caracterizar los metabolitos secundarios producidos por *Xenorhabdus nematophila*, logrando estandarizar los modelos de producción y purificación de metabolitos propios del Cuerpo académico de Biotecnología Agroalimentaria.

En las últimas décadas, se han destacado, los metabolitos secundarios producidos por el género *Xenorhabdus*, debido a la gran actividad insecticida y antibiótica, además de que el metabolismo juega un rol esencial en el complejo nematodo-bacteria, sin embargo, aún se encuentra en proceso el conocer el papel de la gran cantidad de sus metabolitos secundarios.

La caracterización del pH y la estabilidad térmica de los sobrenadantes es un conocimiento útil para el procesamiento de estos compuestos ya que nos abre un panorama para la posterior purificación y aplicación de estas bacteriocinas.

Los resultados manifiestan que los metabolitos antimicrobianos producidos por *Xenorhabdus nematophila* confirman ser de naturaleza proteínica resistiendo temperaturas en un rango de 90 a 130 °C y ajustes de pH en rangos de 6 a 8, valores que aún no han sido reportados en la literatura.

En cuanto a la actividad antimicrobiana contra microorganismos patógenos el fundamento del ensayo prueba de inhibición por gota es similar a la mancha en césped que es utilizada por la mayoría de los autores como un indicador de inhibición.

Ji et al., (2004) reportaron actividad de los metabolitos producidos por *Xenorhabdus nematophila* a partir de las 48 h, producidos en medio de cultivo caldo TSB con pH

inicial de 7.5 y agitación de 140 rpm, en cuanto al método de purificación el sobrenadante se centrifugó a 10,000 g y posteriormente separó en fracciones orgánicas y acuosas con n-butanol, finalmente se sometió a cromatografía de sílice para obtener fracciones evaluando su actividad antimicrobiana frente a microorganismos patógenos para plantas obteniendo diámetros de inhibición promedio de 4 mm, en comparativa con los diámetros de inhibición que obtuvimos frente a microorganismos patógenos para humanos (8 mm diámetro), lo que sugiere que el método de purificación adsorción-desorción conserva metabolitos con actividad antimicrobiana. Cabe resaltar que ningún artículo ha reportado el método de purificación adsorción – desorción utilizado para metabolitos producidos para bacterias *Xenorhabdus* y *Photorhabdus*.

Guo et al., (2017) concretó que la actividad de los metabolitos empieza cuando el sobrenadante alcanza un pH de 8.5 el cual es alcanzado en un lapso de 48 h lo que coincide con los resultados obtenidos en este estudio ya que las cinéticas muestran que a las 48 h *Xenorhabdus nematophila* alcanza un pH promedio de 8.2

En 2021 Trejo-González reporto la actividad antimicrobiana de las Bacterias ácido lácticas (BAL) aislados de queso Cotija frente a microorganismos indicadores *S. aureus*, *E.coli*, *L. monocytogenes*. Evaluando el caldo de cultivo sometido a la técnica de purificación adsorción-desorción. El contenido de proteína de la muestra cuya fermentación fue estresada con el sobrenadante libre de células de un cultivo activo de *E. coli*, después de concentrar en SpeedVac tuvo un contenido mayor de proteína 0.66 y 3.44 mg/mL respectivamente, en el caso de los péptidos extraídos en el cultivo de *xenorhabdus nematophila* alcanzaron un máximo de 5.94 mg/mL.

De igual forma reporta actividad anti listeria a nivel inhibición por gota con halos fantasmales antes de la concentración con speed vac, con los metabolitos concentrados reporta halos de 8.35 mm de diámetro, mientras que por los metabolitos producidos por *xenorhabdus* contra listeria se registran halos de inhibición promedio de 8 mm.

En cuanto a la concentración mínima inhibitoria, la BLIS de las BAL aisladas de queso Cotija (Trejo-González, Gutiérrez-Carrillo, Rodríguez-Hernández, López-Cuellar, & Chavarría-Hernández, 2021) presentó inhibición en una dilución de  $2^2$  mientras que la BLIS de *xenorhabdus* reporta inhibición en la dilución  $2^5$ .

Cabe destacar que los resultados comparados anteriormente en el caso de las BAL solo aplican para *L. monocytogenes* ya que la BLIS producida por BAL aisladas de queso Cotija no logró inhibir el desarrollo de los otros dos microorganismos indicadores (*S. aureus* y *E. coli*), mientras que en el caso de la BLIS de *Xenorhabdus nematophila* aplica para los 3 microorganismos indicadores antes mencionados.

## 2.4 Conclusiones

*Xenorhabdus nematophila* fue aislada de un nematodo entomopatógeno de la familia Steinernematidae perteneciente a la colección del Cuerpo Académico de Biotecnología Agroalimentaria (CABA), se identificó mediante al análisis de la subunidad ARN 16S y se demostró la producción de metabolitos secundarios, bajo condiciones de cultivo a nivel matraz.

Con el método de adsorción-desorción los péptidos producidos por *Xenorhabdus nematophila* fueron separados del medio de cultivo satisfactoriamente, exhibiendo actividad antimicrobiana contra microorganismos patógenos de interés alimentario como *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*. De igual forma, se puede confirmar que los metabolitos son de naturaleza peptídica, resisten temperaturas de 90 a 130 °C y ambientes con pH en un rango de 6 a 8.

## 2.5 Perspectivas

Para futuros estudios se sugiere realizar la purificación de estos metabolitos con una cromatografía más fina como HPLC (Cromatografía líquida de alta resolución) o HPLC/MS (Cromatografía de líquidos acoplada a espectrometría de masas) para identificar los compuestos presentes, determinar si se trata de alguno de los cuatro grupos químicos ya reportados y realizar la caracterización del efecto enzimático en los metabolitos. Es recomendable evaluar el potencial antimicrobiano contra una gama más amplia de bacterias tanto Gram positivas como Gram negativas. De igual

forma, se sugiere realizar el escalamiento de la fermentación a nivel biorreactor para evaluar los requerimientos de oxígeno de *X. nematophila*.

## 2.6 Referencias

- Akhurst, R. (1980). Morphological and functional dimorphism in *Xenorhabdus* spp., bacteria symbiotically associated with the insect pathogenic nematodes *Neoplectana* and *Heterorhabditis*. *Microbiology*, *121*(2), 303-309.
- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., & Lipman, D. J. (1990). Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*, *215*(3), 403-410. doi:10.1016/s0022-2836(05)80360-2
- Beshkova, D., & Frengova, G. (2012). Bacteriocins from lactic acid bacteria: microorganisms of potential biotechnological importance for the dairy industry. *Engineering in Life Sciences*, *12*(4), 419-432.
- Bode, H. B. (2009). Entomopathogenic bacteria as a source of secondary metabolites. *Current opinion in chemical biology*, *13*(2), 224-230.
- Boemare, N., & Akhurst, R. (2006). The Genera *Photorhabdus* and *Xenorhabdus*. In M. Dworkin, S. Falkow, E. Rosenberg, K.-H. Schleifer, & E. Stackebrandt (Eds.), *The Prokaryotes: A Handbook on the Biology of Bacteria Volume 6: Proteobacteria: Gamma Subclass* (pp. 451-494). New York, NY: Springer New York.
- Burnell, A., & Stock, S. P. (2000). *Heterorhabditis*, *Steinernema* and their bacterial symbionts—lethal pathogens of insects. *Nematology*, *2*(1), 31-42.
- Camargo, A. C., Todorov, S. D., Chihib, N.-E., Drider, D., & Nero, L. A. (2018). Lactic acid bacteria (LAB) and their bacteriocins as alternative biotechnological tools to control *Listeria monocytogenes* biofilms in food processing facilities. *Molecular biotechnology*, *60*(9), 712-726.
- da Silva, W. J., Pilz-Junior, H. L., Heermann, R., & da Silva, O. S. (2020). The great potential of entomopathogenic bacteria *Xenorhabdus* and *Photorhabdus* for mosquito control: a review. *Parasit Vectors*, *13*(1), 376. doi:10.1186/s13071-020-04236-6
- Egan, K., Field, D., Rea, M. C., Ross, R. P., Hill, C., & Cotter, P. D. (2016). Bacteriocins: novel solutions to age old spore-related problems? *Frontiers in Microbiology*, *7*, 461.
- Ensign, J., & Ciche, T. (2000). *Release of Photorhabdus luminescens cells from infective juvenile nematodes of Heterorhabditis*. Paper presented at the 2nd US/Hungarian EPN/EPB Annual Meeting, Hungary.
- Field, D., Ross, R. P., & Hill, C. (2018). Developing bacteriocins of lactic acid bacteria into next generation biopreservatives. *Current Opinion in Food Science*, *20*, 1-6.
- Fimbres Cubillas, G., & Flores Lara, Y. (2016). Potencialidad y retos del uso de nematodos entomopatogénos para el control biológico de plagas. I: Control biológico mediante una asociación simbiótica NEP-Bacteria. *Unison*, *11*(1), 27-36.
- Fons, A. G., Tuomo Karjalainen, Michel. (2000). Mechanisms of colonisation and colonisation resistance of the digestive tract part 2: bacteria/bacteria interactions. *Microbial Ecology in Health Disease*, *12*(2), 240-246.
- Forst, S., Dowds, B., Boemare, N., & Stackebrandt, E. (1997). *Xenorhabdus* and *Photorhabdus* spp.: bugs that kill bugs. *Annual review of microbiology*, *51*(1), 47-72.
- Fuchs, S. W., Grundmann, F., Kurz, M., Kaiser, M., & Bode, H. B. (2014). Fabclavines: Bioactive Peptide–Polyketide–Polyamino Hybrids from *Xenorhabdus*. *ChemBioChem*, *15*(4), 512-516.

- Fuchs, S. W., Proschak, A., Jaskolla, T. W., Karas, M., & Bode, H. B. (2011). Structure elucidation and biosynthesis of lysine-rich cyclic peptides in *Xenorhabdus nematophila*. *Organic biomolecular chemistry*, 9(9), 3130-3132.
- Gálvez, A., Abriouel, H., López, R. L., & Omar, N. B. (2007). Bacteriocin-based strategies for food biopreservation. *International journal of food microbiology*, 120(1-2), 51-70.
- Gaugler, R., & Kaya, H. K. (1990). *Entomopathogenic nematodes in biological control* (Vol. 227): CRC press Boca Raton.
- Herrera, R. R., Preciado, G. M., Chávez, J. A. M., Castro, J. A. O., EscalanteMinakata, P., González, C. N. A., & Junquera, V. I. (2013). Bacteriocinas: características y aplicación en alimentos. *Investigación y Ciencia*, 21(59), 64-70.
- Hinchliffe, S. J., Hares, M. C., & Dowling, A. J. (2010). Insecticidal toxins from the *Photorhabdus* and *Xenorhabdus* bacteria. *The Open Toxinology Journal*, 3(1).
- Hou, Q., Bai, X., Li, W., Gao, X., Zhang, F., Sun, Z., & Zhang, H. (2018). Design of Primers for Evaluation of Lactic Acid Bacteria Populations in Complex Biological Samples. *Front Microbiol*, 9, 2045. doi:10.3389/fmicb.2018.02045
- Joyce, S. A., Brachmann, A. O., Glazer, I., Lango, L., Schwär, G., Clarke, D. J., & Bode, H. B. (2008). Bacterial biosynthesis of a multipotent stilbene. *Angewandte Chemie International Edition*, 47(10), 1942-1945.
- Kaya, H., & Stock, S. (1997). Techniques in insect nematology. In: Academic Press, London.
- Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C., & Tamura, K. (2018). MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms. *Mol Biol Evol*, 35(6), 1547-1549. doi:10.1093/molbev/msy096
- Laguna Fandiño, E. (2006). Biología del nematodo *Steinernema* sp. cepa CIAT25 (Nematoda: Steinernematidae) y su bacteria simbiote.
- Lang, G., Kalvelage, T., Peters, A., Wiese, J., & Imhoff, J. F. (2008). Linear and cyclic peptides from the entomopathogenic bacterium *Xenorhabdus nematophilus*. *Journal of natural products*, 71(6), 1074-1077.
- Londoño, N. A., Taborda, M. T., López, C. A., & Acosta, L. V. (2015). Bacteriocinas producidas por bacterias ácido lácticas y su aplicación en la industria de alimentos. *Alimentos hoy*, 23(36), 186-205.
- Mimila-Méndez, K. (2017). Caracterización de sustancias similares a bacteriocinas producidas por *Streptococcus infantarius* con potencial aplicación biotecnológica.(Maestría en Ciencia de los Alimentos). *Maestría en Ciencia de los Alimentos*.
- Morgulis, A., Coulouris, G., Raytselis, Y., Madden, T. L., Agarwala, R., & Schäffer, A. A. (2008). Database indexing for production MegaBLAST searches. *Bioinformatics*, 24(16), 1757-1764.
- Nuñez, M., Tomillo, J., Gaya, P., & Medina, M. (1996). Bacteriocin quantification by the critical dilution method: a comparison of arbitrary units with diameter and area of the zone of growth inhibition. *Milchwissenschaft (Germany)*.
- Peng, X., Yu, K. Q., Deng, G. H., Jiang, Y. X., Wang, Y., Zhang, G. X., & Zhou, H. W. (2013). Comparison of direct boiling method with commercial kits for extracting fecal microbiome DNA by Illumina sequencing of 16S rRNA tags. *J Microbiol Methods*, 95(3), 455-462. doi:10.1016/j.mimet.2013.07.015
- Pérez-Arauz, Á. O., Rodríguez-Hernández, A. I., del Rocío López-Cuellar, M., Martínez-Juárez, V. M., & Chavarría-Hernández, N. (2021). Films based on Pectin, Gellan, EDTA, and

- bacteriocin-like compounds produced by *Streptococcus infantarius* for the bacterial control in fish packaging. *Journal of Food Processing*, 45(1), e15006.
- Reimer, D., Cowles, K. N., Proschak, A., Nollmann, F. I., Dowling, A. J., Kaiser, M., . . . Bode, H. B. (2013). Rhabdopeptides as insect-specific virulence factors from entomopathogenic bacteria. *ChemBioChem*, 14(15), 1991-1997.
- Reimer, D., Luxenburger, E., Brachmann, A. O., & Bode, H. B. (2009). A new type of pyrrolidine biosynthesis is involved in the late steps of xenocoumacin production in *Xenorhabdus nematophila*. *ChemBioChem*, 10(12), 1997-2001.
- Sáenz, A. (2005). Importancia de los nematodos entomopatógenos para el control biológico de plagas en palma de aceite. *Revista Palmas*, 26(2), 41-57.
- Saitou, N., & Nei, M. (1987). The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular biology and evolution*, 4(4), 406-425.
- Sánchez-Reyes, W. (2014). Producción de sustancias con actividad antimicrobiana de uso potencial en la industria alimentaria, mediante el cultivo de la bacteria ácido láctica, *Streptococcus infantarius*, en medios complejos que contienen melazas (Maestría). *Streptococcus infantarius, en medios complejos que contienen melazas*.
- Sergeant, M., Baxter, L., Jarrett, P., Shaw, E., Ousley, M., Winstanley, C., & Morgan, J. A. (2006). Identification, typing, and insecticidal activity of *Xenorhabdus* isolates from entomopathogenic nematodes in United Kingdom soil and characterization of the xpt toxin loci. *Appl Environ Microbiol*, 72(9), 5895-5907. doi:10.1128/AEM.00217-06
- Shi, Y.-M., & Bode, H. B. (2018). Chemical language and warfare of bacterial natural products in bacteria–nematode–insect interactions. *Natural product reports*, 35(4), 309-335.
- Szallas, E., Koch, C., Fodor, A., Burghardt, J., Buss, O., Szentirmai, A., . . . Stackebrandt, E. (1997). Phylogenetic evidence for the taxonomic heterogeneity of *Photorhabdus luminescens*. *International Journal of Systematic Evolutionary Microbiology* 47(2), 402-407.
- Tobias, N. J., Mishra, B., Gupta, D. K., Sharma, R., Thines, M., Stinear, T. P., & Bode, H. B. (2016). Genome comparisons provide insights into the role of secondary metabolites in the pathogenic phase of the *Photorhabdus* life cycle. *BMC genomics*, 17(1), 1-11.
- Trejo-González, L., Gutiérrez-Carrillo, A.-E., Rodríguez-Hernández, A.-I., López-Cuellar, M.-d.-R., & Chavarría-Hernández, N. (2021). Bacteriocins produced by LAB isolated from cheeses within the period 2009–2021: a review. *Probiotics Antimicrobial Proteins*, 1-14.
- Wang, J., & Bedding, R. (1996). Population development of *Heterorhabditis bacteriophora* and *Steinernema carpocapsae* in the larvae of *Galleria mellonella*. *Fundamental Applied Nematology*, 19(4), 363-368.
- Wiegand, I., Hilpert, K., & Hancock, R. E. (2008). Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances. *Nature protocols*, 3(2), 163-175.