

## RESEARCHS / INVESTIGACIÓN

## Actividad antimicrobiana de bacterias ácido lácticas aisladas de invertebrados marinos de la costa del Chubut (Patagonia – Argentina)

### Antimicrobial activity of lactic acid bacteria isolated from marine invertebrates of Chubut coast (Patagonia – Argentina)

Parada Romina<sup>1</sup>, Beraud Lucas<sup>2</sup>, Andoro Débora<sup>1</sup>, Sosa Franco<sup>1</sup>, Marguet Emilio<sup>1</sup> y Vallejo Marisol<sup>1\*</sup>.

DOI. 10.21931/RB/2017.02.04.8

#### RESUMEN

Se estudió la actividad antagonista de cepas de bacterias ácido lácticas (BAL) aisladas de invertebrados marinos de la costa del Chubut. Dentro de los 92 aislamientos, 22 exhibieron actividad, de las cuales 3 cepas se clasificaron como *Lactobacillus* y 19 como *Enterococcus*. En todos los casos, después de la neutralización con NaOH y tratamiento térmico, la actividad inhibitoria del sobrenadante libre de células de las cepas estudiadas permaneció activa. El tratamiento con lisozima y catalasa no afectó la actividad antimicrobiana; sin embargo la actividad enzimática de la tripsina abolió la acción inhibitoria de los sobrenadantes, confirmando la naturaleza proteica de los compuestos activos. Las actividades contra *Listeria innocua* ATCC 33090 logradas por cepas de *Enterococcus* variaron entre 640 y 163.840 unidades arbitrarias/mililitro (AU/ml), mientras que las cepas de *Lactobacillus* exhibieron actividades entre 20 y 40 AU/ml. Las cepas *E. mundtii* 278Pe, *E. hirae* 463Me y *E. hirae* 471Me exhibieron las actividades inhibitorias más altas contra un amplio espectro de bacterias patógenas y/o contaminantes de alimentos. A pesar de la amplia información disponible sobre estos microorganismos, existen pocos estudios de BAL aisladas a partir de invertebrados de origen marino. Los resultados obtenidos en este estudio sugieren que esta fuente puede contribuir al hallazgo de nuevas bacteriocinas con potencial uso en la industria alimentaria.

Palabras Clave: Bacteriocinas, *Lactobacillus*, *Enterococcus*, Patagonia

#### ABSTRACT

The antagonist activity of lactic acid bacteria (LAB) strains isolated from marine invertebrates of Chubut coast was studied. Among the 92 isolates, 22 displayed activity: 3 strains were classified as *Lactobacillus* and 19 as *Enterococcus*. In all cases, after neutralization with NaOH and heat treatment the inhibitory activity of cell free supernatant of the strains studied remained active. Treatment with lysozyme and catalase did not affect the antimicrobial activity; however enzymatic activity of trypsin abolished the inhibitory action of the supernatants, confirming the proteinaceous nature of the active compounds. The activities against *Listeria innocua* ATCC 33090 achieved by *Enterococcus* strains ranged between 640 and 163.840 arbitrary units/milliliter (AU/ml), while *Lactobacillus* strains displayed activities between 20 and 40 AU/ml. The strains *E. mundtii* 278Pe, *E. hirae* 463Me and *E. hirae* 471Me exhibited the highest inhibitory activities against a wide spectrum of pathogenic bacteria and/or food contaminants. In spite of extensive available information about these microorganisms, there are few studies of LAB from invertebrates of marine origin. The results obtained in this study suggest that this source may contribute to the finding of novel bacteriocin like substances with potential use in food industry.

Keywords: Bacteriocins, *Lactobacillus*, *Enterococcus*, Patagonia

## Introducción

El medio marino es un reservorio excepcional, alberga una gran variedad de organismos con potencial para producir diversos productos naturales con propiedades bioactivas como antibacterianos, antifúngicos, antivirales, entre otros. En la actualidad, tanto el interés académico como industrial se concentra en microorganismos, en parte debido al creciente número de metabolitos biológicamente activos reportados en bacterias marinas, específicamente en bacterias ácido lácticas (BAL)<sup>(1)</sup>.

Las BAL constituyen un grupo heterogéneo de microorganismos Gram positivos, que producen ácido láctico como principal metabolito durante el proceso de fermentación. No obstante, sus altos requerimientos nutricionales, se han adaptado para crecer

en condiciones ambientales muy diferentes y están ampliamente extendidas en la naturaleza<sup>(2)</sup>. Las BAL presentan gran potencial biotecnológico, son capaces de producir metabolitos con actividad antimicrobiana que exhiben mecanismos inespecíficos (diacetilo, ácidos orgánicos y peróxido de hidrógeno) o específicos como el caso de las bacteriocinas. Las bacteriocinas son moléculas antimicrobianas de naturaleza peptídica, con un origen genético diverso, suelen presentar modificaciones postraduccionales y pueden funcionar como una estrategia competitiva contra otros microorganismos<sup>(3)</sup>.

El ambiente marino de la Argentina presenta una gran extensión, como así también una alta productividad biológica y biodiversidad de macro y microorganismos. A pesar de presentar un gran potencial para aplicaciones biotecnológicas,

<sup>1</sup> Laboratorio de Biotecnología Bacteriana, Facultad de Ciencias Naturales y Ciencias de la Salud (Sede Trelew), Universidad Nacional de la Patagonia San Juan Bosco - Argentina.

<sup>2</sup> Institut Universitaire de Technologie de La Rochelle – Francia.

E-mail de correspondencia: \*soltrelew@gmail.com

los microorganismos que habitan estos ecosistemas permanecen mayormente inexplorados y sus propiedades aún no explotadas<sup>(4)</sup>.

En el presente trabajo se describe la capacidad inhibitoria de cepas de BAL productoras de sustancias antimicrobianas contra microorganismos Gram positivos y negativos, aisladas de invertebrados marinos de la provincia del Chubut (Patagonia-Argentina). Además, se describen las principales características fisicoquímicas de los metabolitos bioactivos.

## Materiales y Métodos

### Aislamiento de bacterias ácido lácticas

Se tomaron muestras asepticamente del contenido intestinal de mejillón patagónico (*Mytilus edulis platensis*), caracol (*Adelomelon ancilla*), navaja (*Solen tehuelchus*), almeja rayada (*Ameghinomya antiqua*), vieira tehuelche (*Aequipecten tehuelchus*) y papa de mar (*Polychinidae*) de las localidades de Puerto Lobos, Puerto Madryn, Playa Unión, Camarones, Comodoro Rivadavia y Rada Tilly, pertenecientes a la provincia del Chubut, Argentina. Las muestras se trasladaron a 4° C hasta el laboratorio y se procesaron dentro de las 8 -10 h. El enriquecimiento primario se realizó en caldo de Man, Rogosa & Sharp (MRS), MRS ajustado a pH 4,6 y 5,4; MRS con NaCl al 8 %, caldo M17 y caldo de púrpura bromo-cresol azida. Los enriquecimientos se incubaron a 30 °C durante 24-48 h. Luego del período de incubación los cultivos líquidos se repicaron a agar MRS respetando la misma composición que su respectivo medio de enriquecimiento, agar M17 y agar bilis-esculina. Todos los medios sólidos se suplementaron con ácido nalidixico (20 µg/mL) y nistatina (10 µg/mL) y se incubaron durante 24-72 h a 30 °C. Se realizaron repiques hasta obtener cultivos puros que se conservaron a -30 °C en el Ceparío del Laboratorio de Biotecnología Bacteriana como parte de la colección.

### Identificación fenotípica

Las colonias sospechosas se sometieron a las siguientes pruebas bioquímicas: coloración de Gram, catalasa, oxidasa, fermentación de azúcares, producción de pigmento, crecimiento en NaCl (6,5 y 8 %), actividad de pirrolidonil aminopeptidasa y producción de gas (CO<sub>2</sub>) a partir de glucosa.

### Ensayos antimicrobianos de los sobrenadantes

Las cepas de BAL se cultivaron en caldo MRS a 30 °C hasta alcanzar la fase estacionaria (12-16 h). Luego del período de incubación los medios se centrifugaron a 3.000 rpm durante 15 min. Los sobrenadantes libre de células (SLC) se emplearon en el ensayo antimicrobiano que se realizó por el método de difusión en placa según la metodología descrita por Vallejo y col.<sup>(5)</sup> Los microorganismos utilizados como indicadores se encuentran listados en la Tabla 1.

### Influencia de la temperatura y tratamientos enzimáticos sobre la actividad antimicrobiana

Los SLC de las cepas de BAL se trataron con NaOH 0,5 M hasta alcanzar la neutralidad. Los sobrenadantes neutralizados se sometieron posteriormente a una temperatura de 80 °C (5 min) y 100 °C durante 5, 15 y 30 min. La sensibilidad a enzimas se llevó a cabo, determinando la actividad residual luego de tratar los SLC durante 2 h con tripsina, lisozima y catalasa (5 mg/mL) en las condiciones óptimas para cada enzima. En todos los ensayos la actividad residual se determinó por el procedimiento previamente descrito.

### Título de la actividad inhibitoria

La determinación cuantitativa de la actividad se realizó por el método de difusión en placa mediante la dilución seriada de los SLC según lo descrito anteriormente<sup>(5)</sup>, utilizando como

microorganismo indicador a *Listeria innocua* ATCC 33090. Los resultados se expresaron como unidades arbitrarias/ml. Las unidades arbitrarias (UA) equivalen a la inversa de la mayor dilución con actividad antimicrobiana (halo de inhibición), dividido por los mililitros de sobrenadante sembrados (UA=1/dilución/ml sembrados).

## Resultados y Discusión

De las muestras procesadas de invertebrados marinos se lograron aislar y clasificar mediante identificación fenotípica 92 cepas de BAL pertenecientes a los géneros *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* y *Enterococcus*. Del total de microorganismos aislados, 3 cepas correspondientes al género *Lactobacillus* sp. y 19 *Enterococcus* exhibieron actividad inhibitoria contra uno o más de los microorganismos utilizados como indicadores (Tabla 1). La mayor actividad se presentó contra cepas del género *Listeria* y otras BAL, mientras que no se obtuvo inhibición contra bacterias Gram negativas, salvo la especie de *Vibrio anguillarum*. Estos resultados son coincidentes con los obtenidos en trabajos previos con BAL provenientes del medio marino<sup>(1, 6, 7, 8)</sup>.

La distribución de especies de enterococos encontrada en este estudio es comparable con los resultados expuestos en trabajos previos en cepas de la región, en los cuales *E. faecalis* y *E. faecium* fueron las especies predominantes en alimentos y animales<sup>(9)</sup>. En este trabajo, además de las especies antes mencionadas se aislaron cepas de *E. hirae*, *E. mundtii* y *E. columbae* proveniente de mejillón patagónico, pepino de mar y navaja respectivamente.

En el presente estudio, la alta frecuencia de aislamientos de BAL sugiere que, no obstante los complejos requerimientos nutricionales exigidos por estos microorganismos, exhiben una alta adaptabilidad a un variado número de ambientes incluyendo, como en este caso, al medio marino. Estos resultados, como en anteriores realizados en peces de la costa noreste del Chubut<sup>(5)</sup> y del estuario de Bahía Blanca<sup>(10)</sup> confirman la presencia de BAL productoras de sustancias inhibitorias tipo bacteriocinas (SITB). Sin embargo, existen escasos reportes de BAL productoras de antimicrobianos provenientes de invertebrados marinos<sup>(11)</sup>, menos aún en la zona marítima patagónica, lo que resulta un nicho ecológico escasamente estudiado y con gran potencial biotecnológico.

Luego de tratar los SLC de las cepas seleccionadas con NaOH hasta alcanzar la neutralidad, el efecto inhibitorio no exhibió modificaciones. Los mismos resultados se obtuvieron cuando los sobrenadantes neutralizados se sometieron a los tratamientos térmicos. El tratamiento enzimático llevado a cabo con catalasa y lisozima no alteró la actividad antagonista ejercida por los sobrenadantes de las 22 cepas seleccionadas, en cambio el tratamiento con tripsina abolió por completo la capacidad inhibitoria. Estos resultados confirman que la actividad antimicrobiana del principio activo no es ejercida por el peróxido de hidrógeno, su naturaleza proteica y la ausencia de azúcares en su estructura, características compatibles con SITB. En todos los casos estudiados, la estabilidad térmica de estas moléculas indicaría que se trata de péptidos de bajo peso molecular con actividad antilisteria, propiedades que permiten incluirlas dentro del grupo de bacteriocinas clase I o II<sup>(3)</sup>.

Los títulos de la actividad antagonica contra *L. innocua* ATCC 33090 resultaron variables. Las cepas de *Enterococcus* lograron actividades comprendidas entre 640-163.840 UA/ml, mientras que las 3 cepas de *Lactobacillus* presentaron títulos inferiores (20-40 UA/ml). Estos resultados, como en trabajos previos<sup>(6, 8)</sup> demuestran el potencial antimicrobiano de las cepas de enterococos, rasgo distintivo en este género de BAL. Las cepas de *E. mundtii* (278 Pe) y *E. hirae* (463 Me y 471 Me) exhibieron la mayor actividad antagonica, un espectro inhibitorio contra cepas patógenas y/o contaminantes de alimentos Gram positivas y negativas, resultados prometedores si tenemos en cuenta que las mencionadas especies son poco frecuente en este tipo de hábitat.

## Cepas Seleccionadas

Cepas indicadoras	E. fm	Lb.	E.	Lb.	Lb.	E. fl.	E. fl.	E. fl.	E. co	E. mu	E. fm	E. fm	E. fm	E. lu	E. lu	E. lu	E. fm	E. fm	E. fm	
47 VT	48 Na	49 Me	68 Na	69 Na	75 Me	77 Me	78 Me	87 Na	278 Pe	397 Na	432 Me	433 Me	456 Me	459 Me	463 Me	468 Me	478 Me	479 Me	535 Ca	
<i>L. innocua</i> Tw 67	++	-	+	+	+	+	+	+	+++	+	+++	+	++	+++	++	+++	+++	+	+	++
<i>L. innocua</i> ATCC 33090	++	++	+	++	-	-	-	+	++	+	++	+	++	++	++	++	++	+	+	+
<i>L. monocytogenes</i> ATCC 7644	++	++	++	+++	-	-	-	+++	+++	+	+++	+	++	+++	+	+++	+	+	++	++
<i>L. monocytogenes</i> 1908 <sup>a</sup>	++	++	-	++	-	-	-	++	+++	+	++	+	+	++	++	++	+	+	+	+
<i>L. monocytogenes</i> 1915 <sup>a</sup>	++	++	-	++	-	-	-	++	+++	+	++	+	+	++	++	++	+	+	+	+
<i>L. monocytogenes</i> 1599 <sup>a</sup>	++	+	-	+	-	-	-	++	+++	+	++	+	++	++	++	++	+	+	+	+
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	+	+	++	+	-	-	-	+	++	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Enterococcus</i> Van A	+	+	+	+	-	-	+	+	++	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Enterococcus</i> Van B	+	+	+	-	-	-	+	+	++	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	++
<i>Enterococcus</i> Van C	+	+	+	-	-	-	+	+	++	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>E. casseliflavus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	+++	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-
<i>Lactococcus lactis</i> ATCC 11454	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Lc. gariviosi</i> 03-8460 <sup>a</sup>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Lc. gariviosi</i> 03-8702 <sup>a</sup>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Lc. pitchum</i> 23.3.92 <sup>a</sup>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Streptococcus mitor</i> MT 2576 <sup>a</sup>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Lactobacillus plantarum</i> TwLb 5	-	-	-	-	-	-	-	-	++	-	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 5923	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Aerococcus latus</i> ATCC 15307	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>E. coli</i> ATCC 35218	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Yersinia ruckeri</i> 02/1607/C <sup>a</sup>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Fibrio anguillarum</i> V10 <sup>b</sup>	+	++	-	++	-	-	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	+

Tabla 1: Actividad antimicrobiana de las cepas seleccionadas contra bacterias Gram positivas y Gram negativas

Halo de inhibición: +,  $\geq 15$  mm; ++,  $\geq 15$  mm; +++,  $\geq 20$  mm; -, sin inhibiciónE.fm: *Enterococcus faecium*; E. fl: *E. faecalis*; E. co: *E. coli*; E. mu: *E. mundtii*; E. hi: *E. hirae*; Lb: *Lactobacillus* sp.

VT: vieira tehuelche; Na: navaja; Me: mejillón; Pe: papa de mar; Ca: caracol

<sup>a</sup> Cepas provistas por el Dr. Fernandez-Garayzabal (Escuela de Medicina Veterinaria, Universidad Complutense de Madrid)<sup>b</sup> Cepas provistas por el Lic. Ledesma (Fac. de Cs. Naturales y Cs. de la Salud, Universidad Nacional de la Patagonia San Juan Bosco)

A diferencia de otras BAL, el género *Enterococcus* no es considerado un organismo GRAS (microorganismos reconocidos como seguros), aunque algunas especies se utilizan como probióticos para humanos y animales<sup>(12)</sup>. En consecuencia, se hace indispensable completar los estudios de potenciales factores de virulencia y/o rasgos negativos en las cepas de enterococos bacteriocinogénicas para futuras aplicaciones en la biopreservación de alimentos.

## Conclusiones

La mayor parte de la investigación sobre BAL se ha direccionado a cepas de origen terrestre, específicamente relacionadas con la industria láctea y sus derivados. Sólo unos pocos estudios se han centrado en el aislamiento en este grupo bacteriano a partir de invertebrados marinos y en la búsqueda de su capacidad para producir bacteriocinas. Las cepas de BAL estudiadas en este trabajo, específicamente las especies de *Enterococcus* son productoras de SITB que podrían resultar efectivas para el control de biológico de bacterias patógenas como *Listeria monocytogenes*.

## Agradecimientos

Los autores agradecen al Dr. José Francisco Fernández-Garayzábal y al Lic. Pablo Ledesma por suministrar las cepas indicadoras. Este trabajo fue financiado con fondos otorgados por la Universidad Nacional de la Patagonia San Juan Bosco al proyecto “Potencial biotecnológico de enterococos aislados del medio marino patagónico”.

## Referencias bibliográficas

- Desriac F, Defer D, Bourgougnon N, Brillet B, Le Chevalier P & Fleury Y. Bacteriocin as weapons in the marine animal-associated bacteria warfare: inventory and potential applications as an aquaculture probiotic. *Marine Drugs*. 2010; 8: 1153-1177.
- Buntin N, Chanthachum S & Hongpattarakere T. Screening of lactic acid bacteria from gastrointestinal tracts of marine fish for their potential use as probiotics. *Songklanakarin Journal Science Technology*. 2008; 30(1): 141-148.
- Alvarez-Sieiro P, Montalbán-López M, Mu D & Kuipers OP. Bacteriocins of lactic acid bacteria: extending the family. *Applied Microbiology Biotechnology*. 2016; 100:2939-2951.
- Dionisi HM, Lozada M & Olivera NL. Bioprospection of marine microorganisms: potential and challenges for Argentina. *Revista Argentina de Microbiología*. 2012; 44:122-132.
- Vallejo M, Olivera NL, Sequeiros C & Marguet E. Actividad antilisteria de bacterias ácido lácticas aisladas de peces marinos. *Analecta Veterinaria*. 2009; 29(2): 5-9.
- Migaw S, Ghrairi T, Le Chevalier P, Brillet B, Fleury Y & Hani K. Isolation and characterization of *Enterococci* bacteriocin strains from tunisian fish viscera. *Food and Nutrition Sciences*. 2013; 4:701-708.
- Shubhankar Ghosh A, Selvam DG, Neethu CS, Saramma AV & Hatha AAM. Diversity and antimicrobial activity of lactic acid bacteria from the gut of marine fish *Rastrelliger kanagurta* against fish, shrimp and human pathogens. *Journal of the Marine Biological Association of India*. 2013; 55(2): 22-27.cl
- Ghomrassi H, Braiek O, Choiset Y, Haertlé T, Hani K, Chobert JM & Ghrairi T. Evaluation of marine bacteriocinogenic enterococci strains with inhibitory activity against fish-pathogenic Gram-negative bacteria. *Diseases of Aquatic Organisms*. 2016; 118: 31-43.
- Vallejo M, Ledesma P, Ibañez C, Aguirre L F, Parada RB, Vallejo BB & Marguet ER. Resistencia a metales pesados, antibióticos y factores de virulencia en cepas de *Enterococcus* aisladas en la provincia del Chubut, Argentina. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología*. 2016; 36:16-22.
- Sica MG, Olivera NL, Brugnoli LI, Marucci PJ, López Cazorla AC & Cubitto MA. Isolation, identification and antimicrobial activity of lactic acid bacteria from the Bahía Blanca Estuary. *Revista de Biología Marina y Oceanografía*. 2010; 45(3): 389-397.
- Nguyen VD, Pham T, Nguyen TH, Nguyen TT & Lone H. Screening of marine bacteria with bacteriocin-like activities and probiotic potential for ornate spiny lobster (*Panulirus ornatus*) juveniles. *Fish & Shellfish Immunology*. 2014; 40:49-60.
- Ferreira Araujo T & de Lucus Fortes Ferreira CL. The genus *Enterococcus* as probiotic: safety concerns. *Brazilian Archives of Biology and Technology*. 2013; 56:457-66.

**Recibido:** 25 agosto 2017

**Aprobado:** 5 noviembre 2017