

Revista de la Universidad del Zulia



Fundada en 1947
por el Dr. Jesús Enrique Lossada

Ciencias
Exactas
Naturales
y de la
Salud

Año 5 N° 12

Mayo - Agosto 2014

Tercera Época

Maracaibo - Venezuela

Actividad antagónica de un inhibidor no- Lantibiótico de clase II en *Enterococcus faecalis* autóctono frente a cepas relacionadas

L. González*

G. Reyes

J. Rivera

I. Zabala

L. Atencio

RESUMEN

La aparición de cepas bacterianas resistentes a múltiples antibióticos acarrea la necesidad de buscar alternativas a este problema de salud pública. Ante este panorama el género *Enterococcus* presenta compuestos con propiedades antibióticas (bacteriocinas o enterocinas) con capacidad de inhibir bacterias relacionadas. El objetivo de esta investigación se basó en cuantificar la actividad antagónica de una bacteriocina no-lantibiótica clase II, presente en la cepa autóctona *E. faecalis* Eq40, en unidades arbitrarias por mililitro (UA/mL) a través del método de difusión en pozos, empleando cocultivos para medir el antagonismo frente al crecimiento bacteriano. Eq40 inhibió el crecimiento de cepas Gram positivas, y su compuesto extracelular resultó un péptido constitutivo estable en UA/mL en medio sólido y líquido, incluso a dilución 10⁶, generando >180UA/mL y halos inhibitorios de 14mm de diámetro. Diluciones mayores afectaron la actividad. La actividad antagónica del

*Laboratorio de Genética y Biología Molecular, Departamento de Biología. Facultad Experimental de Ciencias, Universidad del Zulia. Apartado 526. Maracaibo, Venezuela.

E-mail: lgonzalezpaz@gmail.com

RECIBIDO: 15-04-2015 /// ACEPTADO: 20-05-2015

compuesto analizado puede considerarse para una futura aplicación en pro del control de patógenos como *E. faecalis* y *S. aureus*, conforme aumenten los estudios y se establezcan los mecanismos de acción.

PALABRAS CLAVE: patógenos, antibióticos, bacteriocinas, enterocinas.

Antagonistic activity of a no-Lantibiotic class II inhibitor in enterococcus faecalis autochthonous against related strains

ABSTRACT

The appearance of bacterial strains resistant to multiple antibiotics leads to the necessity of seeking alternatives for this public health problem. Given this scenario, the genre "*Enterococcus*" presents compounds with antibiotic properties (bacteriocins or enterocins) capable of inhibiting the growth of related bacteria. The aim of this investigation was quantifying the antagonistic activity of a no-Lantibiotic class II bacterium, present in the autochthonous strain *E. faecalis* Eq40 in arbitrary units per millimeter (AU/mm); through the wells diffusion method and using co-cultures in order to calculate the antagonism against the bacterial growth. Eq40 inhibited the growth of Gram positive strains, and its extracellular compound turned out to be a constitutive peptide stable in AU/MM in a solid and liquid medium, even at 10^6 dilution, generating >180 AU/mm and inhibitory halos of 14mm of diameter. Higher dilutions affected the activity. The antagonistic activity of the analyzed compound might be considered for future application in favor of the control of pathogens, such as *S. aureus* and *E. faecalis*, while the studies increase and the mechanism of action are established.

KEYWORDS: pathogens, antibiotics, bacteriocins, enterocins.

Introducción

El constante surgimiento de bacterias resistentes a los antibióticos, ha acarreado la necesidad de buscar alternativas autóctonas, que permitan tratar este creciente problema de salud pública a nivel mundial. Ante este

panorama existen compuestos con propiedades antibióticas, producidos por bacterias como las ácido lácticas (BAL), entre las que se resalta las del género *Enterococcus*, que reciben el nombre de bacteriocinas, o enterocinas por su origen enterococico, las cuales son moléculas o péptidos extracelulares capaces de inhibir el crecimiento de bacterias relacionadas, a la vez que presentan la ventaja de ser biodegradables, por su composición proteica (Kirkup, 2006). El antagonismo entre bacterias, mediado por inhibidores proteicos, es un área de investigación relevante a nivel mundial, y se presenta como una posible opción para el tratamiento de las infecciones ocasionadas por bacterias resistentes a los antibióticos, permitiendo el desarrollo de alternativas priorizadas con beneficio al sector salud, industrial, alimentario y biotecnológico en general (Álvarez, 2011; Izquierdo et al., 2009; Brogden, 2005).

El propósito de esta investigación se basó en evaluar la actividad antibiótica de un inhibidor del grupo de enterocinas, encontrado en cepas autóctonas de la especie bacteriana *Enterococcus faecalis*, aislada de muestras de quesos y específicamente agrupado en los péptidos extracelulares no-lantibióticos de clase II, previamente caracterizado por el laboratorio de genética y biología molecular (LGBM), FEC-LUZ. Para ello se realizó la medición parcial de su actividad antagonica expresada en unidades arbitrarias de actividad por mililitro (UA/mL).

1. Materiales y metodología

1.1. Cepas bacterianas y condiciones de cultivo

Se estudió una cepa silvestre de *Enterococcus faecalis*, previamente aislada e identificada a partir de muestras de queso semiduro comercializados en el estado Zulia, Venezuela, y caracterizada por producir un péptido extracelular del grupo de bacteriocinas (enterocinas) del tipo no-lantibiótico de clase II, con propiedades inhibitorias frente a Gram positivas, cuyos determinantes genéticos asociados a su síntesis, se encuentran codificados en el cromosoma bacteriano. Fue catalogada para este estudio como *E. faecalis* Eq40. Se utilizaron como biocontroles indicadores de sensibilidad ante antibióticos (CLSI, 2014), a las estirpes Gram positivas *E. faecalis* ATCC®29212 y *S. aureus* subsp *aureus* ATCC®25923, para los estudios de susceptibilidad (CLSI, 2014). De igual forma se utilizó como control negativo de producción de bacteriocinas, la cepa ya referida ATCC®25923 y una cepa silvestre de *E. faecalis* Eq10, que es una estirpe de la misma especie que la Eq40. Todas las cepas fueron criopreservadas a -20°C con glicerol al 20%p/v, hasta su utilización (Ausubel *et al.*, 2002).

1.2. Evaluación de actividad antagonica de la cepa de *E. faecalis* Eq40

Para la medición de la actividad antagonica del péptido extracelular no-lantibiótico de clase II del grupo de las enterocinas, se evaluó la actividad residual de la cepa *E. faecalis* Eq40, de interés para este estudio, por ser productora de la exoproteína mencionada. Se utilizó el método en medio solido de difusión en pozos. A una placa de Petri que contenía 20mL de agar TSA (Tryptic Soy Agar, Merck®, Alemania) se le extrajeron “bocados” a modo de pozos con una pipeta Pasteur estéril. El medio TSA se inoculó previamente por hisopado con una alícuota de unas 10⁶UFC/mL según la escala de McFarland de la cepa sensible *E. faecalis* ATCC®29212, obtenida a partir de un cultivo de 24h, incubado en caldo infusión cerebro corazón (CICC) (HIMEDIA®, India) a 37°C. Se colocó en los pozos 50µL del cultivo de la cepa de *E. faecalis* autóctona a ensayar, y se incubó 24h a 37°C. Para evitar la formación de catabólitos inhibitorios no deseados en el CICC, que puedan generar un falso positivo, el tubo de cultivo de la cepa problema fue sellado con parafina y papel parafilm, para establecer una atmosfera con un bajo contenido de oxígeno, sumado al previo ajuste de pH con buffer fosfato a pH 7.4 (Sigma, EUA) (Pérez, 2004; Toi *et al.*, 2000).

1.3. Evaluación de la actividad antagonica de la cepa autóctona de *E. faecalis* según la cinética de crecimiento

Para ello se utilizó el protocolo propuesto por Zapata *et al.* (2009), con modificación en el tiempo de toma de muestras y evaluación de la actividad para el estudio de la actividad antagonica en medio sólido y líquido. Se inoculo 1mL de un cultivo de la cepa a evaluar (Eq40) en 9mL de caldo TSB (Tryptic Soy Broth, Merck®, Alemania) inoculado con la cepa biocontrol *E. faecalis* ATCC®29212. Las cepas se obtuvieron a partir de un cultivo de 24h, crecidas en caldo TSB a 37°C. El cocultivo establecido (Eq40+biocontrol) se incubó a 35°C. Seguidamente se tomó un inóculo de 100µL del cultivo cada 120min, diluido en 900µL de solución isotónica (NaCl al 0,9%) por un período de 48h, y se monitoreó el crecimiento bacteriano de la cepa Eq40, mediante recuento en placa, determinando el número de UFC/mL (para el ensayo en medio líquido) y según el aumento del halo de inhibición, medido en diámetro, aplicando el método en medio solido de difusión en pozos previamente señalado. Ambos ensayos se realizaron en función del tiempo y por triplicado.

Para observar el efecto antagonico de la cepa Eq40 sobre la cinética de crecimiento de representantes Gram positivos, se empleó para el estudio en medio solido el biocontrol *E. faecalis* ATCC®29212, y para el ensayo en medio liquido la cepa *S. aureus* subsp. *aureus* ATCC®25923, puesto que esta última, además de ser una bacteria Gram positiva sensible a los antibióticos, permite

su recuperación del cocultivo bacteriano por ser otra especie relacionada, y por ende su cuantificación. Para esta discriminación se utilizaron los medios de cultivos selectivos Agar Membrana Filtrante para enterococos (Merck®, Alemania) y el medio Agar Vogel Johnson (HIMEDIA®, India) para *S. aureus*.

1.4. Extracción parcial del péptido extracelular de la cepa autóctona de *E. faecalis* para el estudio y medición de la actividad antagónica

Una vez establecida y confirmada la actividad antimicrobiana asociada a antagonistas de origen extracelular en la cepa *E. faecalis* Eq40, se buscó obtener el péptido de la enterocina no-lantibiótica de clase II responsable de la actividad inhibitoria, para su posterior medición, empleando los mismos lineamientos propuestos para la confirmación de actividad antagónica mediante el método directo de difusión en pozos, frente a la cepa indicadora *E. faecalis* ATCC®29212, pero en este caso, con un diseño experimental basado en la utilización de los sobrenadantes o extractos crudos de bacteriocina (ECB) tras una centrifugación inicial 15min a 14.000rpm. Los sobrenadantes se sometieron a una precipitación con ácido tricloroacético (ATCA) (Sigma, EUA) siguiendo el procedimiento de Fath *et al.* (1994), modificado según los lineamientos propuestos por Dumont (2004). La concentración final de ATCA en el sobrenadante, fue del 10%v/v. Los ECB tratados y alícuotados en eppendorf, se incubaron en hielo durante 45min y posteriormente, se centrifugaron a 15.000rpm durante 15min.

Los sedimentos se lavaron con propanona (Sigma, EUA) al 100% preenfriada a -20°C para retirar el ATCA residual, este procedimiento se repitió tres veces, y posteriormente se resuspendió el ECB en una solución de buffer fosfato a pH 7.4 (Sigma, EUA). Finalmente, se depositaron 50µL de los concentrados en placas de agar TSA previamente inoculadas superficialmente con la cepa indicadora *E. faecalis* ATCC®29212, para luego ser incubadas 24h a 37°C. Al igual que lo indicado en la sección para la confirmación de actividad antagónica.

1.5. Determinación de las unidades arbitrarias de actividad por mililitro (UA/mL) del inhibidor No-Lantibiótico de Clase II de la cepa *E. faecalis* Eq40

La actividad antagónica tras la extracción parcial del péptido extracelular agrupado en las enterocinas no-lantibióticas de clase II, se evaluó arbitrariamente en unidades de actividad por mililitro (UA/mL) para lo que se aplicó la fórmula propuesta por Pérez (2004), con la que se define 1UA/mL como el inverso de la máxima dilución en la que se obtuvo un halo de inhibición igual o mayor a 0,5 mm: $UA/mL = (1/d) (1/m) (f)$. Dónde: UA = unidades de actividad, d = dilución donde se detecta un halo de inhibición de

0,5 mm, f = factor de conversión (1000 μL / 1 mL) y m = volumen de muestra (mL).

La actividad se evaluó estableciendo la dilución más alta en la que se observó un halo de inhibición igual o mayor a 0,5mm, según lo propuesto por Pérez (2004), cuando se disolvió una suspensión del ECB en un buffer fosfato a pH 7.4 (Sigma, EUA) luego de la remoción celular por centrifugación, y siguiendo el procedimiento de Fath *et al.* (1994), modificado según los lineamientos propuestos por Dumont (2004). La actividad inhibitoria resultante o residual observada tras las diluciones se determinó como se indicó en el punto 1.2, depositando 50 μL de las diluciones en pozos elaborados en placas de agar TSA previamente inoculadas superficialmente con la cepa indicadora *E. faecalis* ATCC®29212, para luego ser incubadas 24h a 37°C. Dicho ensayo se hizo por triplicado.

Pasado el periodo de incubación se evaluó la proporcionalidad de la dilución del compuesto antimicrobiano respecto al halo de inhibición, producido sobre la cepa sensible o indicadora *E. faecalis* ATCC®29212. Las diluciones realizadas y evaluadas del ECB fueron de 10^1 a 10^5 .

1.6. Análisis de resultados

Se determinó la proporcionalidad de la dilución de los compuestos no-lantibióticos de clase II respecto al halo de inhibición generado a partir de los ECB, y se evaluó el comportamiento de las UA/mL obtenidas, en relación al halo de inhibición observado, de acuerdo con el diseño experimental planteado. Para estos análisis se utilizó el paquete estadístico *Origin for Windows* versión 6.0. (Atencio *et al.*, 2009).

2. Resultados y discusión

Se encontró que la estirpe Eq40, seleccionada para la evaluación de su actividad antimicrobiana, ciertamente inhibió el crecimiento de la cepa relacionada empleada como indicador de sensibilidad *E. faecalis* ATCC®29212 (Figura 1) como se ha reportado y siguiendo el diseño experimental propuesto (Álvarez, 2011; Izquierdo *et al.*, 2009; Toi, 2000).

Los resultados obtenidos tras emplear cultivos de 24h de la cepa Eq40 sellados con parafina y papel parafilm, para establecer una atmosfera con un bajo contenido de oxígeno, sumado al previo ajuste de pH con buffer fosfato a pH 7.4, y el ensayo de cocultivo con la cepa catalasa positiva *S. aureus* subsp. *aureus* ATCC®25923, permiten corroborar que la actividad antagonica mostrada está asociada a productos inhibitorios no relacionados con

catabolitos de tipo fermentativos ni ácidos orgánicos. Además de señalar que el medio de cultivo TSA fue utilizado al ser ampliamente recomendado para detectar actividad antagónica mediada por enterocinas, por su composición proteica elevada y bajo contenido de carbohidratos fermentables, el medio garantiza la neutralización de los compuestos ácidos que se generen, lo que permite de igual manera descartar la participación de ácidos orgánicos en la actividad antimicrobiana (Bautista *et al.*, 2010, Toi *et al.*, 2000). Por ende se está en presencia de compuestos antagónicos que no se ven afectados por las condiciones experimentales establecidas en este ensayo como se ha reportado como las del tipo enterocinas (Martín *et al.*, 2006). Aunque se ha descrito que factores no considerados en este estudio como modificaciones del pH, temperatura y concentración de nutrientes, afectan considerablemente la biosíntesis de diversos tipos de bacteriocinas (Aasen *et al.*, 2000).

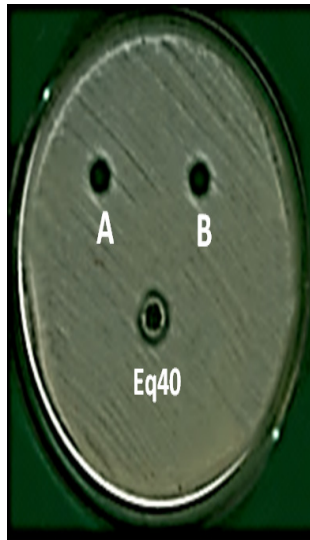


FIGURA 1. Prueba para la confirmación de la actividad antagónica de la cepa de *E. faecalis* Eq40 contra la cepa indicadora *E. faecalis* ATCC®29212.

Suspensión de la cepa Eq40 y su actividad inhibitoria (flecha blanca) sobre la cepa indicadora *E. faecalis* ATCC®29212 inoculada a modo de césped en la placa de medio TSA. A, cepa Eq10 (misma especie y control negativo para la producción de bacteriocinas) y B, cepa *S. aureus* ATCC®25923 (especie relacionada y control negativo para la producción de bacteriocinas). Posterior a la incubación 24h a 37°C con bajo suministro de oxígeno y pH 7.4.

2.1. Actividad antagonica de la cepa autóctona de *E. faecalis* según la cinética de crecimiento

Se observó un aumento progresivo en el halo inhibitorio mostrado por la cepa Eq40 de 6 a 10 mm de diámetro en términos de 48h, frente al microorganismo indicador *E. faecalis* ATCC®29212 luego del ensayo en cocultivos en medio sólido a 37°C y pH 7.4; la mayor actividad se alcanzó a las 24h (Figura 2) en fase logarítmica tardía, basados en la curva de crecimiento de la cepas evaluadas y empleando inóculos estandarizados según mediciones turbidimétricas establecidas previamente en función de la escala McFarland. Esta cinética típica de un metabolito primario asociado al crecimiento, se ha observado en la producción de bacteriocinas de bacterias lácticas como los enterococos (Zapata *et al.*, 2009; Herranz, 2000).

No obstante, también existen casos en los que la máxima actividad antimicrobiana se alcanza durante la fase estacionaria del crecimiento, momento en el que los nutrientes comienzan a escasear y la producción de metabolitos con actividad antimicrobiana puede conferir una ventaja en la competición por los sustratos limitantes (Herranz, 2000).

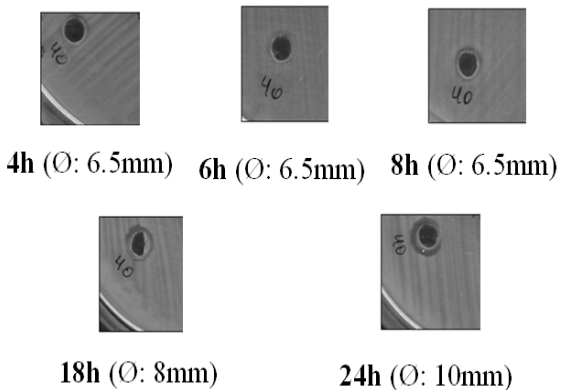


FIGURA 2. Actividad antagonica de la cepa de *E. faecalis* Eq40 según la cinética de crecimiento en medio sólido expresada en diámetro (Ø) y en términos de 24h.

Estos resultados se correlacionan con los reportados en investigaciones que indican que debido a que los antagonistas de origen ribosómico son en su mayoría metabolitos estrechamente afectados por la cinética de crecimiento, se logra una mejor producción mediante la optimización de las condiciones de crecimiento del microorganismo productor, sin prescindir de su presencia (Aymerich *et al.*, 2000).

Del mismo modo en los ensayos empleando medios de cultivo líquidos de propósito general, a 37°C y pH 7.4, se observó cómo se reducía la población de la cepas indicadora *S. aureus* subsp. *aureus* ATCC®25923, cuando fue cocultivada con la cepa Eq40, con una disminución en el número de unidades formadoras de colonias por mililitro (UFC/mL) en promedio desde $3,0 \times 10^{10}$ hasta unas 1×10^9 UFC/mL, en términos de 24h (Figura 3).

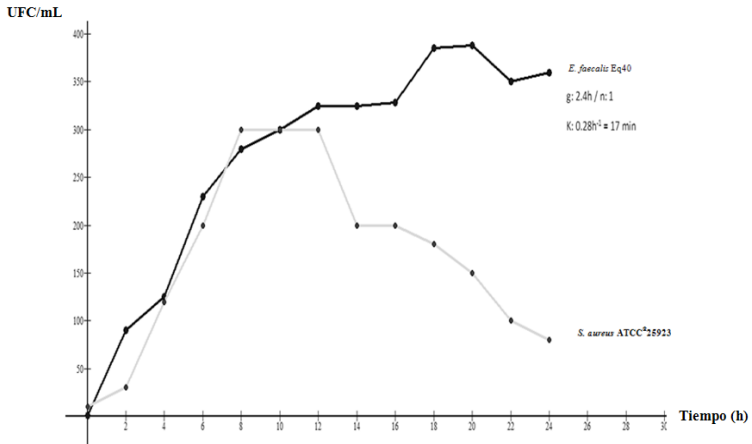


FIGURA 3. Cinética de crecimiento y actividad antimicrobiana del antagonista extracelular de la cepa *E. faecalis* Eq40 en medio líquido.

Número de UFC/mL (eje Y) de la cepa indicadora *S. aureus* ATCC®25923 (línea gris de puntos negros), en términos de 24h (eje X), en cocultivos frente a la cepa evaluada Eq40 (líneas negra).

En ambos ensayos (cocultivos en medio sólido y medio líquido) se apreció un descenso de la actividad antimicrobiana transcurrido el tiempo descrito, lo cual es un fenómeno que se ha observado en la mayoría de las bacteriocinas caracterizadas. No obstante, existen excepciones demostradas por otros autores, ya que en algunos ensayos la actividad antimicrobiana de las bacteriocinas se mantiene relativamente constante y estable durante un tiempo considerable (Aymerich *et al.*, 2000; Krier *et al.*, 1998). En este sentido Herranz (2000) y De Vuyst *et al.*, (1996) señalaron que, en general, la tasa de inactivación de las bacteriocinas es mayor en los cultivos con pH estabilizado, como sucedió en este estudio.

La cepa Eq40 presentó en este estudio un efecto inhibitorio tanto sobre la cepa indicadora *E. faecalis* ATCC®29212, así como también frente a la especie *S. aureus* subsp *aureus* ATCC®25923 al igual que lo reportado para exotoxinas relacionadas del género *Enterococcus* (Izquierdo *et al.*, 2009).

La actividad antagonica se corresponde con las características descritas para estirpes productoras de bacteriocinas del género y se ha asociado a la interacción con ácidos teicoicos y lipoteicoicos de la pared de las bacterias Gram positivas (Álvarez, 2011).

Estos resultados coinciden con estudios en los que se establecieron las condiciones óptimas para el control de microorganismos patógenos usando cocultivos en diversos sistemas alimentarios ensayados, evaluando cepas del género *Enterococcus* productoras de bacteriocinas frente a estirpes relacionadas como *S. aureus* (Muñoz *et al.*, 2007).

La heterogeneidad del espectro de acción antimicrobiano obtenido, se relaciona con lo descrito en la literatura (Cintas *et al.*, 2001). Se reporta que compuestos con este comportamiento, poseen un espectro de acción denominado intermedio, al ser capaces de inhibir a otras cepas distintas al microorganismo productor, incluyendo a miembros del género *Staphylococcus* (Salinas, 2001).

La disminución de la actividad antimicrobiana con el paso del tiempo, puede deberse a la inestabilidad de la bacteriocina a un pH determinado puesto que estas se ven favorecidas o responden más eficientemente a parámetros específicos, también puede corresponder a una degradación proteolítica, he incluso a causa de adsorción por parte de las células productoras. La inactivación de las bacteriocinas por enzimas proteolíticas, liberadas principalmente durante la fase estacionaria, sería otra causa que explicaría la disminución de la actividad antimicrobiana, ya que la producción y/o la actividad de estos antagonistas tiende a ser pH dependiente (Herranz, 2000).

La adsorción de las bacteriocinas a las células productoras es un proceso inespecífico, dependiente del pH y que, probablemente, implica la interacción con los ácidos lipoteicoicos de la pared celular (Aymerich y col., 2000). Se ha determinado que a un pH próximo al fisiológico, se promueve la adsorción de bacteriocinas a las respectivas células productoras, mientras que a pH ácido no se observaba dicho fenómeno, variando ampliamente a pH alcalino (Herranz, 2000).

El hecho de que la actividad antimicrobiana disminuya una vez alcanzado un valor máximo, que depende de la cepa productora y de las condiciones de cultivo, implica que existe un momento en el que la producción cesa y comienza un proceso de degradación o inactivación. La inestabilidad de la actividad antimicrobiana implica que para lograr un rendimiento óptimo de producción de bacteriocinas es imprescindible obtenerlas inmediatamente después de detectar el máximo de actividad, utilizar condiciones que minimicen la agregación o la adsorción, o bien, retirarlas de manera continua del caldo; empleando por ejemplo: adsorbentes o métodos sustitutos a la centrifugación (Herranz, 2000; De Vuyst *et al.*, 1996).

2.2. Extracción parcial del péptido extracelular no-lantibiótico de clase II de la cepa *E. faecalis* para el estudio y medición de la actividad antagonista en unidades arbitrarias de actividad por mililitro (UA/mL)

El antagonista bacteriano de la cepa *E. faecalis* Eq40, se extrajo parcialmente de sobrenadantes obtenidos a partir de cultivos en fase logarítmica tardía de la cepa evaluada, empleando una modificación del procedimiento descrito por Fath *et al.*, (1994), y siguiendo los lineamientos propuestos por Dumont, (2004) y utilizado por Suárez *et al.*, (2008). Este procedimiento se basó en la precipitación proteica con el empleo de solventes que garantizan la estabilidad de las moléculas bacteriocigénicas, de tipo enterocinas, para su posterior vehiculización en soluciones hidroalcoholadas con pH ajustado. En el ensayo de actividad antimicrobiana en placas, se evidenciaron halos de inhibición (Figura 4).

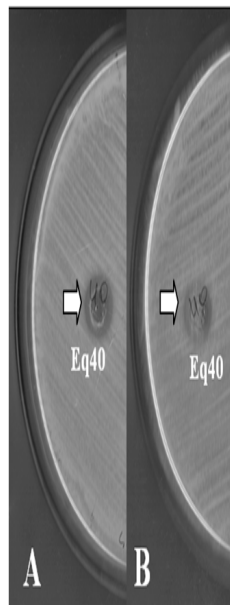


FIGURA 4. Actividad antibacteriana del péptido extracelular no-lantibiótico de clase II de la cepa silvestre *E. faecalis* Eq40 posterior a su extracción parcial con ATCA.

Halos inhibitorios mostrados por la cepa evaluada (Eq40) en términos del primer nivel de dilución y empleando un volumen de ECB de 50µL. A, *S. aureus* ATCC®25923; B, *E. faecalis* ATCC®29212 (cepas usadas como indicadores de actividad).

Los resultados obtenidos permitieron apreciar un aumento en la actividad antagonica mostrada inicialmente por los ECB al ser empleados luego de su precipitado tras la adición de ATCA al 10%p/v, y su posterior remoción con la adición de una solución de propanona al 100% preenfriada, en términos del primer nivel de dilución 1:10 y en base a un volumen de ECB de 50µL. El incremento en la actividad se vio evidenciado por un aumento en mm de 6 a 11 para la cepa Eq40 (Figura 4), tanto frente a el indicador *E. faecalis* como ante *S. aureus*. Este aumento de la actividad concuerda con lo reportado por diversos autores quienes señalan que al emplear el ATCA se evidencia un aumento en la actividad de las bacteriocinas, lo cual se debe a la capacidad de las exoproteínas con actividad antagonica para mantener sus estabilidad a bajos rangos de pH (Suárez *et al.*, 2008; Dumont, 2004).

Es importante señalar que el hecho de que los diámetros de los halos inhibitorios mostrados por la cepa Eq40 sean similares luego del tratamiento con ATCA, para *E. faecalis* ATCC®29212 y *S. aureus* ATCC®25923, es indicio de que el péptido extracelular no-lantibiótico de clase II es un compuesto antagonico que se comporta de manera análoga frente a los mismos microorganismos indicadores y ante la condiciones de pH, exhibidas por el protocolo.

Al realizar mediciones de pH posterior al tratamiento con ATCA, se pudo apreciar que este se mantuvo entre 7,5 y 8,5, rango tolerable por las cepas del género *Enterococcus* y mediado quizás por la peptona del medio TSA, ya que la alta concentración proteica de este medio de cultivo, y el bajo contenido de carbohidratos fermentables, garantiza con la liberación de amoníaco (NH₃) el aumento del pH y la neutralización del posible ATCA residual, en base a esto, y aunado al hecho de que se observó la inhibición de todas las cepas Gram positivas probadas, se puede inferir que la actividad antagonica esta mediada por el péptido extracelular no-lantibiótico de clase II, y no está asociada al compuesto germicida y queratolítico usado ATCA (Bautista *et al.*, 2010).

Con relación al comportamiento en UA/mL del péptido extracelular no-lantibiótico de clase II respecto al halo de inhibición, se observó que es aproximadamente lineal (con un ajuste de R² 0,9288) a partir de un halo de inhibición de 6 mm de diámetro, correspondiente a la dilución 10⁵ la cual fue la más alta con actividad visible, y que corresponde a una concentración de 30,6 UA/mL y como lo demuestra la correlación entre las UA/mL y la actividad inhibitoria (Figuras 5 y 6). En relación con el aumento del nivel de dilución del compuesto antagonico el halo de 14 mm corresponde a la concentración de 181,7 UA/mL. La cepa *E. faecalis* ATCC®29212 se usó como indicador de actividad. Diluciones mayores implicaron la pérdida total del

halo de inhibición. Tal efecto puede deberse a una falta de sensibilidad del método para detectar variaciones a bajas concentraciones de la bacteriocina. Del mismo modo, se han reportado posibles problemas en algunos otros aspectos del método como el tiempo de preincubación, el tamaño del pozo, el volumen de la muestra y la pureza del agar, entre otros, generando con ello falsos negativos (De Vuyst *et al.*, 1996).

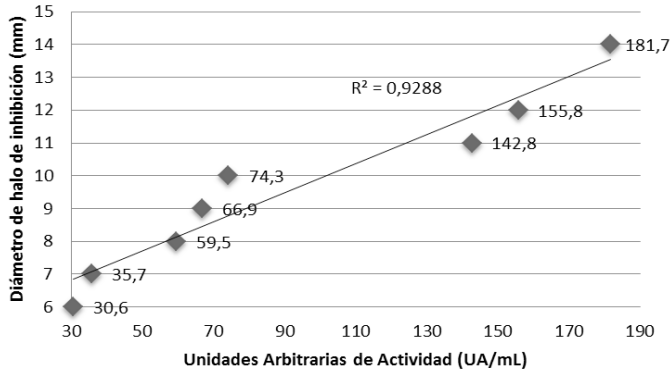


FIGURA 5. Correlación entre el diámetro del halo inhibitorio y las unidades arbitrarias de actividad por mililitro (UA/mL) del péptido extracelular no-lantibiótico de clase II de la cepa autóctona *E. faecalis* Eq40.



FIGURA 6. Diluciones del péptido extracelular no-lantibiótico de clase II de la cepa autóctona *E. faecalis* Eq40 para su medición en unidades arbitrarias de actividad por mililitro (UA/mL) frente a la cepa *E. faecalis* ATCC®29212.

Puesto que la proporcionalidad se presentó a partir de la dilución 10^5 , la cual generó un halo de inhibición de 6 mm, mayor a lo requerido por el método de Pérez (2004), se tomó este valor para definir una unidad arbitraria de actividad por mililitro de extracto crudo (UA/mL), por lo que como se mencionó: $1 \text{ UA} / \text{mL} = (10/5) (1/0,050 \text{ mL}) = 40$.

El valor 0,050 representa el volumen de extracto depositado en el pozo. El cálculo anterior indica que un halo de 6 mm es generado a partir de un ECB que contiene una actividad equivalente a 30-40 UA/mL para estos antagonistas exoproteicos de origen ribosómico, resultado muy similar a lo reportado por Germond *et al.*, (2002).

Los resultados tras las diluciones mostraron la disminución gradual en el halo inhibitorio desarrollado por el ECB de la cepa evaluada en relación con el aumento del nivel de dilución del compuesto bacteriocigénico. La dilución del ECB fue de 10^1 a 10^7 (pozos 1-7), se empleó como control el ECB sin diluir (c, en el interior de la placa).

Cabe destacar que el número de UA/mL obtenidas corresponden a la actividad inhibitoria sobre la cepa indicadora *E. faecalis* ATCC®29212; si se deseara aplicarla sobre otro microorganismo indicador, se ha propuesto que habría que determinar del mismo modo las UA/mL, debido a que cada cepa y especie bacteriana sensible a la misma bacteriocina, presenta un grado de inhibición particular, aunque puede extrapolarse los resultados en bacterias de un mismo género y/o cercanamente relacionadas (Pérez, 2004). Para todos los biocontroles ensayados el ECB producido por la cepa Eq40 exhibió una actividad máxima de entre unas 100 y 150UA/mL, presentaron halos de inhibición definidos hasta la dilución 10^6 , y alcanzando una máxima potencia de unas 180UA/mL (Figura 6).

Estos resultados son similares a los parámetros de actividad inhibitoria reportado en UA/mL para bacteriocinas del género como la enterocina 96, la cual inhibe con unas 100UA/mL de forma equivalente a las estirpes del género *Enterococcus* y *Staphylococcus* empleando extractos parcialmente purificados de cepas de *E. faecalis* (Izquierdo *et al.*, 2009). Concentraciones similares también se han reportado en antagonistas como la enterocina B, siendo altamente sensibles las estirpes propias del género *Enterococcus* (Casas *et al.*, 1997). Sin embargo, los resultados obtenidos difieren en las concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) obtenidas para bacteriocinas del género como la enterolisina A, las cuales son mucho mayores, encontrándose alrededor de unas 1000UA/mL para gran parte de los entes microbianos ensayados (Nilsen *et al.*, 2003).

A pesar de que el espectro de acción antibacteriano de la cepa Eq40 está restringido a Gram positivas, es importante señalar que puede por ende, ser capaz de inhibir el crecimiento de estirpes como *S. aureus* M03A-07, tipificada como una cepa resistente a betalactámicos semisintéticos como metilina

(Rivera *et al.*, 2011). Por lo que con miras a una futura aplicación para el control de patógenos, se recomienda el empleo de métodos que permitan una extracción más eficiente de estos compuestos en cepas autóctonas de *E. faecalis* para poder aplicar conocimientos en proteómica que permitan caracterizar la molécula por electroforesis en geles de poliacrilamida, para determinar así la secuencia aminoacídica del compuesto antagónico y contribuir con su caracterización.

Conclusiones

Se encontró que la estirpe autóctona Eq40, es capaz de inhibir el crecimiento de cepas relacionadas gracias a la producción de un compuesto antagónico extracelular que puede ser explotado como una posible opción para el tratamiento de las infecciones ocasionadas por bacterias resistentes a los antibióticos.

Apesar de que la actividad antagónica estudiada del péptido extracelular no-lantibiótico de clase II, producido por la cepa enterocócica Eq40 es constitutiva y estable, y no sufrió cambios significativos en el número de UA/mL obtenidas en los diversos ensayos en medio sólido y líquido empleados, se recomienda el empleo de otros métodos y/o técnicas de purificación que permitan una extracción más eficiente de este compuesto bacteriocigénico.

La actividad antagónica del compuesto analizado puede considerarse para una futura aplicación en pro del control de patógenos como *E. faecalis* y *S. aureus*, permitiendo el desarrollo de alternativas priorizadas con beneficio al sector salud, industrial, alimentario y biotecnológico en general, conforme se realicen más estudios, se incrementen los avances biotecnológicos y se establezcan sus mecanismos de acción.

Referencias

- Aasen, I., Moretro, T., Katla, T., Axelsson, L., Storro, I. (2000). Influence of complex nutrients, temperature and pH on bacteriocin production by *Lactobacillus sakei* CCUG 42687. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 53(2): 159-166.
- Álvarez, C. (2011). Aspectos de seguridad de *Enterococcus faecium* MXVK29 y *Enterococcus faecalis* MXVK22 aislados de productos cárnicos y caracterización molecular de sus bacteriocinas. (Tesis Doctoral). Distrito Federal, México: Universidad Autónoma Metropolitana. 121 p.
- Atencio, L., Rivera, J., Aranaga, V., Navarro, C., Guíñez, J. (2009). Caracterización de plásmidos y de la susceptibilidad a antibióticos en cepas de *Micrococcus* sp. *Bol. Centro Invest. Biol.*, 43(1): 77-95.
- Ausubel, F., Brent, R., Kingston, R., Moore, D., Seidman, J., Smith, J., Struhl, K. (2002). Short protocols in molecular biology: a compendium of methods from

Current protocols in molecular biology. Hoboken. 3 rd. ed. New York: Wiley. 232 p.

- Aymerich, M., Artigas, M., Garriga, M., Monfort, J., Hugas, M. (2000). Effect of sausage ingredients and additives on the production of enterocins A and B by *Enterococcus faecium* CTC492. Optimization of *in vitro* production and antilisterial effect in dry fermented sausages. *J Appl. Microbiol.*, 88 (4): 686-694.
- Bautista, A., Álvarez, C., Ponce, A. (2010). Evaluación del efecto antimicrobiano *in vitro* del extracto crudo de bacteriocina en combinación con conservadores químicos utilizados en la industria cárnica. *NACAMEH.*, 4(2): 69-84.
- Brogden, K. (2005). Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? *Nat. Rev. Microbiol.*, 3(3): 238-250.
- Casaus, P., Nilsen, T., Cintas, L., Nes, I., Hernández, P., Holo, H. (1997). Enterocin B, a new bacteriocin from *Enterococcus faecium* T136 which can act synergistically with enterocin A. *Microbiology.*, 143(7): 2287-2294.
- Cintas, L., Casaus, M., Herranz, C., Nes, I., Hernández, P. (2001). Review: Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria. *Food Sci Technol Int.*, 74(4): 281- 305.
- Clinical and Laboratory Standards Institute -CLSI. (2014). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Twenty-first informational supplement M100-S24. USA: CLSI Editor. 230 p.
- De Vuyst, L., Callewaert, R., Crabbè, K. (1996). Primary metabolite kinetics of bacteriocin biosynthesis by *Lactobacillus amylovorus* and evidence for stimulation of bacteriocin production under unfavorable growth conditions. *Microbiology.*, 142(4): 817-827.
- Dumont, F. (2004). Producción inducible de lactococina a, pediocina pa-1, colicina v e interleuquina-2 en cepas de *Lactococcus lactis* productoras de nisina. Tesis Doctoral. Universidad Complutense de Madrid, Facultad de Veterinaria, Departamento de Nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos. Madrid, España. 223 p.
- Fath, M., Zhang, L., Rush, J., Kolter, R. (1994). Purification and characterization of colicin V from *Escherichia coli* culture supernatants. *Biochemistry.*, 33(22): 6911-6917.
- Germond, J., Marciset, O., Mollet, B. (2002). Bacteriocinas de *Streptococcus thermophilus*. société des produits nestlé S.A. Oficina española de patentes y marcas. Número de publicación: ES 2 165 860 T3. Case postale 353. 1800 Vevey, CH. 27 p.
- Herranz, C. (2000). Caracterización bioquímica y genética de enterocinas producidas por cepas de "*Enterococcus faecium*" de origen cárnico: optimización de la producción molecular de acción de la enterocina p de "*Enterococcus faecium*" p13. Tesis Doctoral. Universidad Complutense de Madrid, Facultad de Veterinaria. Departamento de Nutrición y Bromatología III. Higiene y Tecnología de los Alimentos. 327 p.
- Izquierdo, E., Wagner, C., Marchioni, E., Aoude, D., Said, E. (2009). Enterocin 96, a novel class II bacteriocin produced by *Enterococcus faecalis* WHE 96, isolated from munster cheese. *Appl. Environ. Microbiol.*, 75 (13): 4273-4276.

- Kirkup, B. (2006). Bacteriocins as oral and gastrointestinal antibiotics: theoretical considerations, applied research, and practical applications. *Curr. Med. Chem.*, 13(27): 3335-50.
- Krier, F., Revol, A., Germain, P. (1998). Influence of temperature and pH on production of two bacteriocins by *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* FR52 during batch fermentation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 50(3): 359-363.
- Martín, A., Valdivia, E., Ruiz, M., Soler, J., Martín, M., Maqueda, M., Martínez M. (2006). Characterization of antimicrobial substances produced by *Enterococcus faecalis* MRR 10-3, isolated from the uropygial gland of the hoopoe (*Upupa epops*). *Appl. Environ. Microbiol.*, 72(6): 4245-4249.
- Muñoz, A., Ananou, S., Gálvez, A., Martínez, M., Rodríguez, A., Maqueda, M., Valdivia E. (2007). Inhibition of *Staphylococcus aureus* in dairy products by enterocin AS-48 produced in situ and ex situ: bactericidal synergism through heat and AS-48. *International Dairy Journal.*, 17(7): 760-769.
- Nilsen, T., Ingolf, F., Nes, I., Holo, H. (2003). Enterolysin A, a cell wall-degrading bacteriocin from *Enterococcus faecalis* LMG 2333. *Appl. Environ. Microbiol.*, 69(5): 2975-2984.
- Pérez, M. (2004). Caracterización bioquímica y espectro de inhibición microbiana de las bacteriocinas producidas por *Lactobacillus buchneri* y *Lactobacillus paracasei*. Tesis doctoral. Universidad Autónoma Metropolitana. Unidad Iztapalapa, México. 164 p.
- Rivera, J., Mujica, I., Aranaga, V., Navarro, C., Zabala, I., Atencio, L. (2011). *Staphylococcus aureus* procedentes de quesos: susceptibilidad a antibióticos y su relación con plásmidos. *Rev. Cient.*, 21(3):202-210.
- Salinas, B. (2001). Producción de queso tipo blando, utilizando como cultivos iniciadores bacterias productoras de bacteriocinas. (Trabajo de Grado). Maracaibo: Universidad del Zulia. 145 p.
- Suárez, M., Francisco, A., Beirão, L. (2008). Influencia de bacteriocinas producidas por *Lactobacillus plantarum* sobre la vida útil de filetes del híbrido de *Cachama piaractus brachypomus* x *Colossoma macropomum* empacado al vacío. *Vitae*, 15(1):32-40.
- Toi, M., Franz, P., Dicks, T., Holzapfel, W. (2000). Preliminary characterization of bacteriocins produced by *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis* isolated from pig faeces. *J Appl. Microbiol.*, 88(3): 482-494.
- Zapata, S., Muñoz, J., Ruiz, O., Montoya, O., Gutiérrez, P. (2009). Aislamiento de *Lactobacillus plantarum* LPBM10 y caracterización parcial de su bacteriocina. *Vitae*, 16(1): 75-82.