

Caracterización parcial y estabilidad fisicoquímica de antagonistas bacterianos de origen ribosómico obtenidos de cepas silvestres de *Enterococcus faecalis*

Partial Characterization and Physicochemical Stability of Bacterial Antagonists of Ribosomal Origin Obtained from Wild Strains of *Enterococcus faecalis*

Lenin González-P., Gisela Reyes-H., Junior Medina-M.,
Jhoandry Rivera-S., Irene Zabala-D. y Lorena Atencio-Bracho

Laboratorio de Genética y Biología Molecular, Departamento de Biología,
Facultad Experimental de Ciencias, Universidad del Zulia, Apartado 526.
Maracaibo, Edo. Zulia, Venezuela. ibatencio@gmail.com

Resumen

Enterococcus faecalis es un microorganismo que forma parte de la microbiota del ser humano, capaz de sintetizar antagonistas que se han ensayados en antibioterapias, requiriendo avances en su estudio a nivel biotecnológico, y fisicoquímico. Por lo que el objetivo se centró en evaluar la estabilidad fisicoquímica de compuestos antagonistas obtenidos de bacterias de la especie *Enterococcus faecalis*. El compuesto fue tratado enzimáticamente para develar su origen. La estabilidad a pH se evaluó incubando sobrenadantes libres de células (SLC) a intervalos de 4 a 10, durante 24h, y para la temperatura, los SLC se trataron de -20°C a 100°C, a tiempos determinados. Para todos los casos se evaluó la actividad antagonista residual frente a *E. faecalis* ATCC®29212, comparando con blancos no tratados. Los resultados mostraron que la actividad antagonista

nica está mediada por exoproteínas, al inactivarse por enzimas proteolíticas, éstas son estables a variaciones de pH entre 4 y 9, y mantienen su actividad a intervalos de -20° a 45°C temperatura, siendo muy estables a la congelación. La actividad antimicrobiana evaluada, se asocia a antagonistas bacterianos de origen ribosómico, del grupo de las bacteriocinas, agrupadas en inhibidores No lantibióticos de clase II.

Palabras clave: *Enterococcus faecalis*, estabilidad fisicoquímica, antagonistas bacterianos, origen ribosómico.

Abstract

Enterococcus faecalis is a microorganism that forms part of the microbiota of the human being and is able to synthesize antagonists that have been tested in antibiotherapies; advances in their study on the physicochemical and biotech level are required. The objective was to evaluate the physicochemical stability of antagonistic compounds derived from bacteria of the species *Enterococcus faecalis*. The compound was treated enzymatically to reveal its origin. The pH stability was evaluated by incubating cell-free extracts (CFE) at intervals of 4 to 10, during 24h; regarding temperature, the CFEs were treated at -20°C to 100°C at certain times. In all cases, the residual antagonistic activity against *E. faecalis* ATCC®29212 was evaluated compared with untreated blanks. Results showed that the inhibitory activity is mediated by exoproteins. When inactivated by proteolytic enzymes, they are stable at pH variations between 4 and 9, retaining their activity at intervals of -20° to 45°C temperature, being very stable for freezing. The evaluated antimicrobial activity is associated with bacterial antagonists of ribosomal origin, bacteriocins grouped as class II non-lantibiotic inhibitors.

Keywords: *Enterococcus faecalis*, physicochemical stability, bacterial antagonists, ribosomal origin

Introducción

Enterococcus es un ente microbiano que forma parte de la microbiota propia del ser humano capaz de secretar antagonistas para inhibir el crecimiento de otras bacterias, relacionadas o no, dichas moléculas denominadas bacteriocinas (enterocinas en enterococos), se han estudiado para su uso como agentes terapéuticos (Kirkup 2006),

para combatir patógenos importantes, que causan infecciones cada vez más difíciles de tratar debido a la resistencia a antibióticos que han desarrollado algunos de estos patógenos (Silva et al. 2006).

Sin embargo, la existencia de pocos estudios, ha ocasionado que el número de estos compuestos recomendados formalmente por la Organización Mundial para la Salud (OMS) se haya reducido, considerándose que ésta tendencia comenzará a cambiar conforme se incrementen los avances biotecnológicos y se establezcan los mecanismos de acción, características fisicoquímicas y biológicas, de los antagonistas bacterianos detectados y parcialmente caracterizados (Cotter et al. 2005).

Sobre la base de lo anteriormente planteado, el objetivo de esta investigación fue evaluar el efecto del tratamiento con diversas proteasas y enzimas no proteolíticas, y la estabilidad frente a variaciones de pH y temperatura, de sobrenadantes con actividad antimicrobiana procedentes de cepas silvestres de *Enterococcus faecalis* según lo propuesto por diversos autores (Hernández 2002, Kang y Lee 2005, Zapata et al. 2009).

Materiales y métodos

Cepas bacterianas y condiciones de cultivo

Se estudiaron 9 cepas del género *Enterococcus*, previamente caracterizadas morfológicamente y bioquímicamente, que responden a la especie *E. faecalis*, aisladas de muestras de quesos del estado Zulia, Venezuela. Criopreservadas a -20°C en caldo nutriente (Difco™) con glicerol al 20% p/v (Aranaga-N et al. 2010), y almacenadas en el cepario del laboratorio de Genética y Biología Molecular, FEC-LUZ.

Caracterización de actividad antagonista de las cepas

Se realizó el método de difusión en pozos, empleando un diseño experimental basado en el uso de sobrenadantes libres de células (SLC) a partir de cultivos en fase logarítmica de las cepas, tratadas en anaerobiosis y con pH 7, depositados sobre una placa de agar TSA (Tryptic Soy Agar, Merck®, Alemania), previamente inoculada con una alícuota de un cultivo de 18h de la cepa indicadora *E. faecalis* ATCC® 29212. Posteriormente, las placas fueron incubadas 24 h a 37°C (Pérez 2004).

Determinación de la naturaleza proteica de los antagonistas exocelulares (enteriocinas)

El producto fue tratado con proteasas (Proteinasa K y Tripsina) (Sigma, EUA), y expuesto frente a la cepa Catalasa positiva *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* ATCC® 25923, la actividad residual se determinó según los mismos lineamientos planteados anteriormente para la detección de actividad antagonica, frente a la cepa indicadora *E. faecalis* ATCC® 29212 (CLSI M26-A 2012) tras el tratamiento de los extractos libres de células con las diversas enzimas (Kang y Lee 2005).

Estabilidad de los antagonistas a variaciones de pH

Se evaluó incubando, por duplicado, extractos libres de células depositados en eppendorf. Para ello se emplearon intervalos de pH de 4 a 10, durante 24 h. En todos los casos se cuantificó la actividad antagonica residual de cada una de las muestras, siguiendo lo establecido en las secciones anteriores (Hernández 2002).

Estabilidad de los antagonistas a variaciones de temperatura

Las muestras activas se repartieron en tubos eppendorf estériles, que se calentaron en baño de agua a diferentes temperaturas: 45°C, 50°C, 60°C durante 30 min, 20 min a 80°C, 10 min a 90°C y 100°C 5 min., dejando luego enfriar a temperatura ambiente. La estabilidad a bajas temperaturas se llevó a cabo con muestras tratadas a -20°C, -10°C y 4°C durante 24 h, y luego se ensayó la actividad residual según lo establecido en las secciones anteriores comparando con un blanco no tratado. De igual forma se probó la estabilidad a temperatura ambiente (25°C ±2) (Hernández 2002, Zapata et al. 2009).

Análisis estadístico

Se realizó la determinación del porcentaje de cepas con actividad bacteriocigénica, previo y posterior al tratamiento enzimático, y a variaciones de pH, temperatura. Para estos análisis se utilizaron los paquetes estadísticos *Statistic for Windows* versión 4.1 y *Origin for Windows* versión 6.0 (Atencio-B 2009).

Resultados

En relación con los fenotipos de actividad antagónica en los enterococos, se encontró que nueve de las cepas evaluadas mostraron actividad, visible por halos inhibitorios de unos 10 mm de diámetro, tras el ensayo con inóculos a partir de cultivos de unas 10^6 UFC/mL frente a la cepa indicadora *E. faecalis* ATCC® 29212. Al emplear el diseño experimental establecido, solo cuatro de los sobrenadantes libre de células (SLC) (Eq5, Eq40, Eq89 y Eq100) pertenecientes a la especie *E. faecalis*, mantuvieron su capacidad inhibitoria sobre el indicador (Figura 1).

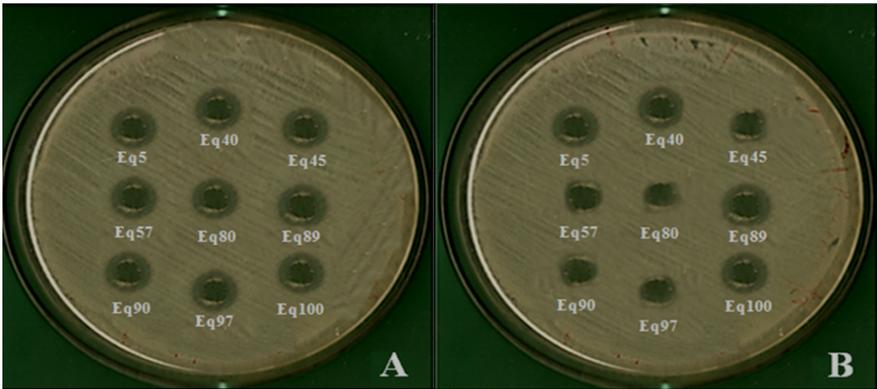


Figura 1. Prueba para detección de la actividad antagónica en cepas de *Enterococcus faecalis*. Se observa que solo los extractos libres de células de las cepas Eq5, Eq40, Eq89 y Eq100 mantuvieron su capacidad inhibitoria sobre la cepa indicadora *E. faecalis* ATCC® 29212; A, antes y B, posterior a la incubación en anaerobiosis, ajuste a pH 7, y posterior remoción celular (centrifugación).

En la determinación de la naturaleza proteica de estos antagonistas exocelulares secretados por las cepas de *E. faecalis* las enzimas proteolíticas tripsina y proteinasa K inactivaron totalmente la actividad antimicrobiana de los SLC de las cuatro cepas analizadas. Los controles positivos de actividad antagónica exocelular (SLC sin enzimas) mostraron actividad en todos los casos.

Por otro lado, durante la evaluación de la estabilidad a variaciones de pH de la actividad antimicrobiana de estos antagonistas exoproteicos, la actividad antagónica de los cuatro SLC, no presentaron cambios

significativos en su actividad, pudiéndose apreciar que las sustancias inhibitorias de tipo proteico producidas por las cepas de Eq5, Eq40, Eq89 y Eq100 conservan su actividad antimicrobiana a un amplio intervalo de pH (Tabla 1). Los controles de actividad antagónica tras ajuste de pH (soluciones madres de hidróxido de sodio y ácido sulfúrico, según sea el caso) no mostraron actividad luego del periodo de incubación de 24 h a 37°C.

Tabla 1. Efecto del pH y de la temperatura sobre la actividad antagónica de los sobrenadantes de las cepas silvestres de *Enterococcus faecalis*

Cepa(s)	pH							Temperatura (°C)					
	4,5	5,5	6,5	7,5	9	10	12	-10	-20	37	45	50	60
	Diámetro del halo inhibitorio (mm)							Diámetro del halo inhibitorio (mm)					
Eq5	6	8	10	10	9	-	-	6	6	9	7	-	-
Eq40	6	8	10	10	9	-	-	6	8	9	7	-	-
Eq89	8	9	10	10	11	-	-	8	8	9	8	-	-
Eq100	8	9	10	10	11	-	-	8	8	10	8	-	-

Se aprecia la actividad antagónica visible por la presencia de halos inhibitorios medidos en mm de diámetro de las cepas evaluadas Eq5, Eq40, Eq89, Eq100. Se empleó la cepa *Enterococcus faecalis* ATCC® 29212 como indicador de actividad, los controles correspondieron a las cepas, sin tratamiento para cada caso; -, resultados no determinados.

Los SLC no sufrieron variaciones significativas en su actividad, entre 4° y 45°C, manteniéndose estable a -20°C, tomando como control la actividad antagónica de los sobrenadantes incubados a 35 ± 2°C. La actividad antagónica se perdió en los cuatro sobrenadantes a > 45°C (Tabla 1).

Discusión

En relación con los fenotipos de actividad antagónica en los enterococos, al emplear el diseño experimental propuesto, solo los SLC Eq5, Eq40, Eq89 y Eq100 pertenecientes a la especie *E. faecalis*, mantuvieron su capacidad inhibitoria al igual que lo reportado para anta-

gonistas del género (Pérez 2004). La actividad mostrada inicialmente por las cepas restantes, es atribuible a antagonistas bacterianos que pueden ser afectados por las condiciones experimentales planteadas, ya que diversas especies de *Enterococcus*, secretan antagonistas proteicos constituidos por varios péptidos, que se ven alterados si varía la concentración de alguno de ellos tras la centrifugación (Platero et al. 2006). Otra posible explicación para la pérdida de los fenotipos de actividad antagónica observados inicialmente en los enterococos puede estar asociada a la inestabilidad de los compuestos a las condiciones establecidas de pH, temperatura y nutrientes, ya que estos factores son determinantes en la producción de cada tipo de antagonista bacteriano (Aasen et al. 2000, Bautista et al. 2010).

Las enzimas proteolíticas empleadas inactivaron totalmente la actividad antimicrobiana de los SLC de las cuatro cepas analizadas, lo que sugiere que el antagonismo presentado por las cepas *E. faecalis* (Eq5, Eq40, Eq89 y Eq100) está mediado por compuestos de naturaleza exoproteica. La pérdida de actividad antagónica observada tras el tratamiento con enzimas proteolíticas (Figura 2) corresponde con lo reportado para las moléculas denominadas enterocinas en el género *Enterococcus* (Kang y Lee 2005).

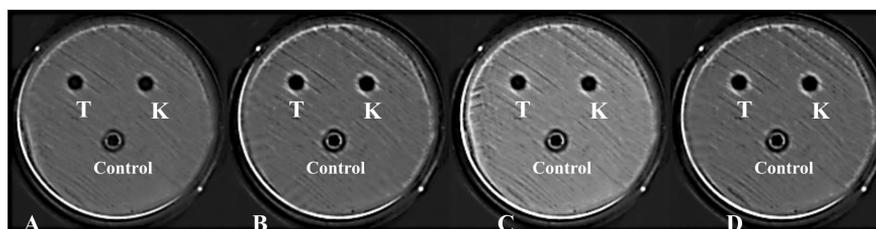


Figura 2. Actividad antimicrobiana de los antagonistas exocelulares de las cepas silvestres de *Enterococcus faecalis* frente a enzimas proteolíticas. Puede apreciarse la pérdida de la actividad antagónica de las cepas luego del tratamiento con enzimas proteolíticas; A, *Enterococcus faecalis* Eq5; B, *Enterococcus faecalis* Eq40; C, *Enterococcus faecalis* Eq89; D, *Enterococcus faecalis* Eq100; T, tripsina; K, proteinasa K. Se empleó la cepa *Enterococcus faecalis* ATCC® 29212 como indicador de actividad, los controles corresponden a las cepas sin tratamiento para cada caso.

La actividad antagonica de los cuatro sobrenadantes sometidos a pH ajustado a rangos diversos no sufrieron cambios significativos en su actividad, pudiéndose apreciar que las sustancias inhibitorias de tipo proteico producidas por las cepas evaluadas conservan su actividad antimicrobiana a un amplio intervalo de pH al igual que lo reportado (Tabla 1) (Cintas *et al.* 2000).

Las enteriocinas del genero *Enterococcus* pertenecientes a las clases I y II son generalmente activas a pH ácido y neutro, lo que podría reflejar su adaptación a las condiciones ambientales en las que se desarrollan estos microorganismos. La mayoría de las enteriocinas de bajo peso molecular pertenecientes a las clases mencionadas, son catiónicas a pH 7,0 lo que explica el aumento de la actividad antagonica a pH fisiológico sobre *E. faecalis* ATCC® 29212, ya que gran parte de estas moléculas son a su vez anfífilas a pH fisiológico, esto sugiere que dichos compuestos dirigen su acción hacia las membranas bacterianas en las que interaccionan con las estructuras cargadas negativamente conduciendo a su alteración (Cintas *et al.* 2000).

En relación a la estabilidad a variaciones de temperatura de la actividad antimicrobiana mostrada por los antagonistas exoproteicos en *Enterococcus*, los resultados señalan que la actividad antimicrobiana de las cepas está mediada por moléculas antagonicas exoproteicas no lantibioticas de clase II, por su termoestabilidad, especialmente frente a temperaturas bajo cero (Bautista *et al.* 2010, Herránz 2000), lo que permite agrupar a las moléculas antagonistas secretadas por las estirpes evaluadas, entre las subclases IIa, IIc y II d, debido a que lo observado se relaciona con la actividad descrita para las enteriocinas pertenecientes a estos subgrupos (Cintas *et al.* 2000).

Se ha reportado que las enteriocinas representantes de las clases I y II, resisten la exposición a un amplio intervalo de pH (3,0-9,0), habiéndose observado tolerancia a valores de pH más extremos (entre 1,0-2,0 y 10,0-11,0). Existiendo bacteriocinas que presentan un intervalo de pH óptimo para su actividad muy estrecho; así, por ejemplo, la bacteriocina modelo nisina, disminuye su solubilidad considerablemente a pH 2,0-6,0 y se inactiva irreversiblemente a pH 7,0 (Herránz 2000). Estudios realizados señalan que la mayor producción de enteriocinas o bien bacteriocinas del género *Enterococcus*, se presenta entre los intervalos de pH 6,0-7,5 (Marekova *et al.* 2003).

Lo anteriormente expuesto permite ubicar a los antagonistas exoproteicos producidos por las cepas Eq5, Eq40, Eq89 y Eq100 en moléculas no lantibióticas pertenecientes a la clase II, las cuales son activas a pH ácido, y tienden a mostrar un aumento de la actividad antagonista a pH fisiológico, manteniéndose estables en rangos \leq a pH 9 (Herránz 2000).

Las características fisicoquímicas exhibidas por los compuestos antagonistas de las cepas enterococicas estudiadas ponen en evidencia el potencial de este tipo de productos biológicos antibacterianos para ser considerados en el control de diversos patógenos. Requiriendo más estudios a nivel biotecnológico y fisicoquímico que permitan promover su manejo como alternativa antimicrobiana y contribuir en áreas prioritarias destinadas al fortalecimiento de la soberanía y seguridad alimentaria como la conservación de alimentos y en aquellas que garanticen la seguridad a nivel de salud pública nacional.

Conclusiones

La actividad antagonista de los sobrenadantes de las cepas analizadas está mediada por compuestos de naturaleza exoproteica, al ser inactivada totalmente por las enzimas proteolíticas. El antagonismo observado en las estirpes silvestres de *Enterococcus faecalis* es estable a amplios rangos de pH, y temperatura. La actividad antimicrobiana de las estirpes evaluadas, por sus características fisicoquímicas se encuentra asociada a la producción de antagonistas bacterianos de origen ribosómico, del grupo de las enteriocinas, agrupadas en inhibidores No lantibióticos de clase II.

Literatura citada

- AASEN I., T. MORETRO, T. KATLA, L. AXELSSON Y I. STORRO. 2000. Influence of complex nutrients, temperature and pH on bacteriocin production by *Lactobacillus sakei* CCUG 42687. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 53 (2): 159-166.
- ARANAGA-N., J. RIVERA-S., I. MUJICA DE F., C. NAVARRO-O., I. ZABALA-D. Y L. ATENCIO-B. 2010. Producción de β -lactamasas y plásmidos presentes en cepas de *Staphylococcus aureus* aisladas de portadores nasal sanos: estudio preliminar. *Boletín del Centro de Investigaciones Biológicas*. 44 (4): 461-476.

- ATENCIO-B., J. RIVERA, V. ARANAGA, C. NAVARRO Y J. GUIÑEZ. 2009. Caracterización de plásmidos y de la susceptibilidad a antibióticos en cepas de *Micrococcus* sp. Boletín del Centro de Investigaciones Biológicas. 43 (1): 77-95.
- BAUTISTA A., C. ÁLVAREZ Y A. PONCE. 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.
- CINTAS L., P. CASAUS, C. HERRANZ, L. HAVARSTEIN, H. HOLO, P. HERNÁNDEZ Y I. NES. 2000. Biochemical and genetic evidence that *Enterococcus faecium* L50 produces enterocins L50A and L50B, the sec dependent enterocin P, and a novel bacteriocin secreted without an N-terminal extension termed enterocin Q. *Journal of Bacteriology*. 182 (23): 6806-6814.
- CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). 2012. Methods for Determining Bactericidal Activity of Antimicrobial Agents; Approved Guideline. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; CLSI M26-A. ATCC® NUMBER: 29212™
- COTTER P., C. HILL Y R. ROSS. 2005. Bacteriocins: Developing innate immunity for food. *Nature Reviews of Microbiology*. 3 (10): 777-788.
- HERNÁNDEZ L. 2002. Caracterización parcial de la bacteriocina producida por *Pediococcus pawulus* MXVK133. Tesis de Maestría. División de Ciencias Biológicas y de la Salud. Universidad Autónoma Metropolitana. Unidad Iztapalapa, Distrito Federal, México, pp. 91.
- 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. Facultad de Veterinaria. Departamento de Nutrición y Bromatología III (Higiene y Tecnología de los Alimentos). Universidad Complutense de Madrid. pp. 327.
- KANG J. Y M. LEE. 2005. Characterization of a bacteriocin produced by *Enterococcus faecium* GM-1 isolated from an infant. *Journal of Applied Microbiology*. 98 (5): 1169-1176.
- KIRKUP B. 2006. Bacteriocins as oral and gastrointestinal antibiotics: theoretical considerations, applied research, and practical applications. *Current Medicinal Chemistry*. 13 (27): 3335-50.
- MAREKOVA M., A. LAUKOVA, L. DEVUYST, M. SKAUGEN Y I. NES. 2003. Partial characterization of bacteriocins produced by environmental strain *Enterococcus faecium* EK13. *Journal of Applied Microbiology*. 94 (3): 523-530.
- 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. pp. 164.

- PLATERO A., E. VALDIVIA, M. RUIZ-RODRIGUEZ, J. SOLER, M. VIVALDI, M. MAQUEDA Y M. BUENO. 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.
- SILVA J., L. ASSERELLA, N. BOLADOS, N. HERRERA Y J. LEYTON. 2006. Resistencia a antimicrobianos en cepas de *Enterococcus* sp. aisladas en hospitales del Norte de Chile. *Rev. Chilena Infec;* 23 (3): 226-231.
- ZAPATA S., J. MUÑOZ, O. RUIZ, O. MONTOYA Y P. GUTIÉRREZ. 2009. Aislamiento de *Lactobacillus plantarum* LPBM10 y caracterización parcial de su bacteriocina. *Vitae.* 16 (1): 75-82.