



“ACTIVIDAD ANTAGÓNICA DE MICROORGANISMOS MARINOS FRENTA A PATÓGENOS DE ORIGEN CLÍNICO Y SU PERMANENCIA EN LOS CULTIVOS DE ROTÍFEROS”

ANTAGONISTIC ACTIVITY OF MARINE MICROORGANISMS AGAINST PATHOGENS
OF CLINICAL AND STAY IN ORIGIN ROTIFER CULTURES

Carmen Ruíz¹
cruiz@imarpe.gob.pe

RESUMEN.-

Se evaluó la actividad antibacteriana de bacterias marinas aisladas de los cultivos de *Brachionus plicatilis* (rotífero) confrontadas con bacterias patógenas de origen clínico *Staphylococcus aureus* 25923 Gram (+) y *Escherichia coli* Gram (-) 25922. Solo tres bacterias formaron el halo de inhibición como interacción antagónica. Se les realizó a las tres bacterias la identificación bioquímica rápida con el API 20NE, resultaron ser *Vibrio alginolyticus*. Se observó la formación de halos de inhibición como respuesta antagónica que presentaron las bacterias en estudio frente a las cepas testigo mediante la técnica de doble capa

Palabras claves: colonia, bacterias patógenas, halo de inhibición, interacción antagónica, cultivo de rotífero.

ABSTRACT.-

The antibacterial activity of isolated from *Brachionus plicatilis* (rotifer) confronted with pathogenic bacteria of clinical origin *Staphylococcus aureus* 25923 Gram (+) and *Escherichia coli* 25922 Gram (-) marine bacteria was evaluated. Only three bacteria formed zone of inhibition as antagonistic interaction. They performed at three bacteria rapid biochemical identification using the API 20NE, were found to be *Vibrio alginolyticus*. Zone of inhibition were observed as antagonistic response showed bacteria in study versus control strains using the double-layer technique was verified

Key words: colony, pathogenic bacteria, zone of inhibition, antagonistic interaction, rotifer culture.

¹Licenciada en Biología, Magister en Biotecnología, Doctorado en Medio Ambiente en Desarrollo Sostenible. Investigadora en el Instituto del Mar del Perú IMARPE, Laboratorio de Patobiología y Sanidad Acuicola.

1. INTRODUCCIÓN.-

Los primeros estudios de bacterias marinas productoras de sustancias antibacterianas fueron realizados por Rosenfell y Zobell (1974). Desde entonces la búsqueda y aislamientos en los ecosistemas marinos de bacterias marinas con actividad antagónica sobre microorganismos de patógenos marinos y terrestres ha sido realizada por diversos hábitat, como agua de mar, sedimentos, fitoplancton, vertebrados e invertebrados. Toranzo *et al.*, (1982) Riquelme (1987).

Las interacciones antagónicas por bacterias que inhibe el crecimiento de microorganismos corresponden a un mecanismo que puede ayudar a mantener la composición de la especie bacteriana a nivel microescala. Lons & Azam (2001), ya sea por competencia de nutriente, espacio, luz y o a través de la producción de diversos metabolitos secundarios entre ellos sustancias antibacterianas Dopazo *et al.*, (1988) Lemos *et al.*, (1991).

El efecto antagónico es muy frecuente en el ambiente marino y presentes por varios grupos bacterianos Avendaño Herrera *et al.*, (2005). Se han identificado interacciones antagónicas entre bacterias pelágicas y entre aquellas aisladas de la nieve. Long y Azam (2001). También, bacterias asociadas a superficies de macroalgas Lemos *et.al.*, (1985).

En este sentido, la competencia por el espacio y los nutrientes básicos es una poderosa fuente selectiva que ha generado la evolución de variedades y adaptaciones efectivas en el hábitat bacteriano. La competencia por prevalecer las especies dentro de una la comunidad de microorganismos es una importante fuerza selectiva que promueve la biosíntesis de los compuestos antimicrobianos.

2. MATERIAL Y MÉTODOS

2.1. AISLAMIENTO DE BACTERIAS.-

Se trabajó con el remanente de las siembras del cultivo de *Brachionus plicatilis* en estrictas condiciones de asepsia.

Aislamiento de Bacterias Marinas

Se enriqueció cada cultivo por separado en agua peptona más 0.5 de Cloruro de Sodio, se cultivó a 25°C por 24 horas. Al día siguiente se le realizó diluciones 10^{-3} a la muestras del cultivo por separado y se plaqueo en agar Marino (AM), cada muestra de cultivo, se sembró por individual una asada por el método de agotamiento por estría en placas de agar marino a 25°C de 24 a 48 horas.

Una vez crecidas las colonias se seleccionó por sus características morfológicas: forma, color y textura. Se rotulo y se traspasó cada una al agar cepario para mantener y trabajar con ellas. Se obtuvo 30 colonias en total de los cultivos mencionados

Se les realizó la coloración GRAM a cada colonia aislada.

Activación de Bacterias Patógenas

Se activó en Agua Peptonada más Cloruro de Sodio las siguientes cepas patógenas: *Escherichia coli* (Gram -) y *Staphylococcus aureus* (Gram +). Estos organismos son parte de la Colección del Cepario de bacterias del Laboratorio de Ecología Microbiana de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

2.2. PRUEBAS DE EFECTO ANTAGÓNICO.

- a- Las placas de AM se dividió en 4, se sembró por puntura las colonias de los ceparios (sólidos) a 25°C por 24 horas
- b- Se activó de las bacterias patógenas a 37°C por 24 horas.
- c- Las placas con las bacterias en AM fueron sometidas a vapores de Cloroformo por un lazo de 1 hora dentro de la cámara de extracción.
- d- A las colonias seleccionadas se le realizó la técnica de doble capa para verificar la interacción antagónica

Método de agar por doble capa:

Las cepas patógenas, se le estandarizó por individual en medio líquido a Standard de Mc Farland 0,5 equivalente a 1×10^8 UFC/mL, luego se inocularon al TSA (semi solido a una temperatura de 55°C) 30 μ L (cepa testigo), se homogenizó y rápidamente es vertido a la placa de AM que contiene las bacterias nativas sembradas por puntura, se homogeniza para que el agar quede parejo. Se incubo a 37°C por 24 horas. Se realizó por segunda vez el proceso de la bicapa para corroborar la formación de halos.

2.3. CULTIVO DE ROTÍFERO EN VOLUMEN DE 10 L CON BIOENCAPSULACIÓN DE BACTERIAS ANTAGÓNICA.

El tratamiento duró un mes. Se trabajó en cultivos de rotíferos en baldes de 10 L de capacidad que fueron alimentados con la microalga *Isochrysis galbana*. Diariamente se le adicionó un inoculo líquido de 5 mL de bacteria con actividad antagónica B6 a escala Mc Farland, Se comenzó con 0.5 Mc Farland, semanalmente se fue incrementando la concentración hasta llegar 2 Mc Farland.

3. RESULTADOS

Se obtuvo 30 cepas, codificadas en dos grupos A1 al A15 y B1 al B15, La lectura de la coloración GRAM fue la siguiente: Se observó al microscopio el frotis de las muestras que presentaron forma de bastones, Gram (-) coloración rosada.

1° Procesamiento.

03 cepas presentaron halo de inhibición

La cepa B6 tuvo doble respuesta antagónica confrontada con las dos cepas *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* tipo ATCC ya que presentaron halo de 2,8cm y 3,5cm.

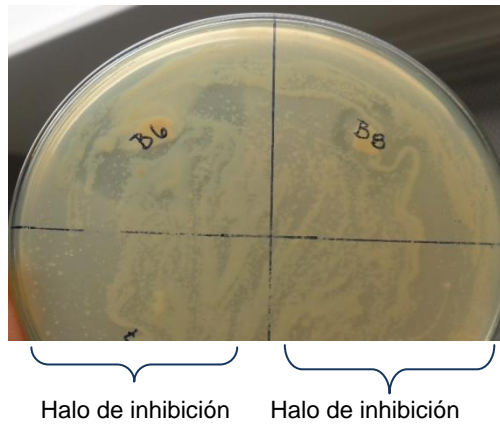


Figura 1. Técnica bicapa (doble capa)

2° Procesamiento.

En esta segunda parte las colonias B4, B6 y B8 se trabajó por duplicado, cada una confrontadas con las cepas *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* tipo ATCC, para tener mejores resultados y no halla contaminación. Se le realizó tratamiento con vapores de cloroformo por un segundo en la cámara de gases. La bacteria B4, en la primera placa respondió a *Escherichia coli* y a *Staphylococcus aureus*. La bacteria B6, en la primera placa respondió a *Staphylococcus aureus*, pero no *Escherichia coli*. La bacteria B8, en la primera placa respondió a *Escherichia coli* pero no *Staphylococcus aureus*.



Figura. 2. bacteria B4 inhibió a *Escherichia coli*

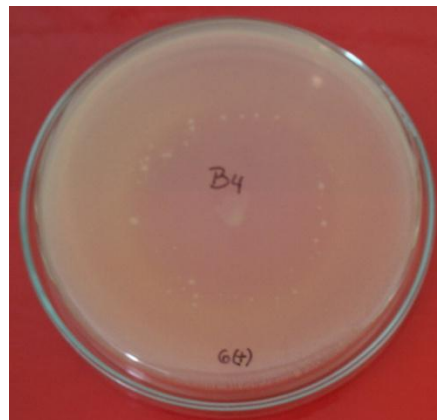


Figura. 3. bacteria B4 inhibió a *Staphylococcus aureus*.



Figura. 4. bacteria B6 no inhibió a *Escherichia coli*

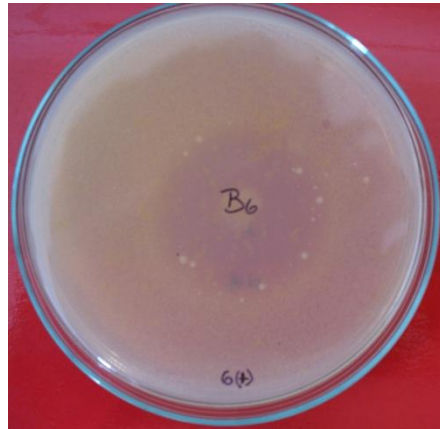


Figura. 5. bacteria B6 inhibió a *Staphylococcus aureus*.

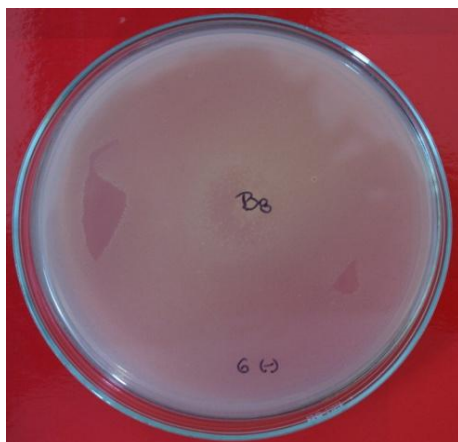


Figura. 6. bacteria B8 inhibió a *Escherichia coli*

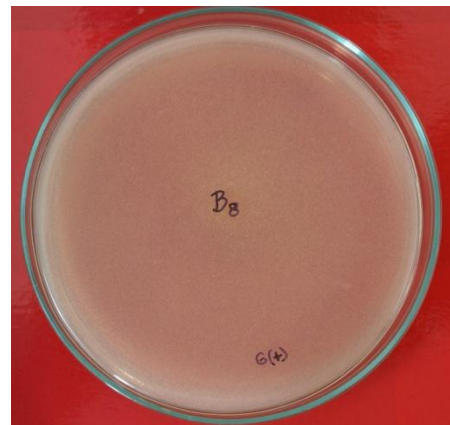


Figura. 7. bacteria B8 no inhibió a *Staphylococcus aureus*.

Las bacterias tuvieron las siguientes características: B4: Colonia redonda, transparente, pequeña (Crtp). B6 Colonia redonda blanquesina, pequeña (Crpb). B8 Colonia redonda, cremosa, mediana (Crcm). Se les realizó la prueba de oxidasa resultando (+). La identificación bioquímica con ayuda del KIT rápido API 20NE, incubada a 31°C por 24 y 48 horas. Se realizó las lecturas con el manual Api al 1º día y al 2º día, resultó *Vibrio alginolyticus*.

4. DISCUSIÓN

En este trabajo se utilizó técnicas ya manejadas por diversos investigadores Dopazo *et al.*, 1988; León *et al.*, (1988); Riquelme *et al.*, (1996), para la obtención de bacterias marinas con actividad inhibitoria. Se aisló cepas bacterianas a las que se purificaron y en placas se le adicionó la cepa testigo León *et al.*, (1988), esto nos ayudó a obtener el antagonismo microbiano deseado como una actividad de desplazamiento entre las bacterias ya sea por nutriente o por prevalecer dominante en el medio Riquelme *et al.*, (1996). De esta manera se recuperó la mayor cantidad de cepas y recién al final se realizó la identificación bioquímica, de esta manera se optimizó la cantidad de medio de cultivo

Por otro lado, Fredrickson *et al.*, (1981). La presencia de la bacteria del género *Vibrio alginolyticus*, aislada del remanente del cultivo de alimento vivo, confrontado con el

Flavobacterium psychrophilum presentó una respuesta antagónica y respondió a una competencia de nutriente y espacio. Algo similar en respuesta antagónica nos resultó con la bacteria B4 confrontada a *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* (cepas testigo), presenciando los halos de inhibición de 3,6 cm 5,0 cm. Las bacterias Gram positivas son más sensibles que las Gram negativas, León *et al.*, (1988), estas cepas testigos clínicas nos ayudan a una primera selección de efecto antagónico. La respuesta antagónica de la bacteria identificada fue *Vibrio alginolyticus*, nos pareció interesante ya que siempre la reportan como patógenas en hatchery de peces, de la misma manera Austin *et al.*, (1995) y Tamaru *et al.*, (1995) reportaron que existen Vibrionaceas productoras de sustancias antagónicas y han sido reportadas en escasas ocasiones.

5. CONCLUSIONES

Todos los microorganismos son parte constante y dominante de la población bacteriana asociada a los cultivos marinos.

Las bacterias que respondieron a la actividad antagónica son posibles potenciales probióticos.

Se requiere de estudios más complejos sobre la complejidad de estas interacciones antagónicas y del metabolismo del grupo bacteriano que fue inhibido.

6. AGRADECIMIENTO.

Instituto del Mar del Perú por los Laboratorio del Area Funcional de Acuicultura
Al MSc. Jorge León, Jefe de Laboratorio de Ecología Microbiana de la Universidad Nacional Mayor de San Marco.

7. LITERATURA CITADA.-

AUSTIN B, STUCKEY L, ROBERSTON P, EFFENDI I & GRIFFITH D. 1995. A probiotic strain of *Vibrio alginolyticus* effective in reducing diseases caused by *Aeromonas salmonicida*, *Vibrio anguillarum* and *Vibrio ordalii*. *Journal of Fish Diseases* 18: 93-96.

AVENDAÑO HERRERA R, LODY RIQUELME M. 2005. Producción de sustancias inhibitoria entre bacteria de biopelículas en sustratos marinos. *Revista de Biología Marina y Oceanografía*. 40(2) :117-125.

BIOMÉRIEUX SA. 2009/11. API 20 NE. Sistema de identificación de bacilos Gram negativos no enterobacterias. . Español-1. Ref 20050. France.

DOPAZO C, LEMOS M , BOLINCHES J, BARJA J , TORANZO A . 1988. Inhibitory activity of antibiotic-producing marine bacteria against fish pathogens. *Journal of Applied Bacteriology* 65: 97-

FREDRICKSON A G, STEPHANOPOULOS G.1981. Microbial competition. *Science* 213: 972-979.

- LEMOS ML, DOPAZO C, TORANZO A E, BARJA J. 1991. Competitive dominance of antibiotic-producing marine bacteria in mixed. *Journal Applied Bacteriology* 71: 228-232.
- LONG R, AZAM F. 2001. Antagonistic interactions among marine pelagic bacterial. *Applied and Environmental Microbiology* 67:4975-4983.
- LEMOS M, TORANZO A & BARJA J. 1985. Antibiotic activity of epiphytic bacteria isolated from intertidal seaweed. *Microbial Ecology* 11: 149-163.
- LEÓN J, GARCÍA P. 1998. Cepas nativas del Bacterioneuston y su actividad Inhibitoria de bacterias Ictiopatógenas. *Rev. Peruana de Biol.* 5 (1): 49-66.
- LEÓN J, TAPIA G, AVALOS R. 2005. Purificación parcial y caracterización de una sustancia antimicrobiana producida por *Alteromonas* sp. de origen marino. *Rev. Peru. biol.* 12(3): 359-368.
- RIQUELME C, FUKAMI K, ISHIDA Y. 1987. Annual Fluctuations of phytoplankton and bacterial communities in Maizuru bay and their interrelationship. *Bulletin of the Japanese Society of Microbial Ecology* 2: 29-37.
- ROSENFELD W, ZOBELL C 1947. Antibiotic production by marine microorganisms. *Journal Bacterial* 154:393398
- TAMARU T, ARAKI T, AMAGO H, MORI H & MORISHITA T. 1995. Purification and characterization of a extracellular B-1,4-mannanase from a marine bacterium, *Vibrio* sp. strain MA-138. *Applied and Environmental Microbiology* 61: 4454-4458.
- TORANZO A, BARJA J, HETRICK F. 1982. Antiviral activity of antibiotic-producing marine bacteria. *Can J. Microbiol.* 28: 231-238.