

ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE BACTERIAS ASOCIADAS AL CARACOL PALA (*Strombus gigas*) DE LA COSTA CARIBE COLOMBIANA

Claudia Ximena Moreno Herrera, Eliana Gómez Ocampo, Olga Pérez, Magally Romero, Gloria Ester Cadavid.

Grupo de Microbiodiversidad y Bioprospección. Laboratorio de Microbiología Industrial y Biología Celular y Molecular. Departamento de Biociencias, Facultad de Ciencias. Universidad Nacional de Colombia, sede Medellín. Calle 59A No 63-20 - Núcleo El Volador Medellín – Colombia. cxmoreno@unal.edu.co Teléfono 4309822

RESUMEN

El Caracol Pala, *Strombus gigas*, es de gran importancia ecológica y socioeconómica en el Caribe colombiano. Esta especie está catalogada como vulnerable y enfrenta un riesgo moderado de extinción a pesar de las medidas de control implementadas. Para ampliar el conocimiento científico para el desarrollo, manejo y la seguridad acuícola del caracol pala, es importante la comprensión de la ecología bacteriana de estos gastrópodos. Previamente, se ha realizado un estudio de la microbiota asociada al caracol pala de ejemplares colectados en el Caribe Colombiano, a partir de los aislamientos bacterianos obtenidos, fueron producidos extractos crudos a los cuales se les evaluó su actividad antimicrobiana *in vitro* contra diferentes blancos bacterianos. Se determinó que nueve de los extractos provenientes de *Psychrobacter* sp., *Pseudoalteromonas* sp., *Halomonas* sp., *Cobetia* sp. y *Vibrios* sp. presentaron actividad biológica contra uno o más de los blancos probados. Los extractos que mostraron alta actividad antimicrobiana, sin embargo, requieren de mayor análisis para identificar los compuestos activos responsables de ella. Esta información es complementaria a los estudios que se puedan implementar relacionados con procesos biotecnológicos y de conservación de las poblaciones de caracol pala del Caribe Colombiano.

Palabras clave: Bacterias, Caracol pala, Antimicrobiana, Microbiota.

ABSTRACT

Antimicrobial activity of bacteria associated queen conch (*Strombus gigas*) of the Colombian Caribbean coast. The queen conch, *Strombus gigas*, is of great ecological and socio-economic area in the Colombian Caribbean. This species is listed as vulnerable and faces a moderate risk of extinction despite the control measures implemented. To expand scientific knowledge for the development, management and security of the queen conch aquaculture is important to the understanding of bacterial ecology of these gastropods. Previously, it has made a study of the microbiota associated with queen conch specimens collected in the Colombian Caribbean, from the bacterial isolates were obtained crude extracts of which were assessed *in vitro* antimicrobial activity against different bacterial targets. It was determined that nine of the extracts from *Psychrobacter sp.*, *Pseudoalteromonas sp.*, *Halomonas sp.*, *Cobetia sp.* and *Vibrio sp.* showed biological activity against one or more of the targets tested. The extracts showed high antimicrobial activity require further analysis to identify the active compounds responsible for it. This information is complementary to studies that can be implemented related to biotechnological processes and conservation of populations of the Colombian Caribbean conch.

Keywords: Bacteria, conch, Antimicrobial, Microbiota.

INTRODUCCIÓN

Uno de los mayores argumentos para la preservación de la biodiversidad, es el aprovechar su potencial biotecnológico en la búsqueda de nuevos productos. El mundo marino es extraordinariamente diverso, y nos brinda la posibilidad de descubrir en él cada día algo nuevo. Los organismos eucariotas que habitan las superficies marinas, esponjas, corales, moluscos, etc., hospedan microorganismos capaces de desarrollar respuestas adaptativas frente a la colonización por competidores. La producción de toxinas, moléculas de señalización y metabolitos secundarios por estos microbios (Debashish *et al.*, 2005), son la base para el descubrimiento de nuevos agentes terapéuticos y moléculas bioactivas, con futuras aplicaciones biotecnológicas.

La diversidad microbiana asociada a esponjas, corales y moluscos es de creciente interés, pero en realidad son pocos los organismos marinos que han sido investigados y muchos los hospederos que aguardan por ser explorados. Estudios recientes sugieren que microbios asociados a la superficie de los sedimentos colonizan hospederos específicos formando comunidades diferentes de acuerdo a la especie colonizada, además se ha demostrado que algunos metabolitos descubiertos en invertebrados marinos son similares a los aislados previamente en bacterias (Pérez Matos *et al.*, 2007).

El caracol pala un gastrópodo que habita en aguas de las costas del mar Caribe (Brownell y Stevely, 1981), no es la excepción y actualmente tenemos una idea más próxima de cuán diversa puede ser su microbiota. Estudios previos relacionados con la ecología del caracol y la identificación molecular de las poblaciones microbianas asociadas a este molusco han provisto una visión más clara de las familias bacterianas presentes en él, incluso de aquellas que hasta el momento no han sido aisladas en cultivo (Acosta *et al.*, 2009), sin embargo es poco en realidad lo que se sabe sobre estas bacterias por lo tanto la investigación continua, hacia un estudio más completo y sus posibles aplicaciones.

Los estudios previos sobre el caracol pala han sido motivados por circunstancias que amenazan continuamente su entorno y preservación. La pesca y la sobreexplotación de este recurso han crecido de manera exponencial en los últimos 30 años, resultando en la reducción en la población y el cierre de zonas de cría. Ésta especie ha sido incluida en el apéndice 2 de CITES (Convención sobre el Comercio Internacional de Especies Amenazadas), por ende el comercio internacional se permite sólo en las naciones en las que las poblaciones de las especies no están bajo la amenaza de la pesca comercial y en Colombia ha sido incluido en el libro rojo de los invertebrados marinos en la categoría vulnerable. La sobrepesca, la pérdida de importantes hábitats de cría (como prados de pastos marinos), actividades humanas como la urbanización, la polución, el aumento de la sedimentación en el arrecife, el uso de dinamita y otros aparejos destructivos como redes de fondo son causa del decline poblacional (Glazer y Quintero, 1998).

Un aspecto esencial en estos estudios es procurar la preservación del caracol pala y esto depende de las medidas que se implemente para lograrlo, paradójicamente un problema como la pérdida de esta especie ha motivado al diseño de soluciones para su preservación que permita un conocimiento detallado de su biología, los microorganismos asociados, y como complemento la obtención de herramientas que podrían ser de utilidad en otros campos biotecnológicos.

Una de las razones por las cuales hemos orientado este estudio hacia la búsqueda de compuestos bioactivos en microorganismo provenientes de ambientes marinos, se fundamenta en que las bacterias del suelo a pesar de que siguen siendo ampliamente estudiadas, hay una notable disminución en el hallazgo de nuevos productos estimándose que más del 90% de los cultivos microbianos bioactivos descubiertos producen agentes ya descritos (Fenical W, 1993). Por ello la exploración se ha reorientado hacia otros ambientes, como los sedimentos de ríos, lagos y océanos, así como plantas y animales acuáticos, que ofrecen la posibilidad de encontrar cepas silvestres no descritas que produzcan nuevos metabolitos secundarios farmacológicamente activos (Jensen y Fenical, 1994). Las listas de compuestos obtenidos a partir de microorganismos acuáticos, incluyen antimicrobianos, anticancerígenos, antiinflamatorios y enzimas. Éstas enzimas son utilizadas en una amplia gama de procesos como la descontaminación de aguas residuales, transformación de desechos de origen vegetal, (Gupta *et al.*, 2004) sin contar que muchos de los genes aislados que codifican para éstas proteínas pueden ser expresados en otros microorganismos. Las bacterias son utilizadas como fuente de enzimas amilasas, celulasas, xilanasas, proteasas, DNA polimerasas, lipasas, esterasas, entre otras (Horikoshi, 1999).

El presente estudio pretende obtener información sobre la actividad antimicrobiana de bacterias aerobias aisladas del caracol *S. gigas*. Los extractos mostrando alta actividad antimicrobiana de las bacterias caracterizadas molecularmente, requieren de mayor análisis para identificar los compuestos activos responsables de su actividad. Esta información es complementaria a los estudios que se puedan implementar relacionados con procesos biotecnológicos y de conservación de las poblaciones de Caracol del Caribe Colombiano.

MATERIALES Y MÉTODOS

Obtención de muestras

Las muestras fueron obtenidas previamente en el proyecto "Estudio de la microbiota asociada al caracol del grupo de Microbiodiversidad y Bioprotección (Acosta *et al.*, 2009). Las cepas bacterianas fueron sembradas en agar marino (Difco™) y las placas fueron incubadas aeróbicamente a 25 °C (Figura 1) por 72 horas. Los aislados bacterianos fueron identificados y guardados en el Laboratorio de Microbiología Industrial UNALMED hasta su análisis.

Análisis Molecular

Extracción del DNA: El DNA fue extraído y purificado mediante una dilución en 8 % P/V de TE 10X (0.1 M Tris, 0.01 M de EDTA, pH 8.0), 0.5 M NaCl, tratamiento con SDS al 1 % e incubación de 20 min a 70 °C, el lisado fue tratado con una solución de Fenol / Cloroformo / Alcohol isoamílico (25:24:1) seguido por precipitación con etanol. El DNA extraído fue resuspendido en 50 µl de agua ultra pura. Se les realizó tratamiento con RNasa (Fermentas, California U.S.A) a 1 µg/µl durante 2 h a 37 °C (Romero *et al.*, 2002).

Iniciadores y amplificación por PCR (Reacción en cadena de la polimerasa).

Todos los oligonucleótidos usados en este estudio fueron sintetizados por Gentech (Inc). La amplificación de la región del gen codificante para el 16S RNA se realizó con los iniciadores universales de la región conservada con los iniciadores Eubac 27F (AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG), 1492R (GGT TAC CTT GTT ACG ACT T) descritos por De Long (1992). Aproximadamente 25 ng/µl del DNA bacteriano fue usado para la reacción en un volumen final de 30 µl, la mezcla y el programa de la reacción fueron los descritos por Moreno *et al.* (2002).

El producto de amplificación fue analizado por una electroforesis en un gel de agarosa al 1.8 % teñido con EZ.Vision™ (Amresco^R) según las recomendaciones del fabricante. Las bandas de DNA fueron visualizadas por iluminación con LUV y fotografiadas por Sistem UV-Transiluminator (Biometra).

Secuenciación de los 16S rDNA de cultivo puro.

Los productos de amplificación del 16S rDNA fueron purificados y enviados a secuenciar en ambas direcciones (con los partidores 27F, 1492R y 1100R (GGG TTG CGC TCG TTG) por Macrogen Inc. La identificación de los productos secuenciado, fue realizada por comparación de secuencias individuales del gen 16S rRNA publicadas en la base de datos del servidor BLAST del National Centre for Biotechnology Information (NCBI) y en el rRNA Database Project (RDP II).

Actividad antimicrobiana

Preparación del extracto

Se llevo a cabo esencialmente como se describe en Romero *et al.* (2002). Para la preparación del extracto se inocularon en erlenmeyer de 150 ml, conteniendo 50 ml de caldo marino con un 2% de resina XAD Amberlite (Sigma), usada para la absorción de los metabolitos secundarios producidos durante el cultivo (Spyere *et al.* 2003), y 0.5mL de la cepa a evaluar crecida en un cultivo durante toda la noche. Luego se incubaron durante 7 días a 25 °C en agitación permanente. Pasado este periodo, la resina fue separada del medio de cultivo por filtración y los productos absorbidos fueron eluidos con metanol al 100%. El producto se concentro por evaporación y fue conservado a -20 °C para su posterior evaluación.

Evaluación de actividad antimicrobiana

Para la evaluación se utilizó la prueba de difusión en agar (El-Masry *et al.* 2000) contra cepas bacterianas Gram +: *Bacillus subtilis* y Gram -: *Pseudomonas aeruginosa* y *Escherichia coli*. Se utilizaron discos de papel filtro Whatman N° 1 de 6 - mm de diámetro esterilizado por autoclave 15 min a 121 °C. Los discos estériles fueron impregnados con los diferentes extractos (15 µl). La superficie del agar Mueller-Hinton (Becton Dickison) fue inoculada uniformemente con las cepas blanco crecidas en un cultivo liquido a una concentración aproximada de 1.2×10^8 UFC/ml. Los discos impregnados fueron esparcidos sobre el medio y las cajas fueron incubadas a 30°C durante 18 horas, al cabo de este tiempo se evaluó el diámetro del halo de inhibición del crecimiento causado por los extractos de las bacterias marinas. El antibiótico ampicilina (10 µg por disco) fue seleccionado como control.

RESULTADOS

Actividad antimicrobiana

Los resultados de la actividad antimicrobiana de los extractos metanólicos crudos frente a las bacterias *Escherichia coli*, *Pseudomona aeruginosa* y *Bacillus subtilis*, se muestran en la tabla 1. Un total de 9 extractos derivados de los aislados bacterianos seleccionados para el estudio asociados a la microbiota del caracol pala fueron evaluados. En el presente estudio todos los aislados evaluados, presentaron actividad contra uno o más blancos. Destacando la actividad antimicrobiana de los extractos derivados de las cepas inicialmente identificadas de acuerdo al patrón de ITS como *Halomonas sp* y *Vibrio sp*.

Los extractos que han mostrando alta actividad antimicrobiana podrían ser seleccionados para un análisis que permita caracterizar los metabolitos activos.

DISCUSIÓN

Los extractos obtenidos de bacterias de la microbiota asociada al caracol pala, fueron evaluados con el fin de conocer la presencia de sustancias inhibitorias de bacterias como la *Escherichia coli* y *Pseudomona aeruginosa*, bacterias Gram negativos de interés clínico y *Bacillus subtilis*, que se ha descrito con una alta sensibilidad a la mayoría de los antibioticos y asociada al deterioro de los alimentos (Popelka *et al.*, 2003). La determinación de la actividad antibacteriana de los extracto mostró que existe una acción característica de cada extracto sobre los microorganismos blancos (Magallanes, *et al.*, 2003, Belmares *et al.*, 2006).

En total dos extractos preparados a partir del cultivo de las cepas inicialmente identificadas como *Psychrobacter sp.*C3, *Pseudoalteromona sp.* y *Vibrio sp* C1, mostraron una actividad antimicrobiana muy buena de acuerdo al diámetro del halo de inhibición, frente a cada microorganismo probado. A pesar de que son pocos los reportes de metabolitos secundarios con propiedades bioactivas obtenidos de la bacteria *Psychrobacter sp.* algunas investigaciones han evidenciado la producción de dipéptidos cíclicos con una actividad biológica diversa, antitumoral (Nicholson *et al.*, 2006) y

antibacterial (Fdhila *et al.*, 2003), en tanto los miembros del orden Alteromonadales y Vibrioanales del filo Proteobacteria, como *Pseudoalteromonas* y *Vibrios* han sido descritas como las productoras dominantes de antibióticos (Long y Azam, 2001).

El extracto derivado de una cepa identificada como *Cobetia* sp. no mostró una actividad notoria, la capacidad para producir metabolitos secundarios puede variar y se reporta que para cerca del 40% de los microorganismos recientemente aislados pueden perder su actividad, probablemente por necesidades nutricionales insatisfechas (Arnold y Aiqi Fang, 2000). El resto de los extractos evidenciaron una actividad antibacteriana moderada. En la literatura se ha encontrado reportes para *Vibrios* spp los resultados de esos estudios indican que la producción de sustancias inhibitorias es un fenómeno común entre bacterias aisladas de biopelículas en sustratos marinos (Jorquera *et al.*, 2004). Además microbiólogos han asumido que los antimicrobianos juegan un rol importante en interacciones competitivas.

Los extractos mostrando alta actividad antimicrobiana requieren de mayor análisis para identificar los compuestos activos responsables de ella. Además, la actividad biológica observada en este estudio muestra el recurso potencial de bacterias aisladas de nuestros recursos marinos. Esta información es complementaria a las investigaciones que se puedan implementar relacionados con procesos biotecnológicos y de conservación de las poblaciones de caracol pala del Caribe colombiano.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue financiado por el proyecto DIME 7734 (2009) de la Universidad Nacional de Colombia, sede Medellín.

BIBLIOGRAFÍA

- Acosta E.A., Gómez E, Romero T, Cadavid G.E & Moreno C.X. 2009. Identificación molecular de Poblaciones Bacterianas Asociadas al Caracol Pala (*Strombus gigas*) del Caribe Colombiano. *Acta Biol Colomb.*, 14: 69-84.
- Arnold L & Aiqi Fang. 2000. *The Natural Functions of Secondary Metabolites*. Springer Berlin / Heidelberg., 69: 1-39
- Brownell, W. N. & Stevely, J. M. 1981. The biology, fisheries and management of the Queen Conch *Strombus gigas*. *Mar Fish Rev, US Dept Comm.*, 43: 1-12.
- Debashish G, Malay S, Barindra S, & Joydeep M. 2005. Marine enzymes. *Adv. Biochem. Engin. Biotechnol.*, 96:189-218.
- De Long E.F.1992. Archaea in coastal marine environments. *Proc. Natl. Acad. Sci.USA.*, 89:5685-5689.
- El-Masry, H.A., Fahmy H.H. & Abdelwahed A.S.H. 2000. Synthesis and antimicrobial activity of some new benzimidazole derivatives. *Molecules*, 5: 1429-1438.
- Fdhila, F., Vázquez, V., Sánchez, J. L. & Riguera, R. 2003. DD-Diketopiperazines: antibiotics active against *Vibrio anguillarum* isolated from marine bacteria associated with cultures of *Pecten maximus*. *J. Nat. Prod.*, 66: 1299-1301.
- Fenical W. 1993. Chemical studies of marine bacteria developing a new resource. *Chem Rev.*, 93: 1673-83.
- Glazer R. A. & Quintero I. 1998. Observations on the sensitivity of Queen Conch to water quality: Implications for coastal development. *50th Proc. Gulf. Carib. Fish Inst.*, 78-93.
- Gupta, R., Gupta, N. & Rathi, P. 2004. Bacterial lipases: an overview of production, purification and biochemical properties. *Appl Microbiol Biotechnol.*, 64:763-81.
- Horikoshi, K. 1999. Alkaliphiles: some applications of their products for biotechnology. *Microbiol. Mol. Biol.*, 63: 735-750.
- Jensen P. R, y Fenical W.1994 Strategies for the discovery of secondary metabolites from marine bacteria: Ecological perspectives. *Annu Rev Microbiol.*, 48: 559-84.

- Jorquera M.A, Riquelme , LoyolaLA y Muñoz LF. 2004. Production of bactericidal substances by a marine vibrio isolated from cultures of the scallop *Argopecten purpuratus*. Springer Netherlands., 7: 433-448.
- Long R, & F. Azam, 2001. Antagonistic interactions among marine pelagic bacteria. *Appl. Environ. Microb.*, 67:4975-4983.
- Magallanes C, Córdoba R, y Orozco. 2003. Actividad antibacteriana de extractos etanolicos de macroalgas marinas de la costa del Perú. *Revista peruana de Biología*, 10: 125:132
- Moreno C, Romero J, y Espejo RT. 2002. Polymorphism in repeated 16S rRNA genes is a common property of type strains and environmental isolates of the genus *Vibrio*. *Microbiology*,148:1233-1239.
- Nicholson B, Lloyd, G. K, Miller, B. R., Palladino, M. A., Kiso,Y., Hayashi, Y. y Neuteboom, S. T. C. 2006. NPI-2358 is a tubulin-depolymerizing agent: in-vitro evidence for activity as a tumor vascular-disrupting agent. *Anti-Cancer Drug.*, 17: 25-31.
- Pérez M. A., Rosado W. y Govind N. 2007. Bacterial diversity associated with the Caribbean tunicate *Ecteinascidia turbinata*. *Antonie van Leeuwenhoek.*, 92:155-164.
- Popelka P, Nagy J, Popelka P, Sokol J, Hajurka J, Cabadaj R, Marcincak S. y Bugarsky A. 2003. Comparison of various methods for penicillin residue detection in cow milk after intramammary and parenteral treatment. *Bull Vet Inst Pulawy.*, 47:203–209.
- Romero J, García-Varela M, Lacleste JP. y Espejo RT. 2002. Bacterial 16S rRNA gene analysis revealed that bacteria related to *Arcobacter* spp. constitute an abundant and common component of the oyster microbiota (*Tiostrea chilensis*). *Microb Ecol.*, 44:365-371.
- Spyere A, Rowley D, Jensen P y Fenical W. 2003. New neoverrucosane diterpenoids produced by the marine gliding bacterium *Saprospira grandis*. *Journal of Natural Products.*, 66: 818-822

Tabla 1. Actividad antimicrobiana de los extractos metanólicos crudos de las nueve cepas seleccionadas frente a las cepas de referencia.

Fuente del Extracto metanólico crudo	Microorganismo		
	<i>Pseudomona aeruginosa</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Bacillus subtilis</i>
<i>Psychrobacter sp. C1</i>	++	++	++
<i>Psychrobacter sp.C2</i>	++	++	++
<i>Psychrobacter sp.C3</i>	++	++	+++
<i>Pseudoalteromona sp.</i>	+	+++	++
<i>Vibrio sp C1</i>	+	++	+
<i>Cobetia sp</i>	+	-	-
<i>Vibrio sp.C2</i>	+	-	++
<i>Pseudomonas sp.</i>	-	+	++
<i>Halomona sp.</i>	++	++	++

Todos los resultados corresponden a las medidas de tres replicas (-) Inactividad, (+) actividad débil (7-10 mm halo), (++) buena (10-15 mm del halo), (+++) muy buena (mayor de 15 mm).

LEYENDA DE LAS FIGURAS

Figura 1. Modelo de siembra de las cepas bacterianas en agar marino (Difco™).

Figura. 2. Halos de inhibición de los extractos metanólicos crudos derivados de las cepas bacterianas identificadas preliminarmente como *Pseudoalteromonas* y *Vibrio sp.* a) Frente a *E. coli* y b) *Bacillus subtilis*.

Figura 3. Halos de inhibición de los extractos metanólicos crudos derivados de las cepas bacterianas identificadas preliminarmente como *Psychrobacter sp. C3 (25)* frente a *Bacillus subtilis*. (**Amp**) antibiótico ampicilina (10 µg por disco).

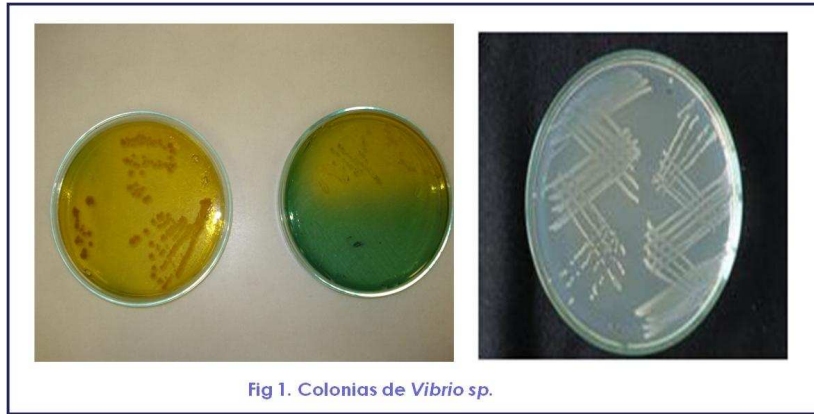


Figura 1.



a

b

Figura 2.



Figura 3.