

## Purificación parcial y caracterización de una sustancia antimicrobiana producida por *Alteromonas* sp. de origen marino

### Partial purification and characterization of an antimicrobial substance produced by a marine *Alteromonas* sp.

Jorge León<sup>1</sup>, Guillermina Tapia<sup>2</sup> y Rita Avalos<sup>1</sup>

Presentado: 07/09/2005

Aceptado: 09/01/2006

#### Resumen

Un miembro del género *Alteromonas* sp. (cepa N22.C), aislado del neuston marino y productor de sustancias que inhiben el crecimiento de ictiopatógenos fue caracterizado fenotípicamente mediante pruebas morfológicas, fisiológicas y bioquímicas convencionales. Para determinar la naturaleza química de la sustancia inhibitoria, extractos crudos de sobrenadantes de cultivos fueron precipitados con concentraciones crecientes de Sulfato de Amonio hasta el 70% y filtrados a través de columnas de Sephadex G-25. Ensayos con Dodecil Sulfato de Sodio-electroforesis en Geles de Poliacrilamida (SDS-PAGE) revelaron que la sustancia antimicrobiana es un compuesto proteínico con una masa molecular de aproximadamente 34000 Da, que carece de residuos de azúcares asociados. Otros ensayos realizados con extractos crudos y fracciones semipurificadas de la cepa de *Alteromonas* sp. N22.C mostraron un amplio espectro de actividad antibiótica contra cepas de bacterias patógenas de peces, moluscos y crustáceos.

**Palabras claves:** bacterias marinas, actividad inhibitoria, sustancia extracelular, *Alteromonas*, antibiosis.

#### Abstract

A member of the genus *Alteromonas* sp. (strain N22.C) isolated from marine neuston and substance-producer which inhibit growth of ichthyopathogenics was characterized phenotypically by means of morphological, physiological and biochemical conventional tests. To determine the chemical nature of the inhibitory substance, raw extracts of supernatans from cultured strains were precipitated with increasing concentrations of Ammonium Sulphate up to 70% and filtered through columns of Sephadex G-25. Assays by Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE) revealed that the antimicrobial substance is a proteinaceous compound with a molecular mass of approximately 34000 Da, which lacks sugar associated residues of it. Other assays made with raw semipurified fractions extracts of *Alteromonas* sp N22.C show the wide spectrum of antibiotic activity against pathogenic bacterial strains of fish, mollusks and crustaceans.

**Keywords:** marine bacteria, inhibitory substances, extracellular substance, *Alteromonas*, antibiosis.

#### Introducción

Los microorganismos marinos han recibido particular atención en las últimas décadas como fuentes de nuevos recursos biomédicos (Kelecom, 2002). Asimismo, diversos metabolitos secundarios y nuevas sustancias de naturaleza química única y de origen microbiano presentan aplicaciones promisorias en el ámbito de la biotecnología marina (Fenical

& Jensen, 1993; Bradley, 1995; BioScience, 1996). Entre las numerosas sustancias con principios bioactivos de origen marino destacan los antibióticos producidos en forma natural por microorganismos (Gatesoupe, 1999). Estos podrían ser de gran utilidad en el control de enfermedades en la acuicultura (Abraham, 2004) en particular en patologías de peces, moluscos y crustáceos (Austin et al. 1995; Gatesoupe, 1999).

La producción de sustancias antibióticas por bacterias aisladas del ecosistema marino ha sido largamente documentada (Kelecom, 2002). Uno de los primeros reportes que marcó un hito en el estudio de bacterias marinas productoras de sustancias antibióticas fue el

<sup>1</sup>Laboratorio de Microbiología Ambiental y Biotecnología, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Apartado 110058, Lima 11, Perú.  
E-mail Jorge León: [jleonq@unmsm.edu.pe](mailto:jleonq@unmsm.edu.pe)

<sup>2</sup>Laboratorio de Bioquímica, Facultad de Ciencias Básicas – Carrera de Bioquímica – Universidad Católica de Valparaíso, Chile.

de Rosenfeld & ZoBell (1947), quienes sugirieron que el ambiente marino debería ser considerado como una fuente potencial de antibióticos naturales. Posteriormente se ha evaluado ese efecto frente a diversas bacterias patógenas de humanos (Jayanth et al., 2002) de peces y moluscos (Dopazo et al., 1988; Lodeiros et al., 1988; León, 1996; Riquelme et al., 1996) y en la actualidad se ha llegado a conocer incluso el efecto bactericida que tienen frente a cepas resistentes a antibióticos como *Staphylococcus aureus* meticilino-resistentes (Isnansetyo & Kamei, 2003).

El desarrollo de métodos de extracción y purificación de sustancias inhibitorias activas, ha permitido conocer su naturaleza química, encontrándose compuestos proteínicos (Riquelme et al. (1996), glicoproteínas termolábiles Barja et al. (1986) y lipopolisacáridos (Gauthier, 1970), todos con un amplio espectro de actividad inhibitoria.

En el presente trabajo se describen características fenotípicas de una cepa de *Alteromonas* productora de una sustancia antibacteriana. Asimismo, se describen aspectos de la extracción, purificación y caracterización bioquímica de la sustancia inhibitoria, y la determinación de capacidades antibióticas de extractos crudos y semipurificados.

## Material y métodos

### Aislamiento y caracterización bacteriana

La cepa de *Alteromonas* marina N22.C fue aislada de la película superficial del agua (interfase agua-aire) recolectada en las pozas intermareales de Montemar – Instituto de Oceanología de la Universidad de Valparaíso, Chile (32°27'S, 71°33'W). El aislamiento bacteriano se realizó en Agar Marino 2216 (Difco) con incubaciones de 20 °C por 6 días. Las características morfológicas y bioquímicas de las cepas fueron determinadas según los procedimientos descritos en por Baumann & Baumann (1984) en el Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Complementariamente se hicieron observaciones al microscopio electrónico de transmisión (Siemens, Elmiskop Tipo IA).

### Condiciones de cultivo y extracción de la sustancia inhibitoria

El medio de cultivo para la caracterización de la sustancia antibiótica producida por la cepa descrita se preparó según la formulación de Gauthier (1976), modificada por el autor en la adición de 0,1% de glucosa en lugar de 5% de almidón.

Se utilizó el caldo marino de ZoBell (CMZ), conteniendo los siguientes componentes: proteosa-peptona 0,5% (p/v) (Oxoid), extracto de levadura 0,1% (p/v) (Oxoid), FePO<sub>4</sub> 0,01% (p/v), glucosa 0,1% (p/v), todo diluido con una mezcla de agua de mar «envejecida» y agua destilada (3:1), y con un pH 7,6. La cepa N22.C se inoculó a partir de un pre-cultivo de 24 h, en 200 ml de CMZ distribuidos en Erlenmeyer de 500 mL. Los cultivos se incubaron a 20 °C con agitación constante de 60 golpes por minuto hasta alcanzar la fase estacionaria a los 4 días.

La extracción del producto antimicrobiano se realizó según el método de Barja et al. (1989), con modificaciones de los autores. El proceso de extracción se realizó a 4 °C. El cultivo fue centrifugado a 8000 xg por 15 minutos en una centrífuga refrigerada (Sorvall RC-5B). El sobrenadante colectado fue sometido a precipitaciones fraccionadas de proteínas según Keen (1966) con Sulfato de Amonio a concentraciones saturantes hasta 70%. Luego de 16 h, la muestra se centrifugó a 13000 xg por 20 minutos. El precipitado fue disuelto en agua destilada estéril, luego liofilizada y conservado a la temperatura de -20 °C hasta su posterior análisis. La muestra así obtenida fue considerada como «extracto crudo del sobrenadante» (ECS).

Con la finalidad de determinar la posible localización intracelular de la sustancia antibacteriana, se realizaron pruebas complementarias de actividad inhibitoria utilizando el pellet celular, según Barja (1989).

Los «extractos crudos» intra y extracelulares obtenidos fueron probados para determinar su actividad inhibitoria frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 11632.

## Filtración en columnas de gel de Sephadex

La filtración en gel se realizó en columnas de Sephadex G-25 (2,2 por 25 cm) equilibrada con tampón Tris-HCl 50 mM (pH 8,1) y 0,1M de NaCl, con un flujo de 60 mL/h. El Azul Dextrano fue utilizado para determinar el volumen vacío de la columna y la homogeneidad del empaque de gel. Para el proceso de filtración, 0,5 g de ECS liofilizado se disolvió en 2 mL de agua destilada para luego aplicar 1 mL a la columna cromatográfica. Las fracciones colectadas (1 mL) fueron determinadas por su absorbancia a 280 nm (Shimadzu UV-150-02) y su actividad inhibitoria frente a *S. aureus* ATCC 11632. Las fracciones activas de los eluidos fueron juntadas (5,0 mL), luego liofilizadas y mantenidas a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Estas muestras fueron consideradas como sustancias semipurificadas (SP).

## Determinación de la concentración de proteínas

La concentración de proteínas en las muestras activas fue estimada según Brown et al. (1989), por el método del ácido bicinónico (BCA). Para la construcción de la curva patrón se utilizó una solución estándar de 1,0 mg/ml de Seroalbúmina Bovina (BSA). La lectura de la absorbancia se realizó a 562 nm (A562).

## Ensayos de actividad inhibitoria

La actividad inhibitoria de las fracciones obtenidas durante la extracción y purificación fue ensayada por dos métodos adaptados para bacterias marinas: el método de difusión en «pocillos» (Vignolo et al., 1993) y el método de difusión directa en placas (Naclerio et al., 1993). En ambos casos, se usó *S. aureus* ATCC 11632 y *Vibrio anguillarum* NCMB 2133 como cepas testigo y Trypticase Soya Agar (TSA) como medio de siembra.

El método en «pocillos» se empleó para ensayos con ECS. El medio TSA fue cubierto con una suspensión del cultivo testigo (10  $\mu\text{L}$ ) en 3 mL del medio semisólido. Luego de 30 minutos de difusión se prepararon pocillos de

5 mm de diámetro y se inocularon 30  $\mu\text{L}$  de la muestra en cada pocillo. Las placas fueron incubadas a  $30^{\circ}\text{C}$  por 24 h y luego evaluadas los halos de inhibición. Para las muestras semipurificadas (SP) se empleó el método de difusión directa según Naclerio et al. (1993). Las cepas testigo fueron sembradas de manera similar al anterior, pero la inoculación de las muestras (10  $\mu\text{L}$ ) se hizo directamente sobre el cultivo después de la difusión de la segunda capa por 30 minutos.

## Preparación de geles y condiciones de electroforesis

Los reactivos utilizados para electroforesis fueron de grado analítico Sigma. Todas las electroforesis se llevaron a cabo en geles discontinuos de Poli(acrilamida-Dodecil Sulfato Sódico) (PAGE-SDS), siguiendo la metodología de Laemmli (1970). La composición final de los geles fue de 3% de acrilamida y 0,08% de bis-acrilamida en tampón Tris-HCl 0,25M; pH 6,8 para el gel concentrador y 12,5% de acrilamida y 0,22% de bis-acrilamida en tampón Tris-HCl 1,5M; pH 8,0 para el gel separador. La polimerización se realizó con TEMED (N,N,N',N'-tetrametil-etilendiamina) al 0,4% (gel concentrador) y al 0,03% (gel separador) y persulfato amónico al 0,02% como agente catalizador. El tampón de corrida fue Tris-Glicina-SDS, pH 8,3. Muestras de SP reconstituidas en agua destilada estéril fueron cargadas sobre la placa de gel (14 x 16 cm) en volúmenes de 50  $\mu\text{L}$  a cada carril. El proceso se desarrolló a una corriente constante de 30 mA. Se utilizaron como marcadores (Kit MW-SDS-200, Sigma) las siguientes proteínas: miosina 205000 daltons (Da),  $\beta$ -galactosidasa 116000 Da, fosforilasa B 97400 Da, albúmina bovina 66000 Da, ovoalbúmina 45000 Da y anhídrido carbónico 29000 Da.

## Tinción de proteínas

Para la observación del perfil proteico se utilizó la tinción de nitrato de plata según Sambrook et al. (1989) y ocasionalmente la tinción de Azul de Coomassie. Las soluciones para las tinciones se prepararon de acuerdo a

especificaciones, empleando reactivos de grado analítico. El fijado se realizó en papel celofán transparente, previamente humedecidos en una solución acuosa de glicerol al 5%, dejando secar a temperatura ambiente.

### Tinción de Glicoproteínas

Para detectar posibles azúcares asociados a la proteína inhibitoria se utilizó un sistema comercial adaptado para PAGE-SDS (Glicoprotein Detection Kit, Sigma) (tinción del ácido Periódico-Schiff-PAS para glicoproteínas). La presencia de estas moléculas se visualiza como bandas de color magenta con un fondo incoloro o rosado débil. Como marcador de glicoproteínas se utilizó peroxidasa de rábano (40000 Da). Para la tinción de glicoproteínas se siguieron las instrucciones del catálogo indicadas por el fabricante.

### Ensayo directo de actividad antimicrobiana en PAGE-SDS.

Para determinar la actividad antimicrobiana del perfil proteico en PAGE-SDS de la sustancia SP, se utilizó el ensayo por bioautografía. La corrida de electroforesis se realizó en las mismas condiciones que las anteriores, pero preparativa.

Muestras de la sustancia SP activas fueron colocadas en volúmenes de 100 µL a dos carriles. Después de realizada la electroforesis (4 h a 50 mA), el gel fue retirado y cortado asepticamente en dos partes iguales. Una parte fue sometida a tinción para proteínas, en tanto la otra fue procesada para ver la actividad antimicrobiana por el método de Bhunia et al. (1988). Para este último ensayo el gel fue fijado inmediatamente con la solución de isopropanol al 20% en Tris HCl 10 mM (pH 7,5) por 3 h, y lavado con Tris-HCl 10 mM (pH 7,5) por 1,5 h. Luego el gel fue colocado sobre una placa conteniendo el medio TSA previamente inoculada con *S. aureus* ATCC 11632. La actividad de la sustancia inhibitoria fue evidenciada por zonas de inhibición de crecimiento.

### Espectro inhibitorio de la sustancia semipurificada (SP)

El espectro de actividad antimicrobiana de la sustancia semipurificada (SP) de *Alteromonas*

N22.C se realizó frente a una colección de cepas ictiopatógenas. El método empleado para esta prueba, fue el de difusión directa en placas de cultivo descrita anteriormente.

## Resultados

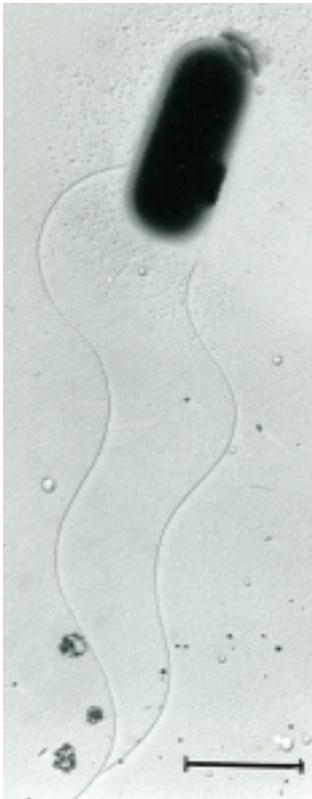
### Características fenotípicas del cultivo

La cepa N22.C de *Alteromonas* se observó como bacilos ligeramente rectos y con extremos redondeados, móviles por flagelos,

**Tabla 1.** Características fenotípicas de *Alteromonas* sp. cepa N22.C aislada de las pozas intermareales de Montemar, Valparaíso, Chile.

Caracteres	Cepa N22.C
Gram	-
Oxidasa	+
Catalasa	+
Luminiscencia	-
Pigmento	-
Presencia de Polihidroxitirato (PHB)	-
Motilidad	+
Posición de flagelos	Polar
Metabolismo OF (Glucosa)	O
Reducción de NO <sub>3</sub> a NO <sub>2</sub>	-
Hidrólisis de: Gelatina	+
Caseína	+
Celulosa	-
Almidón	+
Quitina	-
Alginato	-
Tween-80	+
Lecitina	+
DNA	+
Urea	-
Requerimiento de agua de mar.	si
Requerimiento de sodio (Na <sup>+</sup> )	si
Crecim. NaCl 0%	-
3%	+
5%	+
7%	+
10%	(+)
Crecim. a 8 °C	-
28 °C	+
35 °C	+
42 °C	-
Sensibilidad a O/129	R
Crecim. Mc Conkey	NC
Crecim. en TCBS	NC
Produc. Indol/H <sub>2</sub> S	-/-
Anaerobio facultativo	-

+, reacción positiva; -, reacción negativa; ( ), reacción débil; O, oxidativo; R, resistente; NC, no crecimiento.



**Figura 1.** Micrografía electrónica de *Alteromonas* cepa N22.C, exhibiendo los flagelos. Amplificados x 15,000. Barra = 1,0  $\mu$ m

**Tabla 2.** Espectro de actividad inhibitoria del «extracto crudo del sobrenadante» (ECS) de *Alteromonas* marina cepa N22.C frente a bacterias ictiopatógenas.

Cepas ictiopatógenas	ECS N22.C
<i>Vibrio tubiashii</i> FX1	++ <sup>(a)</sup>
<i>Vibrio anguillarum</i> ATCC 19264	+++
<i>Vibrio anguillarum</i> NCMB 2133	++
<i>Vibrio anguillarum</i> RP-13	+++
<i>Vibrio anguillarum</i> 775	++
<i>Vibrio ordalii</i> NCMB 2167	++++
<i>Vibrio ordalii</i> 84/2559	++
<i>Vibrio damsela</i> ATCC 33539	+
<i>Vibrio alginolyticus</i> A32	+++
<i>Aeromonas hydrophila</i> B-35	++
<i>Aeromonas salmonicida</i> 67.79	++
<i>Aeromonas sobria</i> P-281	+
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	+++
<i>Yersinia ruckeri</i> PP-31	++
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 11632 <sup>(b)</sup>	+++

(a): +, < 8 mm zona de inhibición; ++, 8-12 mm zona de inhibición; +++, 12-16 mm zona de inhibición; +++++, > 16 mm zona de inhibición.

(b): cepa control.

Gram negativos, aerobios estrictos, y metabolismo oxidativo que llega a alcanzar la fase estacionaria a las 72 h (Fig. 1). Generalmente se presentaron como células simples durante la fase exponencial y pleomórficas o en filamentos de cadenas cortas en cultivos viejos. Asimismo, observaciones al microscopio electrónico muestran la presencia de flagelos de inserción polar. No producen endosporas ni cápsulas. En el medio Agar Marino 2216 presentaron colonias circulares de 2 a 3 mm de diámetro, translúcidas, superficie lisa, brillosas, borde entero, ligeramente elevadas, consistencia mucóide y no pigmentadas. Otras características fenotípicas se muestran en la Tabla 1.

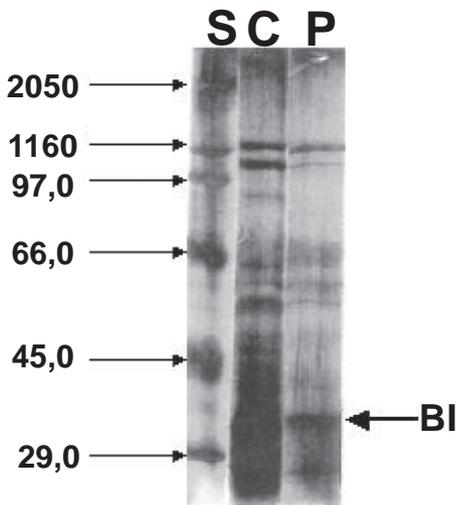
### Espectro de actividad antimicrobiana de la ECS

El ECS de la cepa en estudio, presenta un amplio rango de actividad inhibitoria frente a bacterias testigo (patógenas de peces y moluscos) (Tabla 2). Todas las bacterias ensayadas fueron inhibidas por el extracto crudo del sobrenadante de N22.C. *Vibrio ordalii* NCMB 2167 resultó ser la cepa testigo de mayor sensibilidad mostrando halos de inhibición de hasta 18 mm de diámetro, seguida por *V. anguillarum* RP-13 (14 mm), *Vibrio alginolyticus* A32 (13 mm), *Pseudomonas aeruginosa* (14 mm) y *Aeromonas hydrophila* B-35 (13 mm).

Las pruebas de inhibición realizadas con extracto crudo intracelular, mostraron actividad antibacteriana moderada frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 11632, los resultados de estas pruebas son discutidos.

### Caracterización de las proteínas

El perfil proteico PAGE-SDS del extracto crudo del sobrenadante (ECS) de la cepa de *Alteromonas* N22.C, muestra la presencia de hasta 12 bandas de proteínas extracelulares, cuyas masas moleculares oscilan entre 116000 y 29000 daltons (Da) (Figura 2). Por otro lado, el análisis de electroforesis de la sustancia semipurificada (SP) muestra menor número de bandas de proteínas; sin embargo la presencia



**Figura 2.** Electroforesis en gel de poliacrilamida - SDS de la sustancia inhibitoria (SI) de *Alteromonas* cepa N22.C, con tinción de plata. Carril C, extracto crudo del sobrenadante; carril P, SI semipurificada (eluidos activos después del filtrado por Sephadex G-25); carril S, estándar de pesos moleculares (MW-SDS-200, Sigma), 205000; 116000; 97000; 66000; 45000 y 29000 daltons (Da). La flecha (BI) indica la banda de proteína(s) involucrada(s) en las pruebas de inhibición.

de una banda cuya masa molecular oscila entre 45000 y 29000 fue persistente en todas las corridas electroforéticas, (Figura 3). Esta fracción de proteínas cuya masa molecular fue estimada entre  $34000 \pm 4000$  Da se denominó «banda I» (BI).

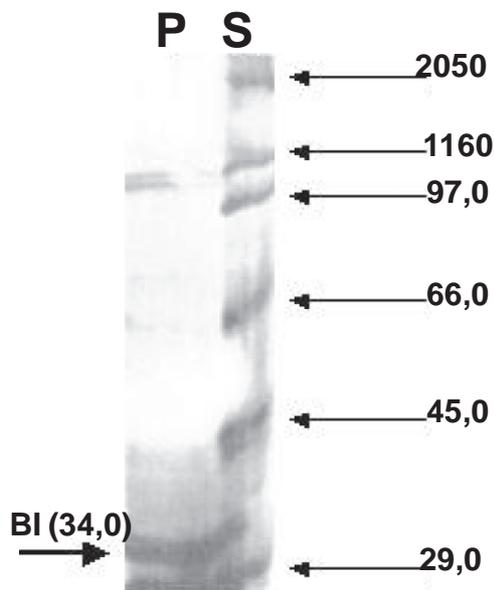
Las pruebas efectuadas mediante el ensayo directo de actividad antimicrobiana en PAGE-SDS, conducentes a determinar la actividad de las bandas proteicas de la sustancia SP, revelaron una zona de fuerte inhibición a la altura de la banda BI (cepa testigo *S. aureus* ATCC 11632) (Figura 4).

Otros ensayos en PAGE-SDS conducentes a la determinación de la presencia de azúcares unidos a las proteínas inhibitorias mostraron ausencia de dichas moléculas (Figura 5). En consecuencia la sustancia inhibitoria producida por *Alteromonas* N22.C fue catalogada simplemente como de naturaleza proteinacea. La con-

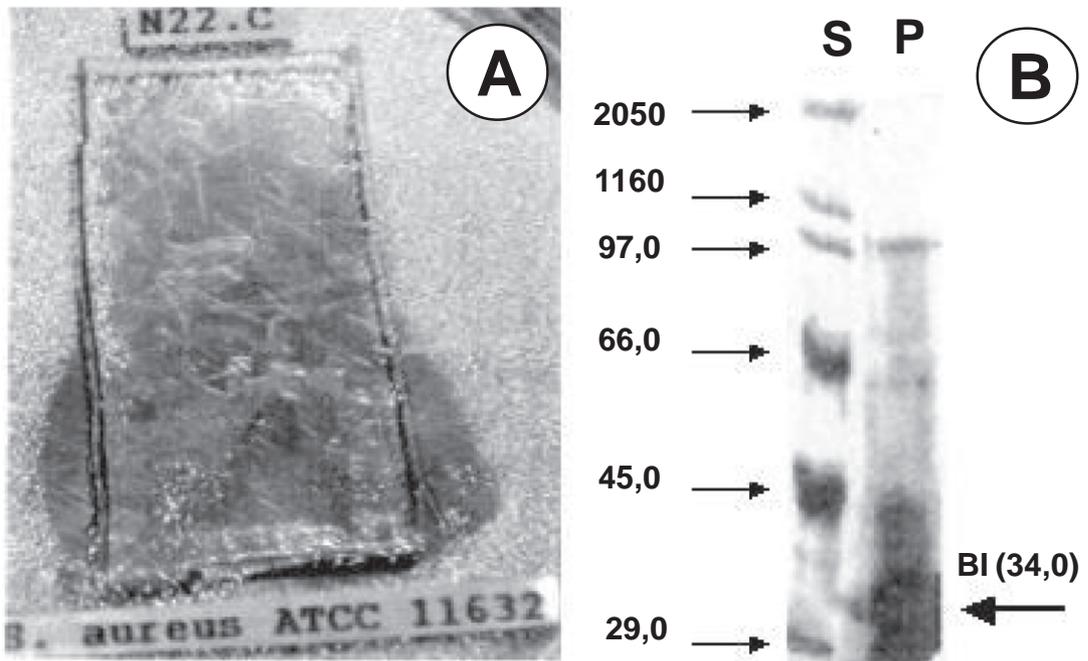
centración de proteínas totales de la sustancia SP aplicadas a cada carril de PAGE-SDS, fue estimada en 170 mg/mL.

**Espectro de actividad antimicrobiana de la sustancia SP**

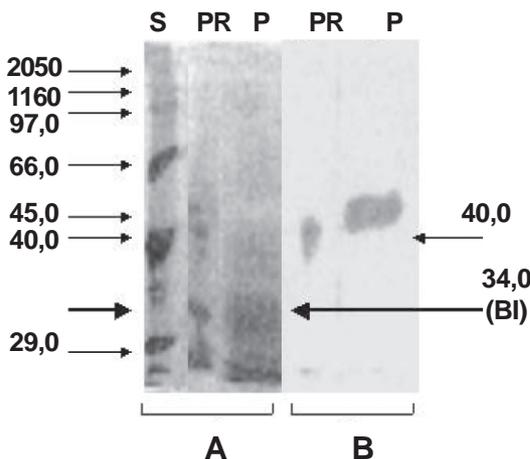
La sustancia semipurificada (SP) de *Alteromonas* N22.C, presentó actividades inhibitorias de amplio rango contra bacterias patógenas de peces y moluscos. Las cepas testigo ensayadas han resultado ser sensibles a la sustancia SP cuando éstas fueron inoculadas con 15 mL de muestra sobre la superficie de los cultivos en placa. Esta sensibilidad se muestra en la Tabla 3. El patógeno de mayor sensibilidad resultó ser *Vibrio ordalii* NCMB 2167, cuyo halo de inhibición logró superar 18 mm de diámetro. Otras cepas sensibles a la acción inhibitoria fueron *V. anguillarum* RP-13 (14 mm), *V. alginolyticus* A32 (13 mm), *Pseudomonas aeruginosa* (14 mm) y



**Figura 2.** Electroforesis en gel de poliacrilamida - SDS de la SI semipurificada de *Alteromonas* N22.C. La flecha (BI) indica la banda de proteína(s) cuyo peso molecular fue calculado en 34000 Da (entre los marcadores de 45000 y 29000 Da). Tinción con nitrato de plata. Carril P, SI semipurificada; S, estándar de pesos moleculares.



**Figura 3** Ensayo directo de la actividad inhibitoria en PAGE - SDS de la sustancia SP de *Alteromonas* marina cepa N22.C. **(A)**, porción del gel colocado sobre el cultivo de la cepa testigo (descrito en material y métodos); **(B)**, porción del gel con tinción de plata. La flecha (BI) indica la banda de proteína(s) involucradas en el halo de inhibición mostrada en (A). S, estándar de pesos moleculares; P, sustancia semipurificada (SP).



**Figura 4.** PAGE - SDS de la sustancia semipurificada (SP) de *Alteromonas* N22.C conducentes a descartar la presencia de azúcares asociados a las proteínas inhibitorias. **(A)**, con tinción de plata para proteínas y **(B)**, con tinción del ácido Periódico-Schiff (PAS) para glicoproteínas. Carril PR, peroxidasa de rábano, PM 40000 Da (control); P, SI semipurificado; S, estándar de pesos moleculares.

**Tabla 3.** Espectro de actividad inhibitoria de la sustancia semipurificada (SP) de *Alteromonas* marina cepa N22.C frente a bacterias ictiopatógenas.

Cepas ictiopatógenas	SP N22.C
<i>Vibrio tubiashii</i> FX1	+(a)
<i>Vibrio anguillarum</i> ATCC 19264	+++
<i>Vibrio anguillarum</i> NCMB 2133	++
<i>Vibrio anguillarum</i> RP-13	+++
<i>Vibrio anguillarum</i> 775	++
<i>Vibrio ordalii</i> NCMB 2167	++++
<i>Vibrio ordalii</i> 84/2559	++
<i>Vibrio damsela</i> ATCC 33539	+
<i>Vibrio alginolyticus</i> A32	+++
<i>Aeromonas hydrophila</i> B-35	+++
<i>Aeromonas salmonicida</i> 67.79	++
<i>Aeromonas sobria</i> P-281	+
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	+++
<i>Yersinia ruckeri</i> PP-31	++
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 11632(b)	+++

(a): +, < 8 mm zona de inhibición; ++, 8-12 mm zona de inhibición; +++, 12-16 mm zona de inhibición; +++, > 16 mm zona de inhibición.

(b): cepa control.

*Aeromonas hydrophila* B-35 (13 mm). Entre las cepas menos sensibles resultaron *Aeromonas sobria* P-281 (< 8 mm) y *V. damsela* ATCC 33539 (8 mm).

## Discusión

Estudios de purificación y caracterización de las sustancias inhibitoras producidas por bacterias marinas, demuestran que estas pueden ser de naturaleza molecular variable. El análisis detallado de las estructuras químicas de estas sustancias ha dado como resultados compuestos tanto de alto como de bajo peso molecular; sin embargo, en muchos casos se trata de moléculas únicas halogenadas propias de ambientes marinos. Las primeras sustancias purificadas por Burkholder et al. (1966) y Andersen et al. (1974) fueron compuestos bromopirrólicos de bajo peso molecular y de espectro antimicrobiano variable. Estas sustancias fueron consideradas de localización intracelular. Por su parte, Dogget (1968), purificó de una cepa de *Vibrio* un compuesto anti-*Pseudomonas* de alto peso molecular; mientras que Gauthier, (1970) caracterizó una sustancia inhibitora producida por *Alteromonas* como un lipopolisacárido, aunque más tarde Bernard & Petazzi (1977) lo consideraron como polisacárido. También Gauthier (1976a) y Gauthier & Flatau, (1976) aislaron compuestos macromoleculares polianiónicos extracelulares de *Alteromonas citrea*, *A. rubra* y *A. luteo-violaceus*; de ésta última, además aislaron compuestos brominados de bajo peso molecular y de localización intracelular. Posteriormente, Lemos et al. (1985) y Dopazo et al. (1988) aislaron compuestos inhibitorios polianiónicos extracelulares de cepas de *Alteromonas*, con tamaños moleculares bajos (<2000 Da). Barja et al. (1989), purificaron y caracterizaron una sustancia antibacteriana producida por *Alteromonas* cepa P-31; ésta fue una macromolécula de 90000 Da, su naturaleza se determinó como la de una glicoproteína termolábil, con amplio espectro de actividad antimicrobiana. Riquelme et al. (1996) aisla-

ron una cepa de *Alteromonas haloplanktis* con actividad inhibitoria contra vibrios patogénicos, cuya naturaleza se sugiere como un compuesto proteínico.

En el presente trabajo se ha caracterizado parcialmente la naturaleza molecular proteínica de una sustancia inhibitora semi-purificada procedente de una especie de *Alteromonas* sp. cepa N22.C. La actividad inhibitoria de amplio espectro encontrada principalmente en el sobrenadante denota una vez más el origen extracelular de la sustancia antibacteriana; tales resultados son concordantes con los trabajos de Barja et al. (1989) y Riquelme et al. (1996), quienes a su vez consideran que las sustancias inhibitorias son metabolitos secundarios por excelencia, y por lo tanto se secretan extracelularmente. Por otro lado, en esta ocasión también se demostró la actividad inhibitoria aunque moderada en el extracto crudo intracelular (fracción insoluble). Al respecto, trabajos previos realizados por León (1996) mostraron resultados similares, considerando finalmente que pudo haber sido por el efecto residual de la sustancia inhibitoria que se conserva en el espacio periplásmico de las células bacterianas.

Debido a que la sustancia inhibitoria, sólo fue parcialmente fraccionada con concentraciones crecientes de sulfato de amonio hasta una saturación de 70%, se deduce que tiene naturaleza proteínica. Estos mismos resultados son reportados por Riquelme et al. (1996) en bacterias marinas aisladas de *Argopecten purpuratus*. Según los ensayos en PAGE-SDS la sustancia inhibitoria reveló tener una masa molecular de  $34000 \pm 4000$  Da, la cual se refleja como una banda ancha y difusa de proteína (2-3 mm) comprendidas entre los marcadores de 45000 y 29000 Da (Figuras 2, 3 y 4). Estos resultados difieren de los obtenidos por Ballester et al. (1977) y Barja et al. (1989), quienes determinaron en cepas marinas de *Alteromonas* sustancias inhibitorias de naturaleza glicoproteica de alto peso molecular (90000 Da). En el presente trabajo, se descartó la pre-

sencia de residuos de azúcares asociadas a la sustancia inhibitoria de la cepa N22.C (Figura 5). Trabajos previos de caracterización con la cepa N22 (León y Tapia, 1999) revelaron también que la sustancia inhibitoria en estudio es termosensible a los 90 °C en 45 minutos y se mantiene estable dentro de un amplio rango de pH (3 a 9). Asimismo, la actividad antibiótica de la sustancia semipurificada es comparativamente equivalente a 30 ppm de oxitetraciclina en pruebas de antibiosis frente a *Vibrio anguillarum* NCMB 2133.

La sustancia inhibidora secretada por *Alteromonas* sp. cepa N22.C mostró su mayor actividad antagónica en la fase estacionaria y con ello, adopta el comportamiento de un metabolito secundario. Esta característica junto con la naturaleza proteínica y actividad antibacteriana de amplio espectro son concordantes con los resultados obtenidos por otros investigadores como Lemos et al. (1985), Dopazo et al. (1988) y Riquelme et al. (1996) en otros aislados marinos del género *Alteromonas*.

En los últimos 15 años, las investigaciones sobre los metabolitos de bacterias marinas han permitido dilucidar la naturaleza molecular de muchas de estas sustancias. Tal es así, que un vibrio marino (C33), aislado de *Argopecten purpuratus* es productora de una sustancia bactericida cuya fracción activa fue caracterizada como un éter hidroxilado alifático (Jonquera et al. 2000). Por otro lado, una bacteria marina sindicada como *Pseudoalteromonas phenolica* sp. nov. O-BC30<sup>T</sup> fue señalada como productora de compuestos químicos que corresponde a 3,32,5,52-tetrabromo-2,22-bifenildiol (Isnansetyo & Kamei, 2003) y otra bacteria identificada como *Pseudomonas* sp. AMSN es productora de 2,4-diacetil floroglucinol (DAPG) (Isnansetyo et al. 2003). Estos avances significan un reto para el presente trabajo, ya que en el futuro serán necesarios estudios que implican el uso de nuevas técnicas en el estudio de bacterias marinas y sus metabolitos.

## Literatura citada.

- Abraham TJ. 2004. Antibacterial marine bacterium deter luminous vibriosis in shrimp larvae. NAGA, World Fish Center Quarterly. 27 (3 & 4) Jul-Dec: 28-31
- Andersen RJ, Wolfe MS, & Faulker DJ. 1974. Autotoxic antibiotic production by a marine Chromobacterium. Mar. Biol. 27:281-85.
- Austin, B., Stuckey LF, Bertson PAW, Effendi I, and Griffith DRW, 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
- Ballester M, Ballester JM, & Belaich JP. 1977. Isolation and characterization of a high molecular weight antibiotic produced by a marine bacterium. Microb. Ecol. 3: 289-303
- Barja JL, Lemos M and Toranzo AE. 1989. Purification and characterization of an antibacterial substance produced by a marine *Alteromonas* species. Antimicrob. Agents and Chemotherapy. 33(10): 1673-1679.
- Baumann P. & Baumann L. 1984. Genus *Alteromonas*, pp 343. In: N. R. Krieg, and J. G. Holt (ed.), Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Vol. 1 Williams & Wilkins, Baltimore.
- Bernard P & Pettazzi G. 1977. Purification partielle de deux antibiotiques produits par une bacteria marine appartenant un genre *Alteromonas*. Rev. Int. Oceanogr. Méd. 45-46:59-70
- Bhunia AK, Johnson MC & Ray B. 1988. Purification, characterization and antimicrobial spectrum of a bacteriocin produced by *Pediococcus acidilactici*. J. Appl. Bacteriol. 65:261-268
- BioScience. 1996. Marine Biotechnology Special Issue, 46
- Bradley SD. 1995. New Dimensions in Natural Products Research: Cultured Marine Microorganisms, Curr. Opin. Biotech. 6: 284-290
- Brown RE, Jarvis KL & Hyland KJ. 1989. Protein measurement using bicinchoninic acid: Elimination of interfering substance. Anal. Biochem. 180: 136-39
- Burkholder PR, Pfister RM, & Leitz FP. 1966. Production of a pyrrole antibiotic by a marine bacterium. Appl Microbiol. 14(4): 649-653
- De Freitas MJ & Fredrickson AG. 1978. Inhibition as a factor in the maintenance of microbial ecosystems. J. Gen. Microbiol. 106: 307-320
- Dogget RG. 1968. New anti-*Pseudomonas* agent isolated from a marine *Vibrio*. J. Bacteriol. 95: 1972-73.
- Dopazo CP, Lemos ML, Lodeiros C, Bolinches JJ, Barja JL & Toranzo AE. 1988. Inhibitory activity of antibiotic producing marine bacteria against fish pathogens. J. Appl. Bacteriol. 65(2):97-101.

- Fenical W & Jensen PR. 1993. Marine microorganisms: a new biomedical resource, pp 419-75 In: Attaway DH, Zaborsky OR. eds. Pharmaceutical and bioactive natural products. New York: Plenum 500 pp.
- Gatesoupe FJ. 1999. Review: The use of probiotics in aquaculture. *Aquaculture* 180: 147-165.
- Gauthier MJ. 1970. Substances antibacteriennes produites par les bacteries marines. II, Lipopolysaccharides antibiotiques produites par certains germes marins appartenant aux genres *Pseudomonas* et *Chromobacterium*. *Rev. Int. Oceanogr. Méd.* 17: 23-45.
- Gauthier MJ. 1976a. *Alteromonas rubra* sp. nov., a new marine antibiotic-producing bacterium. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 26: 459-66.
- Gauthier MJ & Flatau GN. 1976. Antibacterial activity of marine violet-pigmented *Alteromonas* with special reference to the production of brominated compounds. *Can. J. Microbiol.* 22: 1612-19.
- Isnansetyo A & Kamei Y. 2003. MC21-A, a bactericidal antibiotic produced by a new marine bacterium, *Pseudoalteromonas phenolica* sp. nov. O-BC30<sup>T</sup>, against Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother.* 47(2): 480-488.
- Isnansetyo A, Cui L, Hiramatsu K and kamei Y. 2003. Antibacterial activity of 2,4-diacetylphloroglucinol (DAPG) produced by *Pseudomonas* sp. AMSN isolated from a marine alga, against vancomycin resistant *Staphylococcus aureus* (VRSA). *Int. J. Antimicrob. Agents.* 22:545-7.
- Jayanth K; Jeyasekaran G; Jeya Shakila R. 2002. Isolation of marine bacteria antagonistic to human pathogens. *Indian J. Marin. Sc.* 31(1) : 39-44.
- Jonquera MA, Riquelme CE, Loyola LA & Muñoz LF. 2000. Production of bactericidal substances by a marine vibrio isolated from cultures of the scallop *Argopecten purpuratus*, *Aquaculture International.* 7(6): 433-448
- Keen JH. 1966. Preparation and chemical properties of colicin 1. *Can. J. Microbiol.* 12: 425-26.
- Kelecom A. 2002. Secondary metabolites from marine microorganisms. *An Acad Bras Cienc.* 74(1): 151-70.
- Laemmli UK. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature (London)* 227: 680-685.
- Lemos ML, Toranzo AE & Barja JL. 1985. Antibiotic activity of epiphytic bacteria isolated from intertidal sea-weeds. *Microb. Ecol.* 11: 149-63.
- León J. 1996. Cepas nativas del bacterioneuston marino con actividad antagónica frente a bacterias ictiopatógenas. Caracterización preliminar de sustancias inhibidoras. Tesis para optar el grado de Magíster en Ciencias Microbiológicas. Universidad Católica de Valparaíso. Chile.
- León J, Tapia G. 1999. Caracterización parcial y espectro antimicrobiano de sustancias inhibitorias producidas por *Alteromonas* marinas. *Rev. Perú. Biol.* 6(1): 94-103
- Lodeiros CJM, Fernández E, Vélez A y Bastardo J. 1988. Producción de antibióticos por bacterias marinas y su utilización en acuicultura. *Bol. Inst. Oceanogr. Venezuela, Univ. Oriente* 27(1 y 2): 63-69.
- Naclerio G, Ricca E, Sacco M, & De Felice M. 1993. Antimicrobial activity of a newly identified bacteriocin of *Bacillus cereus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 59: 4313-16
- Riquelme C, Hayashida G, Araya R, Uchida A, Santomi M & Ishida Y. 1996. Isolation of a native bacterial strain from the scallop *Argopecten purpuratus* with inhibitory effects against pathogenic vibrios. *J. Shellfish Research* 15: 369-374
- Rosenfeld WD and Zobell CE. 1947. Antibiotic production by marine microorganisms. *J. Bacteriol.* 54: 393-398.
- Sambrook J, Fritsch EF & Maniatis T. 1989. *Molecular cloning: A laboratory manual* pp. 18.47-18.58 Cold Spring Harbor, NY.
- Vignolo GM, Suriani F, Aída P. De Ruíz Holgado & Oliver G. 1993. Antibacterial activity of *Lactobacillus* strains isolated from dry fermented sausages. *J. Appl. Bacteriol.* 75: 344-349.