

**Actividad bactericida in vitro de *Bacillus megaterium* y *Lactococcus lactis* contra
Aeromona veronii y *Streptococcus agalactiae***

Ingles

**Bactericidal activity in vitro of *Bacillus megaterium* and *Lactococcus lactis* against
Aeromonas veronii and *Streptococcus agalactiae***

RESUMEN

Antecedentes: Microorganismos patógenos como *Aeromona sp* y *Streptococcus agalactiae*, producen grandes pérdidas en la industria acuícola, especialmente por la capacidad virulenta que presentan las especies. Una manera de controlar estas pérdidas es mediante el empleo de microorganismos probióticos. Objetivos: En esta investigación se evaluó el efecto bactericida de los extractos de bacterias probióticas *Lactococcus lactis* y *Bacillus megaterium*, aislados de intestino de tilapia (*Oreochromis sp*) frente a *A.veronii* y *S.agalactiae*. Metodología: el efecto bactericida de los extractos de *L.lactis* y *B.megaterium* se determinó por el ensayo de difusión en pozos, encontrando halos de inhibición frente a *A.veronii* hasta de 35mm. El extracto de *L.lactis* fue evaluado por cromatografía HPLC y el de *Bacillus megaterium* por espectrofotometría de masas. Los resultados mostraron que ambos extractos controlaron el crecimiento de *A.veronii* y *S.agalactiae*, los análisis estadísticos no presentaron diferencias significativas ($p>0.05$) en la inhibición generada entre los dos extractos de probióticos, todos controlaron el crecimiento de estos patógenos in vitro. El *L.lactis* produjo solo ácido láctico por HPLC, mientras que los análisis obtenidos en masas para el extracto de *B.megaterium* evidenciaron la presencia de ácido palmítico, esteárico e imidazol. Conclusiones Todos estos hallazgos evidencian el efecto positivo de los microorganismos probióticos en el control del crecimiento de patógenos en la industria acuícola.

Palabras claves: bactericida, inhibición, Aeromonas, Streptococcus, probióticos

ABSTRACT

Rationale: Microorganisms and pathogens such as *Streptococcus agalactiae* and *Aeromonas* sp produce large losses in the aquaculture industry, especially ability they possess virulent species. One way to control these losses is through the use of probiotic microorganisms. Aims: In This Research bactericidal effect extracts two bacteria *Lactococcus lactis* and *Bacillus megaterium*, Isolated tilapia gut (*Oreochromis sp*) and characterized as probiotics, evaluated against *A.veronii* and *S .agalactiae*. Methods: The extract of *Lactococcus lactis* and *Bacillus megaerium* controlled *A.veronii* and *S .agalactiae* for diffused assay in vitro. Both extracted were evaluated by HPLC and *Bacillus megaterium* by mass spectrometry. The results showed that the extracts controlled the growth *A.veronii* and *S. agalactiae*, statistical analyzes showed no significant differences ($p > 0.05$) in inhibiting generated among the three extracts probiotics, they controlled all the growth of these pathogens in vitro. The determined study by HPLC detected lactic acid alone while analyzes masses obtained showed the presence of palmitic, stearic acid and imidazole. Conclusions: These findings demonstrate the positive effect of probiotic microorganisms in controlling the growth of pathogenic in the aquaculture industry.

Keywords: bactericide, inhibition, *Aeromonas*, *Streptococcus*, probiotics

INTRODUCCIÓN

En los últimos años la acuicultura ha tenido un desarrollo importante a nivel mundial (1) este crecimiento implica intensificación y mayor estrés en el cultivo, generando problemas con enfermedades, deterioro ambiental y pérdidas económicas. La prevención y control de enfermedades en peces emplea por lo general antibióticos, generando ante su uso continuado resistencia en los patógenos (2). Ante este panorama, se requiere implementar alternativas que permitan controlar los patógenos sin los efectos colaterales que generan los antibióticos. El uso de probióticos puede ser una opción para la reducción de medicamentos en acuicultura (3) debido a las propiedades metabólicas que ellos presentan como la producción sustancias inhibitorias, competencia por espacio y nutrientes o por modulación de respuesta inmune (4).

Las bacterias ácido lácticas y algunas especies de *Bacillus sp* han sido ampliamente usadas como probióticos por los innumerable beneficios tanto en humanos como en animales (5). Las bacterias ácido lácticas producen ácidos orgánicos como el ácido láctico, ácido acético y peróxidos; los *Bacillus sp* generan enzimas y algunas especies, también producen ácido orgánicos. Ambos grupos bacterianos, cuando son consumidos en cantidades adecuadas, tienen la capacidad de promover la integridad intestinal en el organismo huésped, mediante la excreción de enzimas y moléculas bioactivas con características inmunomoduladoras (6).

Una de las propiedades más importantes de los probióticos es la capacidad bactericida frente a diferentes organismos patógenos, diversos estudios han demostrado la habilidad del género *Lactobacillus sp* para antagonizar contra varios patógenos: *Escherichia coli* entero-hemorrágica (7), *Salmonella typhimurium* y *Shigella dysenteriae* entre otros.(8) (9) Además estudios realizados en acuicultura han reportado que diferentes especies de

Bacillus sp y de bacterias Acido lácticas han presentado actividad antagónica contra *Aeromonas sp*, *Pseudomonas sp* y *Vibrio sp*.(10)(11)

En peces, una de las pérdidas en producción se generan a partir de las infecciones generadas por *Aeromonas sp*, *A. hydrophila*, *A. salmonicida* y *A.veronii*. Ellas son consideradas patógenos emergentes y tiene un rol importante en los desórdenes gastrointestinales. La patogenicidad del género de *Aeromonas* es multifactorial y atribuido a factores como citotoxinas, aerolisinas, hemolisinas, adhesinas y sistemas secretorios; *A.veronii* por ejemplo presenta una elevada actividad hemolítica, factor de virulencia que promueve las lesiones histológicas en el animal (12); este factor de virulencia puede incrementar cuando los peces son sometidos a pésimas condiciones de manejo de cultivo, bajos niveles de oxígeno, variaciones en la temperatura o épocas reproductivas (13).

Otro grupo de microorganismos también reportado como patógenos especialmente en tilapia son los *Streptococcus* y en ellos especies como *S. iniae*, *S. agalactiae* (*S. difficile*), *S. parauberis*, *S. dysgalactiae*, *S. milleri*, *Lactococcus garviae* (*Enterococcus seriolicida*), y *Vagococcus salmoninarum* (14) son considerados los causantes de las tasas de mortalidad más altas en tilapia en etapa juvenil, posiblemente por presentar altos volúmenes de producción y distribución.

El *S. iniae* ha sido considerado una de las especies más importantes dentro del grupo de cocos, sin embargo, el *S. agalactiae* caracterizado inicialmente como *S.difficile*, se considera un patógeno emergente con efectos letales en peces como tilapia(15).

Por todo lo anterior el objetivo de este trabajo fue evaluar la actividad antimicrobiana de *Lactococcus lactis* y *Bacillus megaterium* frente a dos cepas patógenas aisladas de

tilapia *Aeromona veronii* y *Streptococcus agalactiae*, determinando algunos de los metabolitos activos de los aislados por cromatografía HPLC y cromatografía de gases con detector selectivo de masas GC-MS.

MATERIALES Y MÉTODOS

Esta investigación se realizó en el laboratorio de Microbiología de la Corporación Universitaria Lasallista. Las cepas de *Bacillus megaterium* y *Lactococcus lactis* caracterizadas como probióticas e identificadas molecularmente, fueron aisladas directamente del intestino de tilapia roja (*Oreochromis* sp) en estado juvenil. La caracterización probiótica incluyó pruebas de viabilidad a sales biliares 0,3% p/v, pH 2,5 y enzimas proteolíticas como tripsina y lisozima 0,5UI.

Pruebas de actividad bactericida

Para la preparación de los extractos de los microorganismos, se emplearon caldo nutritivo y caldo MRS (Man Rogosa y Sharpe, Merck), el primero se enriqueció con 0,2% de extracto de levadura, 0,05% de peptona y 0,05% de NaCl, el *Bacillus megaterium* creció de forma independiente en 10mL de este medio, a 37°C y aeróbicamente, por 48 horas. El *Lactococcus lactis* creció en caldo MRS en condiciones anaeróbicas a 37°C por 48 horas. Al cabo de este tiempo, los cultivos se sometieron a centrifugación, en las siguientes condiciones 6000 rpm por 15 minutos/4°C, para remover las células y solo obtener el sobrenadante.

En el ensayo de difusión en pozos, se empleó cajas de petri servidas con agar nutritivo para el extracto obtenido de *B.megaterium* y para el ensayo con el extracto de *Lactococcus lactis* se empleó agar MRS. Se realizó 4 pozos en cada medio de cultivo

capacitados para contener 100ul del extracto previamente obtenido. Una vez se adicionó los extractos en cada pozo, se procedió al ensayo doble capa, el cual consistía en mezclar 10ml del medio Muller Hinton (0,8% agar agar) con 1×10^6 microorganismos/ml del microorganismo patógeno *Aeromona veronii* aislado directamente de lesiones en piel de tilapia (*Oreochromis spp*). Esta mezcla se adicionaba encima del medio que contenía los extractos, se dejaba solidificar y se incubaban a 37°C/24 /aeróticamente, el mismo ensayo se realizó con *Streptococcus agalactiae*, proporcionado por el laboratorio de Microbiología de la Universidad Nacional, sede Medellín. Para el diagnóstico molecular de la *A.veronii* se utilizaron los primers 8UAF Y 1492R. El control empleado para estas pruebas fueron sensidiscos de antibióticos.

Los resultados se leían como el diámetro de inhibición del crecimiento de la bacteria patógena en Muller Hinton, mostrando un halo transparente alrededor del pozo que contenía el extracto de los microorganismos. El diseño empleado para las pruebas fue diseño por bloques completamente aleatorizado y para los análisis estadísticos se empleó una prueba de comparación de medias con un nivel de confianza del 95%, usando el programa Statgraphics Centurión con licencia para la Corporación Universitaria Lasallista.

Los extractos generados por los microorganismos fueron centrifugados, filtrados y enviados al laboratorio de instrumentación de la Universidad Nacional, para ser evaluados por cromatografía líquida HPLC para el *Lactococcus lactis* y por cromatografía de gases con detector selectivo de masas GC-MS para el extracto de *Bacillus megaterium*. Los análisis HPLC se realizaron en el equipo empleado fue Agilent Modelo: 1100 series Detector: UV/VIS, 2 µL, Flujo: 0,5 ml/min Fase móvil:

Solución de ácido orto-fosfórico 0.05% Columna: SUPELCOGELTH H, ref.:59304-U, 30 cm x 7.8 mm ID.

RESULTADOS

En los resultados encontrados en los ensayos de difusión en pozos, se observó que *A.veronii* fue sensible al efecto de los extractos del *B.megaterium* y del *Lactococcus lactis* con halos de inhibición hasta de 35mm, figura 1, siendo el extracto del *L.lactis* el que presentó mayor acción sobre los dos aislados del estudio, *A. veronii* y *S.agalactiae*, estos resultados se muestran en la figura 2.

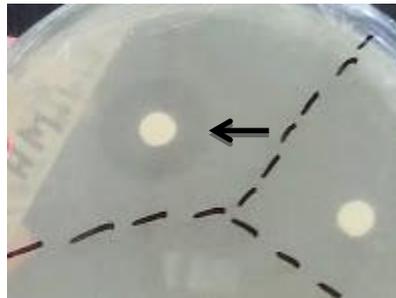


Figura 1: Zona de inhibición del extracto de *L.lactis* frente a *A.veronii*

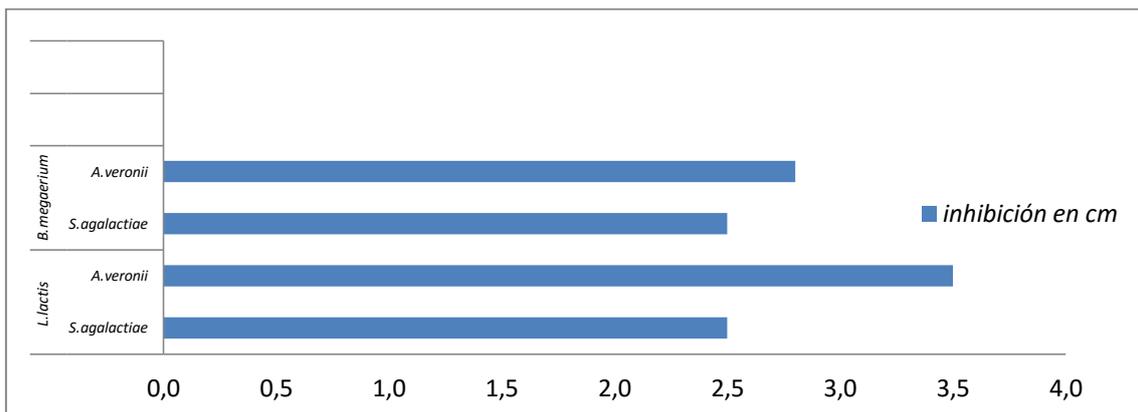


Figura 2 Zonas de inhibición producidas por los extractos de probióticos frente a *S.agalactiae* y *A.veronii*

Los resultados obtenidos en el análisis de varianza, mostraron que tanto el valor P para el control de *A. veronii* como para el *S.agalactiae*, fue mayor de 0.05 ($P>0.05$), lo cual significa que no existe una diferencia estadísticamente significativa entre la actividad bactericida del extracto de *L.lactis* y *B.megaterium*, frente a cada uno de los patógenos estudiados, con un nivel de confianza del 95%.

El perfil mostrado cromatografía de gases con detector selectivo de masas GC-MS evidencia que el extracto de *Bacillus megaterium* genera en su mayoría ácidos orgánicos, mostrando la presencia de ácido n-hexadecanoico. ácido octadecenoico producción de imidazoles. Por cromatografía líquida HPLC, se comprobó la presencia de ácido láctico confirmando el carácter homofermentador del *Lactococcus lactis*.

DISCUSIÓN

De acuerdo a los resultados obtenidos en las pruebas de inhibición se encontró un efecto positivo de los extractos de *Lactococcus lactis* y *Bacillus megaterium* frente a las cepas patógenas de *A. veronii* y *S.agalactiae*; sin diferencias estadísticamente significativas entre ellos. En investigaciones realizadas con el ensayo de difusión, mostraron que *A. hydrophila*, disminuyó su crecimiento ante la presencia de tres tipos de probióticos(16)(17) estos resultados soportan los hallados en esta investigación.

Estudios realizados por Kumar y colaboradores en 2012 y 2014(17)(18), mostraron el poder inhibitorio del *Lactobacillus plantarum*, frente a *A. veronii*, *P.aeruginosa* y *E.coli*. Investigaciones realizadas por Hatje y colaboradores en 2014(19), también confirmaron el control que ejercen las bacterias lácticas cuando se sometieron conjuntamente con *A.veronii* en las líneas celulares Caco2, disminuyendo notablemente la adhesión de estos microorganismos a las líneas celulares y generando lisis en ellas.

Muñoz y colaboradores en 2013(15), realizaron ensayos con bacterias ácido lácticas contra bacterias gram negativas y gram positivas patógenas de peces, encontrando un amplio espectro de inhibición contra ellas; determinando que la actividad de estas bacterias se deba probablemente a la producción de bacteriocinas, posiblemente esta sea la razón por la cual se haya encontrado inhibición de *A.veronii* y *S.agalactiae*. Sin embargo los resultados encontrados en la cromatografía HPLC, determinó la producción de ácido láctico, posiblemente el efecto inhibitorio del extracto de bacterias lácticas se deba a la producción de ácido láctico.

Los resultados encontrados en esta investigación mostraron que tanto los extractos de bacterias lácticas como el de *Bacillus* controla el crecimiento de *S.agalactiae*, con una leve diferencia en la zonas de inhibición por parte del extracto de bacterias lácticas, resultados similares fueron mostrados por Serna y Colaboradores en 2015(20), en donde la actividad antimicrobiana de *Weisella confusa*, bacteria ácido láctica, inhibió patógenos in vitro causantes de mastitis como *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus agalactiae*, un hallazgo importante, no sólo por ejercer un control natural sobre mastitis sino también por el efecto positivo de estos directamente en acuacultivos.

Adineh y colaboradores en 2013(21), probaron en células Caco, el efecto de las bacterias lácticas, *Aeromona veronii* y *Aeromona hidrofila*, encontrando que las bacterias lácticas compitieron por los sitios de adhesión a las células y disminuyó considerablemente la viabilidad de las bacterias patógenas, este estudio concuerdan con los encontrados en esta investigación donde los extractos de bacterias lácticas inhibieron considerablemente el crecimiento de *A.veronii*, in vitro(10).

Dentro del género *Bacillus sp*, la especie *Bacillus licheniformis* ha demostrado ser un potente antifúngico mediante la secreción de antibióticos, tales como, bacillomicina, licheniformina, proticina y bacitracina principalmente, además de imidazol(22); así mismo la especie *Bacillus circulans* produce ciertos metabolitos de origen antibiótico tales como la butirosina, circulina, polipeptina, xilosantina entre otras; lo que explica su amplio uso como bioprotector, estos resultados soportan los encontrados en el análisis de masas realizado al extracto de *Bacillus megaterium*, en donde se obtuvo imidazol, compuestos con actividad antifúngica ampliamente usados para el control de crecimientos de mohos y levaduras(23). Así mismo Kumar y colaboradores en 2012(17), revelaron actividad inhibitoria del extracto de *Bacillus sp*, frente a patógenos del suelo como *Sclerotinia sclerotiorum*; el cultivo filtrado inhibió también *Fusarium oxysporum* and *Macrophomina phaseolina*, in vitro; encontrando en el análisis de masas la presencia de ácido palmítico y ácido esteárico(23) (24), también comprometidos en la inhibición de estos patógenos. Estos hallazgos concuerdan con los reportados en el análisis de masas de esta investigación, donde se reveló la presencia de estos de componentes en el extracto libre de células del Bacilo esporulado.

Los resultados obtenidos en esta investigación evidenciaron que los microorganismos probióticos controlan de forma efectiva el crecimiento de patógenos como *A.veronii* y *S.agalactiae*, los metabolitos caracterizados en los extractos de *L.lactis* revelaron la producción de ácido láctico y en el extracto de *B.megaterium*, la producción de ácido palmítico, esteárico e imidazol. Estos resultados soportan la importancia de emplear probióticos de bacilos esporulados y de bacterias lácticas como promotores de crecimiento en la industria acuícola.

CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en la investigación evidenciaron que el *B.megaterium* y el *L.lactis* controlan de forma efectiva el crecimiento de patógenos como *A.veronii* y *S.agalactiae*. Estos resultados soportan la importancia de seleccionar microorganismos con alto nivel de especificidad, para reintroducirlos posteriormente a la nutrición del animal.

AGRADECIMIENTOS.

Los autores expresan sus agradecimientos al Fondo Nacional de Regalías, dentro del convenio **460000982**, entre la Gobernación de Antioquia y la Corporación Universitaria Lasallista, al laboratorio de Instrumentación y Microbiología de la Universidad Nacional.

Bibliografía

1. 2014 F. Estado Mundial de la Pesca y la Acuicultura. la Pesca y la Acuic la FAO [Internet]. Available from: <http://www.fao.org/3/a-i3720s.pdf>
2. Phillips, I., Casewell, M., Cox, T., De Groot, B., Friis, C., Jones, R., Nightingale, C., Preston, R., Waddell . Does the use of antibiotics in food animals pose a risk to human health? A critical review of published data. *J Antimicrob Chemother* [Internet]. 2004;53:28–52.
3. Pérez T, Balcazar JL, Ruiz-Zarzuola I, Halaihel N, Vendrell D de BI et al. Host-microbiota interactions within the fish intestinal ecosystem. *Mucosal Immunol*
4. Lategan M. J., Torpy F. R. and LFG. “Control of saprolegniosis in the eel *Anguilla australis* Richardson, by *Aeromonas media* strain A.” *Aquaculture*. 2004;240(1-4):19–27.
5. Satish kumar R, Ragu Varman D, Kanmani P, Yuvaraj N, Paari K, Pattukumar V A V. Isolation, Characterization and Identification of a Potential Probiotic from South Indian Fermented Foods and Its Use as Biopreservative. *Probiotics Antimicrob Proteins*. 2009;2(3):145–51.
6. Sánchez B, Urdaci MC, Margolles A. Extracellular proteins secreted by probiotic bacteria as mediators of effects that promote mucosa-bacteria interactions. *Microbiology*. 2010. p. 3232–42.
7. Hugo AA, Kakisu E, De Antoni GL PP. Lactobacilli antagonize biological effects of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* in vitro. *Lett Appl Microbiol* [Internet]. 2008;46(6):613–9. Available from: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1472-765X.2008.02363.x/epdf>
8. Moorthy G, Murali MR DS. Lactobacilli facilitate maintenance of intestinal membrane integrity during *Shigella dysenteriae* 1 infection in rats. *Nutrition*
9. Vine NG, Leukes WD, Kaiser H, Daya S, Baxter J, Hecht T. c. *J Fish Dis*. 2004;27(6):319–26.
10. Watson, A.K., Heinrich, K., Lategan, M.J., Gibson L. Probiotics in aquaculture: The need, principles and mechanisms of action and screening processes. *Aquaculture*. 2008;274:1–14.
11. Del’Duca A, Evangelista Cesar D, Galuppo Diniz C CAP. Evaluation of the presence and efficiency of potential probiotic bacteria in the gut of tilapia (*Oreochromis niloticus*) using the fluorescentin situ hybridization technique. *Aquaculture*. 2013;388:115–21.
12. Zhang, Yuting et al. High-yield production of a chitinase from *Aeromonas veronii* B565 as a potential feed supplement for warm-water aquaculture. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2014;98(4):1651–62.
13. Harikrishnan, R. and Balasundaram C. Modern trends in *Aeromonas hydrophila* disease management with fish. *Rev Fish Sci*. 2005;13:281–320.
14. Akhlaghi M, Munday B WR. Comparison of passive and native immunization of fish against streptococcosis (enterococcosis). *J Fish Dis*. 1996;19:251–8.

15. Muñoz-Atienza, E., Gómez-Sala, B., Araújo, C., Campanero, C., Del Campo, R., Hernández, P. E., & Cintas LM. Antimicrobial activity, antibiotic susceptibility and virulence factors of Lactic Acid Bacteria of aquatic origin intended for use as probiotics in aquaculture. *BMC Microbiol* [Internet]. 2013;13(1):15.
16. Das BK, Nidhi RGN, Roy P, Muduli AK, Swain P, Mishra SS, et al. Original Research Article Antagonistic activity of cellular components of *Bacillus subtilis* AN11 against bacterial pathogens. 2014;3(5):795–809.
17. Kumar, A., Saini, S., Wray, V., Nimtz, M., Prakash, A., & Johri BN. Characterization of an antifungal compound produced by *Bacillus* sp. strain A5F that inhibits *Sclerotinia sclerotiorum*. *J Basic Microbiol*. 2012;52(6):670–8.
18. Kumar, M., Jain, A. K., Ghosh, M., & Ganguli A. Characterization and Optimization of an Anti- *Aeromonas* Bacteriocin Produced by *Lactococcus lactis* Isolated from Hukuti Maas an Indigenous Fermented Fish Product. *J Food Process Preserv*. 2014;38(3):935–47.
19. Hatje E, Neuman C, Katouli M. Interaction of *Aeromonas* strains with lactic acid bacteria via Caco-2 cells. *Appl Environ Microbiol* [Internet]. 2014 Jan 15 [cited 2015 Jul 6];80(2):681–6.
20. Serna C, Liliana, Valencia H, Leidy Johana, & Campos G R. Lactic acid bacteria with antimicrobial activity against pathogenic agent causing of bovine mastitis. *Biotechnol en el Sect Agropecu y Agroindustrial* [Internet]. 2015;9(1):97–104.
21. Adineh H, Jafaryan H, Sahandi J, Alizadeh M. Effect of *Bacillus* spp. probiotic on growth and feeding performance of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* larvae. *Bulg J Vet Med*. 2013;(1):29–36.
22. Bacon, C., Hinton, D., y Hinton A. Growth-inhibiting effects of concentrations of fusaric acid on the growth of *Bacillus mojavensis* y other biocontrol *Bacillus* species. *J Appl Microb* [Internet]. 2006;100(1):185–94.
23. X. H. Chen, R. Scholz MB. Difficidin and bacilysin produced by plant-associated *Bacillus amyloliquefaciens* are efficient in controlling fire blight disease. *J Biotechnol* [Internet]. 2009;140(1-2):38–44.
24. Zhao, X., Zhou, Z. J., Han, Y., Wang, Z. Z., Fan, J., & Xiao HZ. Isolation and identification of antifungal peptides from *Bacillus* BH072, a novel bacterium isolated from honey. *Microbiological Res* [Internet]. 2013;168(9):598–606.