

2024

Informe de
INVESTIGACIÓN

020-24

NO-2024-39498348-APN-DNI#INIDEP

16/04/2024

Actividad antimicrobiana de extractos obtenidos a partir de bivalvos

Andrea L. Salomone

Citar como:

Salomone AL, 2024. Actividad antimicrobiana de extractos obtenidos a partir de bivalvos. Inf Investigación INIDEP N° 020/24, 06 pp.



Actividad antimicrobiana de extractos obtenidos a partir de bivalvos

Andrea L Salomone¹

¹ Gabinete de Genética Molecular y Microbiología. Instituto Nacional de Investigación y Desarrollo Pesquero

Resumen

En los últimos años, el uso excesivo de antibióticos en medicina, producción animal, agricultura y en la conservación de productos alimenticios, ha contribuido a la aparición de patógenos resistentes a los antibióticos convencionales. En la actualidad existe un gran interés en encontrar nuevas moléculas antibacterianas obtenidas a partir de fuentes naturales y ecológicamente seguras. En bivalvos, al ser organismos filtradores, se encuentran péptidos antimicrobianos naturales en hemolinfa, con efecto bactericida o bacteriostático. En este trabajo se evaluó la capacidad antimicrobiana en medio de cultivo líquido de diferentes extractos proteicos obtenidos a partir de tejido blando de berberecho, almeja amarilla y mejillón. Los resultados mostraron que los péptidos provenientes de las tres especies de bivalvos utilizadas, no presentaron actividad antimicrobiana frente al *Escherichia coli*

Palabras Clave

Antimicrobianos. Péptidos bioactivos. Biotecnología. Bivalvos. CIM.

Introducción

La búsqueda de nuevos antibióticos a partir de fuentes naturales y ecológicamente seguras genera un gran interés en la industria biotecnológica, y su campo de aplicación es amplio: agricultura, medicina humana y animal, alimentos, acuicultura (Kim y Mendis 2006; Shahidi y Zhong 2008; Lordan et al. 2011; Najafian et al. 2012; Bahar y Ren 2013; Wang et al. 2017).

Una clase de moléculas que poseen actividad antimicrobiana son los péptidos de bajo peso molecular, que pueden ser naturales (Sharma et al. 2009; Sugesh y Mayavu 2013; Boulet et al. 2019), sintéticos o generados a partir de diferentes procesos (Ryan et al. 2011; Ennaas et al. 2015; Hou et al. 2017; Salomone y Massa, 2018; Salomone 2020).

Los péptidos antimicrobianos son muchas veces preferidos a los antibióticos convencionales porque eliminan las bacterias más rápidamente, su actividad no se ve afectada por los mecanismos de resistencia a los antibióticos, poseen alta especificidad para organismos procariontes y baja o nula toxicidad para los eucariotes (Shahidi y Zhong 2008; Najafian y Babji 2012). Estos péptidos son moléculas anfifílicas o anfipáticas menores a 15 kDa, con alto contenido de lisina y arginina, que les confiere carga neta positiva (Tincu y Taylor 2004; Hancock et al. 2006; Lemus et al. 2016; Kuppasamy et al. 2019). Uno de los mecanismos por el cual estas moléculas ejercen su función sobre los microorganismos es por la unión de su carga neta positiva a la carga neta negativa de la superficie lipídica microbiana a través de interacciones electrostáticas, permeabilizando la membrana. Esta interacción provoca un desplazamiento de los cationes divalentes (Mg^{+2} y Ca^{+2}), facilitando la formación de áreas desestabilizadas en la membrana y promoviendo la translocación del péptido a su interior. De esta manera inducen la lisis celular directa o la perturbación de la membrana, de tal manera



que permite la salida de componentes celulares, confiriéndoles acción bactericida (Gutiérrez y Orduz 2003; Kuppusamy et al. 2019).

Los organismos marinos son un gran recurso para la obtención de moléculas bioactivas. En particular los invertebrados, que poseen un sistema inmune innato muy efectivo el cual es la primera línea de defensa frente a bacterias, hongos y virus. En moluscos bivalvos se encuentran en hemolinfa, y en tejidos y órganos que están expuestos a potenciales patógenos. Los péptidos por lo general se sintetizan como pro-péptidos que, luego de activarse, adoptan una estructura secundaria que les confiere su función efectora. Pueden estar codificados en el genoma o generarse como metabolito secundario (Tincu y Taylor 2004; Sumita et al. 2009; Bahar y Ren 2013; Sugesh y Mayavu 2013).

Existen varias metodologías para la obtención de este tipo de moléculas, y una de ellas es mediante extracción con diferentes tipos de solventes (Sharma et al. 2009; Sugesh y Mayavu 2013; Kiran et al. 2014; Injai et al. 2016). En este trabajo se seleccionó el método de extracción ácido acético/acetona de acuerdo a los resultados obtenidos en un trabajo previo (Salomone 2020), para obtener péptidos de tejidos de berberechos (*Donax hanleyanus*), almeja amarilla (*Amarilladesma mactroides*), mejillón (*Mytilus platensis*), y se evaluó la actividad antimicrobiana de cada uno de ellos sobre *Escherichia coli*. mediante el ensayo de Concentración Inhibitoria Mínima (CIM).

Materiales y métodos

Los extractos proteicos fueron obtenidos a partir de tejidos blandos de berberechos, almeja amarilla y mejillón. Se utilizó el método de Ácido Acético/Acetona, que es específica para la obtención de proteínas y péptidos, en una relación de 1,5 g de peso húmedo/2 ml de ácido acético 10 %, se incubó por 24 hs a 4 ± 1 °C y se centrifugó a 10.000 rpm durante 15 min. El sobrenadante se traspasó a un tubo limpio, se le agregó 3 volúmenes de acetona fría, se incubó por 24 hs a 4 ± 1 °C y se centrifugó a 5.000 rpm durante 15 min. El precipitado obtenido se secó en estufa a 60 ± 1 °C, hasta peso constante (modificado de *Thermo Fisher Inc.* 2009). Los sólidos recuperados fueron solubilizados en dimetilsulfóxido (DMSO) para obtener una concentración final de 10 mg/ml, se esterilizaron con filtro de 0,22 μ m, y se conservaron a -20 ± 1 °C hasta su uso.

Para determinar el peso molecular aproximado de los extractos, se realizó electroforesis en gel de poliacrilamida. Para ello, 0,1 ml de cada extracto fueron tratados con *Buffer* de siembra 5X (2,5 ml SDS 10%; 0,2 ml *B*-Mercaptoetanol; 0,5 ml azul de bromofenol 0,05%; 0,5 ml Tris 0,5 M; pH 6,8) y calentados a 100 °C durante 5 minutos, e inmediatamente enfriados en hielo. De cada muestra obtenida se sembraron 20 μ l. La electroforesis se realizó en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE), al 15 % para el gel separador y al 4 % para el gel concentrador (acrilamida 30 %; bisacrilamida 0.8 %; SDS 10 %; persulfato de amonio 100 mg/ml; TEMED; *Buffer* del gel separador: Tris 1M pH = 8,8; *Buffer* del gel concentrador: Tris 0,5 M; pH = 6,8). La corrida electroforética se llevó a cabo utilizando *Buffer* Tris-Glicina (Glicina 14,4 g/l; Trizma Base 3 g/l; SDS 10%), durante 2 hs a 120V. Para estimar el peso molecular de los péptidos se sembraron 5 μ l de *BLUelf Prestained Protein Ladder* (Genbiotech, Argentina). El gel fue teñido durante 1 hora (*Coomassie Blue* 0,25 g; Metanol 45 %; Ácido acético 10 %), y se reveló con varios lavados en solución de decoloración (Metanol 10 %; Ácido acético 40 %) durante toda la noche (Laemmli 1970).

La concentración inhibitoria mínima (CIM) se define como la menor dilución de una determinada sustancia en la cual no se observa crecimiento de microorganismos. Para determinarla, se evaluó la capacidad antimicrobiana de cada extracto mediante el método estándar recomendado por la CLSI (*Clinical and Laboratory Standards Institute*) basado en Geis et al. (1983). El ensayo se efectuó en microplacas de cultivo de 96 pocillos con fondo en U en un volumen final de 200 μ l, con medio de cultivo LB (extracto de levadura 0,5 %; peptona 1 %; cloruro de sodio 1 %; pH 7). Se realizaron

diluciones seriadas 1:2 de cada uno de los extractos a testear de manera que la concentración inicial en el primer pocillo fue 5 mg/ml. En cada pocillo se inocularon 1×10^5 UFC de *Escherichia coli* ATCC. Se incluyeron controles de crecimiento (medio LB inoculado con *E. coli* ATCC), de actividad antimicrobiana (a. medio LB inoculado con *E. coli* ATCC y suplementado con ampicilina; b. medio LB inoculado con *E. coli* ATCC y suplementado con extractos peptídicos de vieira patagónica (*Zygochlamys patagonica*) obtenidos previamente, y de contaminación (medio LB solo, y medio LB suplementado con los extractos peptídicos). Las placas fueron incubadas a 37 ± 1 °C durante 24 hs. Los ensayos se realizaron por duplicado observando a simple vista el crecimiento, o no, del microorganismo testado.

Resultados y Discusión

Mediante electroforesis SDS-page se verificó la presencia de péptidos de peso molecular aproximado a 18 kDa (Figura 1). Los ensayos de actividad antimicrobiana mostraron que ninguno de los tres extractos presentó actividad antimicrobiana frente a *E. coli*, mientras que los controles positivos, presentaron actividad: ampicilina 1,25 mg/ml y vieira patagónica 2,5 mg/ml.

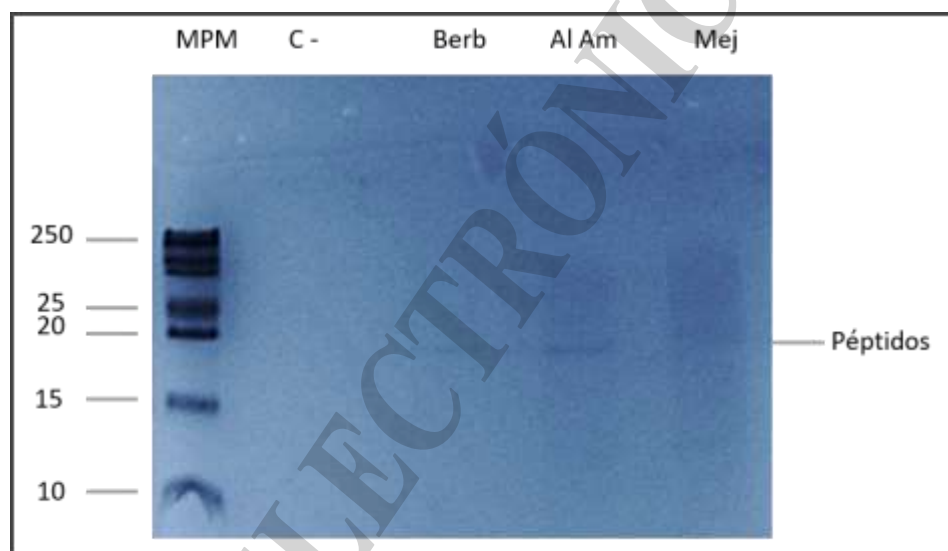


Figura 1. SDS-PAGE 15 %. MPM: marcador de peso molecular, kDa. C-: agua. Berb: berberecho; Al Am: almeja amarilla; Mej; mejillón.

De acuerdo a los resultados obtenidos, se infiere que los péptidos obtenidos de este conjunto de bivalvos podrían poseer carga neta negativa, impidiéndoles la unión a las cargas netas negativas de la membrana del microorganismo utilizado, impidiendo permeabilizar la misma, y, por lo tanto, no inducir la lisis celular (Gutiérrez y Orduz, 2003). Otra de las razones puede deberse al tamaño de los péptidos obtenidos en los extractos, donde su peso molecular estimado es de 18 kDa, y de acuerdo a datos bibliográficos, péptidos mayores a 15 kDa no presentan actividad antimicrobiana (Tincu y Taylor 2004; Hancock et al. 2006; Lemus et al. 2016; Kuppasamy et al. 2019).



Conclusiones

Se realizarán futuros ensayos utilizando solo extractos peptídicos de vieira patagónica (que aquí se utilizó como control positivo del ensayo), debido a que los extractos de berberechos, almeja amarilla y mejillón no presentaron actividad antimicrobiana.

Bibliografía

- Bahar AA, Ren D .2013. Antimicrobial peptides. *Pharm.*, 6: 1543-1575.
- Bohuellet H, Bentot F, Hequet A, Gannen-Helbaz C, Bechara C, Pacreau E, Launay P, Sagan S, Jolival C, Lacombe C, et al. 2019. Small antimicrobial peptide with in vivo activity against sepsis. *Molecules*, 24:1702.
- CLSI. Clinical and Laboratory Standards Institute. 2012. *Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility* Geis *et al.* 1983. Potential of lactic streptococci to produce bacteriocin. *Appl Environ Microbiol.* 45(1): 205-211.
- CLSI. *Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard - Ninth Edition.* CLSI document M07-A9.
- Ennaas N, Hammami R, Beaulieu L, Fliss I. Purification and characterization of four antibacterial peptides from protames hydrolysate of Atlantic mackerel (*Scomber scombrus*) by-products. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 195-200.
- Gutierrez P, Orduz S. 2003. Péptidos antimicrobianos: estructura, función y aplicaciones. *Actual Biol.*, 25 (78): 5-15.
- Hancock RE, Brown KL, Mookherjee N. 2006. Host defence peptides from invertebrates - emerging antimicrobial strategies. *Immunobiology*, 211 315-322.
- Hou Y, Wu Z, Dai Z, Wang G, Wu G. 2017. Protein hydrolysates in animal nutrition: Industrial production, bioactive peptides, and functional significance. *J. Anim. Sci. Biotechnol.*, 8:24.
- Chen F, Wei Z, Zhao X, Shao Y, Zhang W. 2016. Antimicrobial activity of extracts of hepatopancreas and mucus of bivalve, *Meretrix meretrix*. *European J. Biotechnol. Biosci.*, 4: 36-38.
- Kiran N, Siddiqui G, Khan AN, Ibrar K, Tushar P. 2014. Extraction and screening of bioactive compounds with antimicrobial properties from selected species of mollusk and crustacean. *J. Clin. Cell. Immunol.*, 5:1.
- Kuppusamy R, Willcox M, Black DS, Kumar N .2019. Short cationic peptidomimetic antimicrobials. *Antibiotics*, 8: 44.
- Kim SK, Mendis E. 2006. Bioactive compounds from marine processing byproducts - A review. *Food Res Int.* 39: 383-393.
- Laemmli UK. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259), 680-685.
- Lemus M, Salazar R, Lapo B, Chung K. 2016. Metalotineínas en bivalvos marinos. *Lat. Am. J. Aquat. Res.*, 44: 202-215.
- Lordan S, Ross RP, Stanton C. 2011. Marine bioactives as functional food ingredients: potential to reduce the incidence of chronic diseases. *Mar Drugs.* 9: 1056-1100.



- Najafian L, Babji AS. 2012. A review of fish-derived antioxidant and antimicrobial peptides: Their production, assessment, and applications. *Peptides*. 33: 178-185.
- Ryan JT, Ross RP, Bolton D, Fitzgerald GF, Stanton C. 2011. Bioactive peptides from muscle sources: meat and fish. *Nutrients*, 3:765-791.
- Salomone A L. 2020. Actividad antimicrobiana de diferentes extractos obtenidos a partir de la vieira patagónica (*Zygochlamys patagonica*). *MAFIS*, 33(2), 151-161.
- Salomone AL, Massa AE. 2018. Evaluación de la capacidad antimicrobiana de hidrolizados enzimáticos obtenidos a partir de subproductos de merluza. *Inf. Invest. INIDEP N° 10/2018*, 11 pp.
- Shahidi F, Zhong Y. 2008. Bioactive peptides. *J. AOAC Int.* 9(4): 914-31.
- Sharma S, Chatterji A, Das P. 2009. Effect of different extraction procedures on antimicrobial activity of marine bivalves: a comparison. *Pertanika J. Trop. Agric. Sci.*, 32: 77 – 83.
- Sugesh S, Mayavu P. 2013. Antimicrobial activities of two edible bivalves *M. meretrix* and *M. casta*. *Pak. J. Biol. Sci.*, 16: 38-43.
- Thermo Fisher Inc. 2009. Acetone precipitation of proteins. TR0049.1.
- Tincu JA, Taylor SW. 2004. Antimicrobial peptides from marine invertebrates. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 48: 3645-3654.
- Wang X, Yu H, Xing R, Li P. 2017. Characterization, preparation, and purification of marine bioactive peptides. *Hindawi BioMed Research International*. Article ID 9746720.

COPIA ELECTRONICA INIDEP