

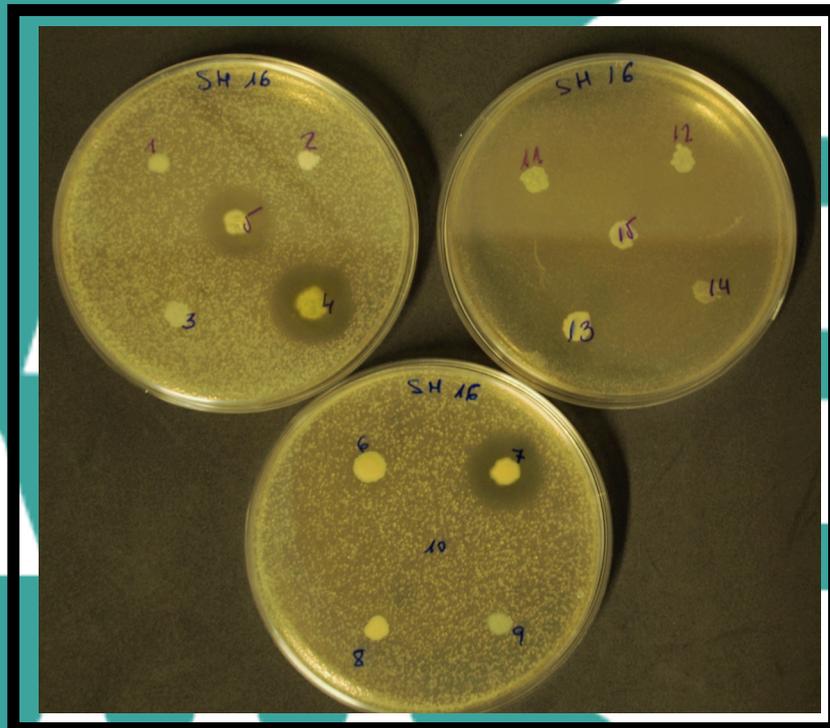


Universidad de Oviedo
Departamento de Biología Funcional



Facultad de Biología

Aislamiento y caracterización de cepas bacterianas productoras de bacteriocinas de origen marino para su uso en acuicultura.



Herminia Margarita Berdasco Muñoz

Julio de 2016.

Durante las últimas décadas el uso excesivo de antibióticos en la prevención y tratamiento de enfermedades que afectan al cultivo de peces, trae consigo la aparición de reservorios bacterianos resistentes a antibióticos, no solo en animales, también en el medio acuático, con el consiguiente peligro para la salud humana y el medio ambiente. En este contexto, es necesaria la introducción de nuevas técnicas sostenibles que garanticen el tratamiento de estas enfermedades de forma inocua. Entre estas técnicas destaca el empleo de cepas bacterianas productoras de bacteriocinas, tanto por su efecto inhibitorio, como por los efectos beneficiosos en el hospedador.

El objetivo de este estudio consiste en la caracterización de cepas bacterianas con actividad bacteriocinogénica. Para ello, se aislaron 198 colonias del intestino de 19 especies diferentes de peces salvajes procedentes del Mar Cantábrico, en medio de cultivo TSA en base a su morfología, color y brillo. Para comprobar la actividad antagonista de estas cepas se realizaron enfrentamientos con especies del género *Vibrio*, *Photobacterium* y *Shewanella*. Se detectaron 15 cepas con actividad antagonista frente al menos una cepa patógena, de entre las cuales, 4 presentaron actividad inhibitoria frente a más de un patógeno. La identificación de estas cepas se hizo mediante la secuenciación del gen 16S ARNr, presentando una homología > 97% frente a *Alcaligenes faecalis* y *Myroides marinus*. Finalmente se estudió el efecto de los parámetros físico-químicos en la actividad bactericida (pH, Tª y proteasas.)

Over the last decades, the overuse of antibiotics in treatment and prevention of fish farming diseases, leads the emergence of antibiotic resistant bacterial reservoirs, both in animals and aquatic environment, with consequent threat for human health as well as the environment. Within this context, the imperious need to introduce new sustainable techniques to ensure the treatment of these diseases in a harmless manner is completely necessary. Among these techniques, the use of bacterial strains producing bacteriocins might be considered as a viable alternative, not only for its inhibitory effect, also for the beneficial effects in the host.

This study is aimed to characterize bacterial strains with bacteriocin producing activity. To assess their bacteriocin producing activity 198 strains were isolated from gastrointestinal tract of 198 different Cantabrian Sea wild fish species. TSA culture was used in order to isolate the strains according to its color morphology and shine. Among a total of 15 strains were found to produce bacteriocins against the aquaculture pathogenic genera *Vibrio*, *Photobacterium* and *Shewanella*, reflecting that the highest antagonistic effect was shown by 4 strains.

The bacterial strains were identified as *Alcaligenes faecalis* and *Myroides marinus* on the basis of PCR amplification of 16S ribosomal RNA gene followed by sequencing (>97% of homology). Finally the antibacterial activity was performed by three different treatments: thermostability, enzymes effect and pH effect.



D. José María Rodríguez López, DIRECTOR ACCIDENTAL DEL CENTRO OCEANOGRÁFICO DE GIJÓN DEL INSTITUTO ESPAÑOL DE OCEANOGRAFIA

EXPONE:

Que la Tesis de Licenciatura en Biología titulada “**Aislamiento y caracterización de cepas bacterianas productoras de bacteriocinas de origen marino para su uso en acuicultura**” realizada por Dña, Herminia Margarita Berdasco Muñoz, bajo la dirección de la Dra. Alma Hernández de Rojas, ha permanecido en depósito en este Centro durante un periodo de 7 días a disposición de los doctores del mismo sin haberse presentado alegación alguna, tras lo cual

INFORMA:

Que dicho trabajo reúne la calidad científica necesaria para su presentación y defensa.

Y para que así conste, firma el presente informe en Gijón, a 7 de julio de 2016

Fdo. José María Rodríguez López



DÑA Alma Hernández de Rojas Investigadora de Instituto Español de Oceanografía de Gijón y DÑA. Elisa M^a Miguélez González Titular de la Universidad de Oviedo del Área de Microbiología, del Departamento de Biología Funcional de la Universidad de Oviedo,

CERTIFICAN:

Que la Licenciada en Biología Dña. Margarita Berdasco Muñoz ha realizado bajo nuestra dirección, el trabajo titulado: “**Aislamiento y caracterización de cepas bacterianas productoras de bacteriocinas de origen marino para su uso en acuicultura**”, en el Instituto Español de Oceanografía C.O. de Gijón, y reúne a nuestro juicio los requisitos necesarios para ser defendido como Tesina de Licenciatura.

En Gijón 30 Junio de 2016.

Fdo. Elisa M^a Miguélez González

Fdo. Alma Hernández de Rojas

Tesina de Licenciatura: Aislamiento y caracterización de cepas bacterianas productoras de bacteriocinas de origen marino para su uso en acuicultura.

Autora: Herminia Margarita Berdasco Muñoz.

Centro de realización: Instituto Español de Oceanografía - C.O. de Gijón.

AGRADECIMIENTOS

Quisiera Agradecer a Alma Hernández de Rojas todo su apoyo y empeño puestos para que este proyecto saliera adelante. Por su generosidad y tiempo empleado en enseñarme muchas cosas nuevas en el laboratorio, así como por los medios y facilidades puestos a mi disposición.

También quisiera agradecer a Carmen Castro todos los buenos consejos y conocimientos brindados a la hora de trabajar en equipo. Por su buena compañía y por hacer que el trabajo en el laboratorio fuese divertido a la vez que gratificante.

Quisiera agradecer a ambas investigadoras por haber hecho posible que esta enriquecedora experiencia y por contribuir a que mi estancia en el Instituto español de Oceanografía estuviese llena de buenos momentos.

Finalmente dar las gracias a mi familia por haberme apoyado en todo momento y a Sonia Barbes por lo buena amiga que siempre demuestra ser.

ÍNDICE.

1. Introducción	1
1.1 Clasificación de las bacteriocinas.....	2
1.2 La microbiota del tracto gastrointestinal de peces.....	5
1.3 Efectos beneficiosos de las bacterias Gram negativas en el tracto gastrointestinal.....	7
1.4 Efectos beneficiosos de las bacterias Gram positivas en el tracto gastrointestinal.....	7
2. Objetivos	7
3. Material y métodos	8
3.1. Cepas bacteriana y aislamiento	8
3.2. Detección y cuantificación de las actividades inhibitorias	9
3.3. Caracterización preliminar de las actividades antimicrobianas	10
3.4 Caracterización genética de las cepas productoras	11
4. Resultados	14
4.1. Aislamiento de cepas probióticas.....	14
4.2. Ensayo directo de la actividad antimicrobiana y de la actividad inhibitoria de los sobrenadantes	15
4.3. Caracterización preliminar de las actividades antimicrobianas	16
4.4. Caracterización genética de las cepas productoras	20
4.5. Futuras líneas de estudio	25
5. Conclusiones	28
6. Bibliografía	29

ÍNDICE DE FIGURAS.

Figura 1. Patrones de bandas amplificadas (PCR).....	21
Figura 2. Patrones de bandas ISR-PCR en gel de agarosa.....	22
Figura 3. Patrones de bandas ISSR-PCR. Resultado obtenido con el Bioanalyzer 2100.....	23
Figura 4. Alineamiento de secuencias génicas.....	24
Figura 5. Árbol filogenético.....	25

ÍNDICE DE TABLAS.

Tabla 1. Especies capturadas.....	8
Tabla 2. Cepas de microorganismos patógenos	9
Tabla 3. Condiciones de reacción PCR.....	12
Tabla 4. Condiciones de reacción ISR-PCR.....	13
Tabla 5. Muestras de peces capturados en la VII Quedadas de pesca submarina solidaria de Santander 2014.....	14
Tabla 6. Crecimiento bacteriano en césped.....	15
Tabla 7. Actividad inhibitoria de los sobrenadantes.....	18
Tabla 8. Tratamiento térmico.....	19
Tabla 9 Tratamiento enzimático.....	19
Tabla 10. Efecto del pH.....	20
Tabla 11. Caracterización morfológica y bioquímica de <i>Myroides</i>	24
Tabla 12. Caracterización de las actividades antimicrobianas.....	27

1. INTRODUCCIÓN.

El rápido crecimiento demográfico propiciado por el aumento del nivel adquisitivo y la urbanización han provocado un incremento en el consumo de alimentos de origen marino hasta alcanzar un valor medio anual del 3,2%, valor que supera la tasa de crecimiento de la población mundial (1,6 %). Este aumento en el consumo de este tipo de alimentos ha suscitado la necesidad de introducir nuevas prácticas de pesca sostenible, entre las que destacan la acuicultura, situándose en el año 2012 en su máximo histórico con una producción de 90,4 millones de toneladas [1].

Esta intensificación en las prácticas acuícolas trae como consecuencia una mayor incidencia de patologías debidas, en su mayor parte, al uso excesivo de antibióticos empleados no solo para el tratamiento de las mismas, sino también para su prevención. Por esta razón, uno de los principales problemas a los que se enfrenta esta industria es la aparición de transferencias de reservorios de bacterias resistentes a antibióticos a otros microorganismos acuáticos, siendo de especial preocupación la transferencia a otros patógenos animales y de origen humano, y el acumulo de residuos antimicrobianos en los productos derivados de la acuicultura, con su consiguiente peligro para la salud humana y el medio ambiente [2].

Una alternativa propuesta al uso de antibióticos consiste en la introducción de cepas probióticas en los tanques de cultivo, para evitar la formación de agregados bacterianos resistentes (biofilms) en las instalaciones o en el material empleado para la manipulación de los mismos. Por otro lado, también se ha observado que el suministro de una dieta enriquecida con microorganismos probióticos proporciona una mejora del sistema inmune, la asimilación de nutrientes y el desarrollo normal del animal, evitando así una infección por patógenos en situaciones de estrés, muy comunes al manipular peces en condiciones de cautividad. [2].

Según Verschuere y col. (2000), un probiótico es un “suplemento vivo microbiano que tiene efectos beneficiosos en el hospedador modificando la flora asociada al mismo y la flora asociada al ambiente”. El efecto beneficioso de estos microorganismos viene asociado a sus diferentes mecanismos de acción, entre los que destacan, por una parte, la competencia por compuestos químicos disponibles y por lugares de fijación en la mucosa intestinal, así como el aumento de la respuesta inmune, asociada a la síntesis de sustancias que tienen un efecto positivo en las funciones que regulan el sistema inmune

del hospedador. Por otra parte la producción de compuestos inhibidores como peróxido de hidrógeno, diacetilo, compuestos orgánicos de cadena corta que modifican el pH, y bacteriocinas, provocan la muerte o impiden el crecimiento de organismos patógenos.

Entre estas sustancias inhibitorias de microorganismos patógenos, son de especial interés las bacteriocinas, que son péptidos de síntesis ribosomal, con o sin modificaciones postraduccionales, producidos y secretados por bacterias Gram-positivas y Gram-negativas y que poseen actividad antimicrobiana (bactericida o bacteriostática) [3].

1.1. Clasificación de las bacteriocinas.

La clasificación de las bacteriocinas producidas por bacterias Gram positivas atiende a sus rasgos estructurales como tamaño molecular o sensibilidad a la temperatura, mientras que en Gram negativas, la clasificación se basa en criterios funcionales, como los mecanismos necesarios para su reconocimiento en las células diana, o los que provocan la muerte celular de las mismas. [4]. Dentro de las bacterias Gram positivas, las que se encuentran citadas en este trabajo, hacen referencia al grupo de bacterias más estudiadas, las bacterias de ácido láctico (BAL).

Clasificación de bacteriocinas producidas por bacterias Gram positivas

Las bacteriocinas pertenecientes al grupo de las bacterias del ácido láctico (BAL) son las estudiadas de una forma más extensiva a la hora de establecer su clasificación y un mecanismo de acción, no solo por ser las más utilizadas en el procesamiento y conservación de alientos, sino también, por su creciente empleo como probióticos en humanos, animales terrestres y últimamente en animales acuáticos. [3]. Según esta clasificación las bacteriocinas de las BAL se dividen en cuatro clases [3]:

- Clase I o Lantibióticos. Bacteriocinas termoestables, policíclicas de pequeño tamaño molecular (<5kDa), que presentan aminoácidos poco usuales en su composición, que se generan postraduccionalmente por la deshidratación de residuos serina (Ser) y treonina (Tre), que origina deshidroalanina (Dha) y deshidrobutirina (Dhb) respectivamente. La Nisina es la más caracterizada dentro de este grupo. En función de su estructura y modo de acción, los lantibióticos se subdividen, a su vez, en dos grupos.



- Tipo Ia. Lantibióticos flexibles, elongados y catiónicos que actúan a nivel de membrana plasmática formando poros. Este grupo se subdivide en:
 - Subgrupo Ia1, que incluye los lantibióticos elongados cuya secuencia líder, del tipo Phe-Asn-Leu-Asp-Val es procesada por una serín-proteasa (NisA).
 - Subgrupo Ia2, que incluye los lantibióticos elongados cuya secuencia líder, del tipo “doble glicina” (Gly-Gly) es procesada por un transportador del tipo ABC, como es el caso de la citolisina.
- Tipo Ib. Lantibióticos globulares, neutros o aniónicos e hidrófobos, que son inmunológicamente activos y actúan como inhibidores de enzimas.
- Clase II o no lantibióticos. Bacteriocinas de pequeño tamaño molecular (<10 kDa), con un punto isoelectrico elevado, termoestables, sin aminoácidos modificados postraduccionalmente y que actúan a nivel de la membrana citoplasmática.
 - Subclase IIa. Son bacteriocinas del tipo/familia pediocina con una potente actividad anti-listeria, y un elevado grado de homología estructural (40-60%), especialmente en la región amino terminal, en la que se incluye la secuencia consenso Tyr-Gly-Asn-Gly-Val-X-Cys-X₄-Cys-X-Val (done X representa un residuo aminoacídico no conservado).
 - Subclase IIb. Son bacteriocinas cuya actividad antimicrobiana total depende de la acción complementaria de dos péptidos.
 - Subclase IIc. Bacteriocinas de la clase II que no se incluyen en ninguna de las subclases anteriores.
- Clase III. Bacteriocinas de elevado peso molecular (>30kDa), constituidas exclusivamente por aminoácidos no modificados y termolábiles (Helveticina J).
- Clase IV. Son bacteriocinas complejas que están integradas por una parte proteica y una o más fracciones lipídicas y/o glucídicas necesarias para su actividad biológica. (Leucocina S).

Clasificación de bacteriocinas producidas por bacterias Gram negativas.

Estos péptidos se clasifican en tres grupos principales [3]:



- Las colicinas son bacteriocinas producidas por *E. coli* que se caracterizan por su tamaño molecular relativamente grande (25-80 kDa); su producción está inducida por condiciones de estrés ligadas a la respuesta SOS de las células (e.g., niveles reducidos de oxígeno y nutrientes); su síntesis es generalmente letal para la célula productora; interaccionan con las células diana a través de receptores específicos de la superficie celular, lo que determina la especificidad en el reconocimiento de las mismas; su estructura se divide en dominios: un dominio N-terminal (implicado en la translocación de la bacteriocina al interior de la célula diana), un dominio central (implicado en la interacción con el receptor) y un dominio C-terminal (implicado en la lisis celular y la inmunidad); y la localización plasmídica de las agrupaciones génicas que codifican su producción e inmunidad.
- Las microcinas son bacteriocinas producidas por *E. coli* caracterizadas por su tamaño molecular relativamente pequeño (<10 kDa); su producción no inducida por el sistema SOS; su síntesis no es letal para la célula productora; su secreción generalmente durante la fase de crecimiento exponencial; provocan en la célula diana la formación de poros en la membrana celular o mediante la desestabilización del potencial de membrana; y un espectro de acción frente a enterobacterias es más amplio que el de las colicinas. Las microcinas se agrupan en dos clases (I y II) según la presencia de aminoácidos modificados postraduccionalmente:
 - Clase I agrupa las microcinas de tamaño molecular <5 kDa, con modificaciones postraduccionales y que ejercen su actividad antimicrobiana sobre dianas intracelulares.
 - Clase II agrupa a las microcinas de mayor tamaño molecular (7-10 kDa) y se subdivide en dos subclases:
 - Subclase IIa. Se caracterizan por la ausencia de modificaciones postraduccionales, la posible presencia de puentes disulfuro y su actividad sobre la membrana citoplasmática.
 - Subclase IIb. Incluye microcinas lineales que sufren una modificación postraduccional en el extremo C-terminal por la unión covalente de un grupo catecol sideróforo de tipo salmocelin.

- Las piocinas son bacteriocinas producidas por *Pseudomonas aeruginosa* que se dividen en:
 - Piocinas del tipo R. Son cilindros huecos que actúan desestabilizando el potencial de membrana de la célula sensible.
 - Piocinas del tipo F. Con forma de varilla no contráctiles, con una estructura cuadrada en un extremo y una estructura fibrilar en el otro extremo
 - Piocinas del tipo S. Son más pequeñas (similares a las colicinas), solubles, sensibles a las proteasas y con un modo de acción consistente en la formación de poros o en su actividad nucleasa frente al ADN y ARN.

1.2. La microbiota del tracto gastrointestinal de peces.

Los peces son organismos acuáticos cuyas superficies externas e internas (tracto gastrointestinal) están expuestas a patógenos potenciales. En el caso del tracto intestinal, una vía de entrada de estos microorganismos se produce con la ingesta de agua durante la alimentación y también con la empleada para mantener los procesos de osmorregulación en los primeros estadios larvarios, en los que la larva no precisa de la ingesta de alimento [5].

Los peces, una vez que eclosionan, no cuentan con un sistema inmune específico desarrollado, por lo que la protección frente a patógenos debe proceder de mecanismos de defensa no específicos, algunos de los cuales son aportados por la madre. Sin embargo, después de la eclosión, el tejido linfoide no se encuentra funcionalmente maduro, por lo que esta transferencia de antígenos al huevo desde la madre no es suficiente para hacer frente a enfermedades infecciosas [5]. Por esta razón, es necesario que la flora intestinal ejerza un estímulo antigénico en el tejido linfoide asociado al tracto gastrointestinal (GALT, del inglés gut-associated lymphoid tissue), clave en la activación y desarrollo de mecanismos de defensa implicados en el mantenimiento del correcto estado de salud intestinal [5].

En este sentido, entre los organismos presentes en la microbiota intestinal de peces se encuentran *A. hydrophila*, *Acinetobacter*, *Bacillus*, *Flavobacterium*, *Pseudomonas*, todas ellas representativas de la familia Enterobacteriaceae, así como bacterias anaerobias obligadas del género *Bacteroides*, *Clostridium* y *Fusobacterium*. Las

bacterias del ácido láctico (BAL) también están presentes (*Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc* y *Carnobacterium* spp.) [6].

Factores que afectan a la flora intestinal.

La flora intestinal presente en el pez adulto es una compleja mezcla de microorganismos que interactúan entre ellos y con el hospedador, provocando efectos beneficiosos o perjudiciales en el mismo. La colonización bacteriana en animales cultivados, y las consecuencias para el estado de salud del hospedador, dependen del mantenimiento de las condiciones ambientales y sanitarias de medio. Sin embargo, las fuerzas selectivas que tienen lugar en el intestino del hospedador también son muy importantes en el establecimiento de la microbiota del tracto intestinal. Para que esta interacción sea beneficiosa, el buen estado de salud del animal es imprescindible, sin embargo, hay múltiples factores que pueden afectar a este equilibrio. [5]

- a) Cambios en la dieta y el estrés. Los cambios en la actividad enzimática, producen diferencias en el contenido de polisacáridos, disacáridos, carbohidratos y proteínas presentes en la dieta, que afectan en última al equilibrio de la microbiota intestinal. [5]. Por otra parte, factores como el transporte de peces o la retirada de comida son causantes de estrés en el animal, provocando cambios en la microflora, al disminuir el número de *Lactobacillus* con el consiguiente incremento de enterobacterias [5].
- b) Medicamentos. Muchos de los antibióticos empleados para tratar las infecciones ocasionadas por patógenos son de amplio espectro, provocando que la microbiota innata se vea alterada en términos de número y diversidad de poblaciones. Cualquier reducción en los niveles de diversidad se traduce en una reducción de protección que proporciona la microbiota intestinal, con la consiguiente proliferación de patógenos oportunistas que colonizan nuevos nichos que antes no estaban disponibles debido a la previa competencia por lugares de fijación. De forma adicional, el reservorio de genes de resistencia a antibióticos de los restos de bacterias innatas del pez, puede ser transferido a los oportunistas o patógenos, con el consiguiente incremento de nuevas resistencias a antibióticos [7].
- c) Factores ambientales. La estabilidad de la microbiota intestinal está influenciada por cambios estacionales. Los estudios realizados por Hovda et al. (2011), en el salmón atlántico muestran que la presencia de bacterias lácticas (*Lactococcus*,

Weissella y *Lactobacillus*) está presente durante todo el año, mientras que la presencia de bacterias Gram negativas (*Vibrio* y *Photobacterium*) está solo presente en alguna épocas de año. [7].

1.3. Efectos beneficiosos de las bacterias Gram negativas en el tracto gastrointestinal.

Por una parte, los aislamientos de *E.coli* del intestino de peces han demostrado tener un reservorio de genes de resistencia antibióticos de importancia en medicina humana. Por otra parte las microcinas producidas por la familia Enterobacteriaceae y las microcinas M y H47 producidas por la cepa *E. coli* Nissle 1917 (EcN) resultan beneficiosas para el hospedador al inhibir patógenos causantes de enfermedades [6].

1.4. Efectos beneficiosos de las bacterias Gram positivas en el tracto gastrointestinal.

Las bacterias lácticas como *Bacillus spp.* (S11) aumentan la protección frente a enfermedades activando la respuesta humoral y celular en el hospedador, sin embargo, también son capaces de inhibir patógenos. Es el caso de *B. subtilis* aislada del intestino de la carpa india, que inhibe a *P. fluorescens*. Por otra parte la colonización intestinal por BAL endógenas previene el desarrollo de forunculosis en la trucha arcoíris. Finalmente, la administración oral de *C. butyricum* en *Oncorhynchus mykiss* refuerza la actividad fagocitaria de los leucocitos [6].

2. OBJETIVOS.

1. Aislamiento de cepas procedentes de la microbiota intestinal de peces salvajes.
2. Estudio de la sensibilidad de determinados patógenos de peces frente a los microorganismos aislados.
3. Identificación genética de los microorganismos aislados mediante secuenciación del gen 16S ARN.
4. Caracterización físico-química de la actividad bacteriocinogénica,

3. MATERIAL Y METODOS.

3.1. Cepas bacterianas y aislamiento.

Para el aislamiento de las posibles cepas probióticas se muestrearon un total de 19 especies que fueron capturadas en las costas de Cantabria durante la “VII Quedada de pesca submarina solidaria de Santander 2014” (tabla 1).

Especie	Sexo
Pinto (<i>Labrus bergylta</i>)	Hembra
Cabracho (<i>Scorpaena scrofa</i>)	Macho
Faneca (<i>Trisopterus luscus</i>)	Hembra
Congrio (<i>Conger conger</i>)	Hembra
Perla (<i>Lithognathus mormyrus</i>)	Macho
Faneca real (<i>Trisopterus luscus</i>)	Hembra
Abadejo (<i>Pollachius pollachius</i>)	Macho
Lubina (<i>Dicentrarchus labrax</i>)	Hembra
Mojarra (<i>Diplodus vulgaris</i>)	Hembra
Sargo (<i>Diplodus sargus cadenati</i>)	Hembra
San Martín (<i>Zeus faber</i>)	Hembra
Pintarroja (<i>Scyliorhinus canicula</i>)	Macho
Medregal (<i>Seriola dumerili</i>)	Macho
Dorada (<i>Sparus aurata</i>)	Macho
Sargo picudo (<i>Diplodus puntazo</i>)	Hembra
Dentón (<i>Dentex dentex</i>)	Hembra
Salmonete (<i>Mullus surmuletus</i>)	-
Ballesta (<i>Balistes capriscus</i>)	Hembra
Mulle (<i>Mugil cephalus</i>)	Macho

Tabla 1. Especies capturadas.

La disección de los ejemplares se realizó a las pocas horas de su muerte y de forma aséptica. Una vez realizada la extracción del paquete intestinal, éste se introdujo en tubos estériles para su transporte a 4°C al laboratorio. Las muestras fueron procesadas dentro de las 2 horas siguientes a su obtención.

Los intestinos fueron suspendidos en 10 mL de PBS estéril (Sigma-Aldrich) y se homogeneizaron durante 5 minutos en un Stomacher®. Posteriormente se realizaron diluciones seriadas de las muestras (1/10 a 1/1000), para realizar la siembra de 100 µl

de cada una de ellas en medio de cultivo TSA (Pronadisa) suplementado con 15% NaCl. Las placas se incubaron a 30°C, en aerobiosis, durante 2-7 días hasta observar la aparición de colonias.

Se seleccionaron diferentes colonias, en base a su morfología, color y brillo, que fueron sembradas de nuevo en medio TSA (Pronadisa) suplementado con 15% NaCl e incubadas a 30°C en aerobiosis hasta la obtención de cultivos puros. Para su conservación hasta su análisis, los microorganismos se crecieron en TSB (Pronadisa) suplementado con NaCl al 15% y se congelaron a -80°C adicionando al medio de cultivo glicerol al 15%.

3.2. Detección y cuantificación de las actividades inhibitorias.

Ensayo directo de la actividad antimicrobiana.

Para realizar una selección de los microorganismos que poseían actividad bacteriocinogénica, las cepas aisladas se crecieron directamente sobre placas con TSA semisólido (7,5% de agar) en las que se había inoculado un césped de microorganismos indicadores [8].

Cepa	Especie	Procedencia				
16/00 14/00 13/01 34/03 35/03	} <i>Vibrio harvey</i>	} Aisladas de <i>Solea senegalensis</i>				
41/01			<i>Photobacterium damsela</i>	Aisladas de <i>Solea senegalensis</i>		
SH2 SH4 SH6 SH16 SH19			} <i>Shewanella sp.</i>	} Aisladas de <i>Anguilla anguilla</i>		
Pdp 11					<i>Shewanella putrefacienc</i>	Aislada de <i>Solea senegalensis</i>
Pdp 13					<i>Shewanella báltica</i>	Aislada de <i>Solea senegalensis</i>
Va	<i>Vibrio anguillarum</i>	Cepa de colección				
Vsp	<i>Vibrio splendidus</i>	Cepa de colección				

Tabla 2. Cepas de microorganismos patógenos.

Como cepas indicadoras se emplearon 15 cepas de microorganismos patógenos procedentes de la planta de cultivo del Instituto Español de Oceanografía de Santander y de la Universidad de Málaga (tabla 2).

Ensayo de la actividad inhibitoria: técnica de difusión en agar.

Para estudiar la actividad inhibitoria de los sobrenadante se utilizó la técnica de difusión en agar [9], estudiando la presencia (+) o ausencia (-) de halo de inhibición. Se comprobó la sensibilidad que mostraban las 15 cepas patógenas de peces (se emplearon las mismas que en el ensayo anterior) a los compuestos bactericidas producidos por los microorganismos aislados.

Se sembraron en masa los microorganismos patógenos en placas con 15 ml de medio TSB semisólido, a las que se añadió diferentes cantidades (5 μ l, 10 μ l o 20 μ l) de un cultivo inoculado del día anterior de las cepas patógenas para obtener un crecimiento en césped homogéneo. Una vez solidificado el agar del medio de cultivo, mediante un asa de siembra, se sembraron las cepas objetivo, después de haber sido aisladas el día anterior mediante siembra por agotamiento en medio TSB semisólido. Las placas se dejaron incubar en una estufa a 30°C durante dos noches. Una vez realizado el ensayo se seleccionan las cepas productoras que presentan un efecto inhibitorio frente al mayor número de microorganismos patógenos de peces.

3.3. Caracterización preliminar de las actividades antimicrobianas.

Para realizar este ensayo se realizó la inoculación a partir de una colonia de cada una de las cepas que presentaban actividad inhibitoria en el ensayo anterior (procedentes de placas con medio TSB) en 10 ml de medio TSB líquido. Se dejaron crecer durante una noche y al día siguiente se centrifugó el sobrenadante a 5.000 rpm durante 10 min. El pellet de células bacterianas se congeló a -20 °C para su posterior secuenciación, y el sobrenadante, se utilizó para la caracterización de la actividad inhibitoria de las sustancias bactericidas, mediante tratamientos enzimáticos y térmicos, así como para evaluar el efecto del pH sobre las mismas.

Para la obtención de los sobrenadantes que se emplearon en estos ensayos no se realizó su filtración, puesto que se observó que éstos perdían la actividad inhibitoria al pasar por un filtro de policarbonato de 0,2 μ m. Por ello, los sobrenadantes se obtuvieron mediante centrifugación a 5.000 rpm durante 10 min y se recogieron tan pronto como

los tubos fueron sacados de la centrifuga para evitar la presencia de células del cultivo en los mismos.

El estudio de la presencia o ausencia de actividad inhibitoria de los sobrenadantes se realizó mediante la técnica de difusión en agar anteriormente descrita. En este caso solamente se utilizaron las cepas indicadoras SH16 y SH2, puesto que eran las que presentaban una mayor sensibilidad a todas las cepas objetivo aisladas.

Tratamiento térmico.

Para estudiar la termorresistencia de las actividades inhibitorias de las cepas seleccionadas, se incubaron los sobrenadantes en un baño con agua a temperaturas de 40 °C, 60 °C y 100 °C durante 30 min.

Tratamiento enzimático

Para valorar la naturaleza proteica de los sobrenadantes, se realizó una exposición de los mismos a la acción de diferentes enzimas, entre los que se utilizaron pronasa E de *Streptomyces* (Sigma-Aldrich), tripsina (Sigma-Aldrich) y α -quimiotripsina del páncreas de oveja (Sigma-Aldrich) y proteinasa K de *Tritirachium* (Sigma-Aldrich). Los enzimas se utilizaron a una concentración final de 1 mg/ml en Tris-HCl 20mM, pH 8.0. La incubación se llevó a cabo en un baño a 37°C durante 1h.

Efecto del pH

La sensibilidad de los sobrenadantes a diferentes rangos de pH se estimó ajustándolos a valores de pH de 3, 4.5, 6.5, 7, 8 y 8.5, utilizando NaOH (1 N) y HCl (37%) Los sobrenadantes se incubaron a 30 min en un baño a 30 °C.

3.4. Caracterización genética de las cepas productoras.

Extracción y cuantificación de ADN total

El ADN total de los microorganismos se extrajo mediante el kit comercial NZY Tissue gDNA isolation kit (NZytech), siguiendo las recomendaciones de la casa suministradora.

Para la cuantificación del ADN total se utilizó un Nanodrop 2000 (ThermoScientific). Este equipo nos permite analizar muestras de hasta 1µL y sin la necesidad del uso de cubetas o capilares. Además no necesitamos realizar una curva de calibrado, ya que nos

muestra directamente la concentración del ADN en $\mu\text{g}/\mu\text{L}$. Este equipo también nos indica la calidad de ADN aislado, mostrándonos el espectro de la muestra analizada.

Amplificación y secuenciación del 16S ARNr de las cepas con actividad bactericida.

La identificación genética de los microorganismos de interés se realizará mediante el análisis de la secuencia parcial del gen 16S ARNr. Para ello, se amplificó un fragmento del gen 16S ARNr mediante los oligonucleótidos universales 27F (5' AGAGTTTGATCMTGGCTCAG 3') y 1492R (5' TACGGYTACCTTGTTACGACTT 3') [10].

La reacción de amplificación se realizó utilizando el kit comercial Illustra™ puReTaq Ready-To-Go PCR Beads (GE Healthcare) siguiendo las instrucciones del fabricante. Cada tubo contiene beads con estabilizadores, 2,5 unidades de PuReTaq DNA Polimerasa, dNTPs (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) y buffer de reacción. El volumen de reacción fue de 25 μl , con una concentración final de oligonucleótidos de 1 μM y una concentración máxima de ADN total bacteriano de 50 ng. Se empleó una campana de flujo laminar para evitar la contaminación de las muestras y, para evitar la formación de productos de reacción secundarios, se mantuvieron los tubos del kit en hielo. Las condiciones de la reacción de amplificación fueron las siguientes (tabla 3):

1 ciclo	Desnaturalización	95 °C	5 min
30 ciclos	Desnaturalización	94 °C	1 min
	Anillamiento	55 °C	3 min
	Extensión	72 °C	2 min
1 ciclo	Extensión	72 °C	10 min
1 ciclo	Final	4 °C	-

Tabla 3. Condiciones de reacción PCR.

Los amplicones de la PCR se estudiaron en geles de agarosa al 2,2%. Los geles se corrieron en TBE a un voltaje de 75 V/cm y se visualizaron, utilizando como agente fluorescente GelRed (Biotium), en un equipo de documentación de geles (Protein Simple Cell Biosciences RED Gel Documentation Lab Imaging System SA-1000). Como marcador molecular se empleó Mass Ruler™ DNA Ladder, Low Range (Fermentas).

Para sus secuenciación los amplicones se purificaron utilizando el kit MinElute[®] PCR Purification Kit (QUIAGEN), siguiendo las instrucciones del fabricante. De esta forma, se evita que los dNTPs y los oligonucleótidos presentes en la reacción de amplificación interfieran en las reacciones de secuenciación. Las secuencias nucleotídicas se obtuvieron mediante un secuenciador ABI PRISM[®] 3130xl Genetic Analyzer en el Servicio de Secuenciación del edificio Severo Ochoa de la Universidad de Oviedo.

PCR Fingerprinting (ISR-PCR)

Para establecer las relaciones filogenéticas entre especies relacionadas, se realiza una amplificación de las regiones interespaciadoras 16S-23S DNAr. La amplificación se hizo utilizando los oligonucleótidos universales ISR1494 (5'-GTCGTAACAAGG TAGCCGTA-3') e ISR-35 (5'-CAAGGCATCCACCGT-3') [10].

La reacción de PCR se llevó a cabo de igual manera que en el apartado anterior. La única diferencia es que en este caso se utilizó una concentración final de cada oligonucleótido de 2µM. Las condiciones de la ISR-PCR fueron las siguientes:

1 ciclo	Desnaturalización	95 °C	4 min
30 ciclos	Anillamiento	$\left\{ \begin{array}{l} 94\text{ °C} \\ 55\text{ °C} \\ 72\text{ °C} \end{array} \right.$	$\left\{ \begin{array}{l} 1\text{ min} \\ 2\text{ min} \\ 2\text{ min} \end{array} \right.$
1 ciclo	Elongación	72 °C	7 min
1 ciclo	Final	4 °C	-

Tabla 4. Condiciones de reacción ISR-PCR.

La visualización de los fragmentos amplificados se hizo con geles de agarosa al 1,5% que se corrieron en TBE a un voltaje de 50 V/cm. El resto de las condiciones fueron idénticas a la electroforesis del ensayo anterior. Para analizar con mayor fiabilidad los productos amplificados de la ISR-PCR, la visualización de los productos de la electroforesis también se hizo mediante la utilización del DNA chip BIOANALYZER 2100. Se trata de un sistema LOC (lab-on-chip) que permite la separación de los amplicones con una mayor resolución y sensibilidad [11].

4. RESULTADOS.

4.1. Aislamientos de cepas probióticas.

Uno de los objetivos de los aislamientos fue muestrear peces que procediesen del medio acuático y que tuviesen alimentaciones distintas, por ello, se emplearon peces salvajes proporcionados por los participantes de la “VII Quedada de pesca submarina solidaria de Santander 2014” con pesos diferentes (tabla 5). De los intestinos de estos peces se aislaron un total de 198 colonias diferentes en base a su morfología, color y brillo.

Especie	Sexo	Peso (g)	Tamaño(cm)
Pinto (<i>Labrus bergylta</i>)	Hembra	495	31
Cabracho (<i>Scorpaena scrofa</i>)	Macho	715	34
Faneca (<i>Trisopterus luscus</i>)	Hembra	455	32
Congrio (<i>Conger conger</i>)	Hembra	9285	156
Perla (<i>Lithognathus mormyrus</i>)	Macho	345	30
Faneca real (<i>Trisopterus luscus</i>)	Hembra	685	34
Abadejo (<i>Pollachius pollachius</i>)	Macho	535	37
Lubina (<i>Dicentrarchus labrax</i>)	Hembra	510	36
Mojarra (<i>Diplodus vulgaris</i>)	Hembra	560	32
Sargo (<i>Diplodus sargus cadenati</i>)	Hembra	370	29
San Martín (<i>Zeus faber</i>)	Hembra	575	35
Pintarroja (<i>Scyliorhinus canicula</i>)	Macho	3720	95
Medregal (<i>Seriola dumerili</i>)	Macho	2000	152
Dorada (<i>Sparus aurata</i>)	Macho	585	34
Sargo picudo (<i>Diplodus puntazo</i>)	Hembra	725	35
Dentón (<i>Dentex dentex</i>)	Hembra	700	36
Salmonete (<i>Mullus surmuletus</i>)	-	480	33
Ballesta (<i>Balistes capriscus</i>)	Hembra	410	28
Mulle (<i>Mugil cephalus</i>)	Macho	950	48

Tabla 5. Muestras de peces capturados en la “VII Quedada de pesca submarina solidaria de Santander 2014”

Una vez realizados los enfrentamientos entre las cepas productoras y las indicadoras, los resultados del ensayo se expresaron como la presencia (+) o ausencia (-) de inhibición, siendo (++++) el mayor grado de inhibición y (+) el menor grado de inhibición.

Como se aprecia en la tabla 7, la cepa bacteriana 8.14 presenta inhibición frente a todas las cepas de *V. harvey* y *Shewanella sp.*, así como frente a *P. damsela*; *S. putrefaciens*; *S. báltica*, *V. splendidus* y *V. anguillarum*. De la misma manera, la cepa 10.1 muestra un patrón de inhibición a los mismos patógenos, a excepción de *S. báltica* y a *Shewanella sp.* SH2. Por otra parte la cepa 10.7 solo muestra inhibición frente a *S. báltica*; *Shewanella sp.* SH2 y *Shewanella sp.* SH4. La cepa 8.14 presenta halos de inhibición de mayor diámetro frente a *Shewanella sp.* SH6; *Shewanella sp.* SH16 y *V. Harvey* 35/03. Otra de las cepas productoras que presenta un halo de inhibición de gran diámetro es 10.8 al ser enfrentada a *Shewanella sp.* SH16. Ninguna de las restantes cepas seleccionadas mostraron capacidad inhibitoria frente a alguna de las cepas indicadoras.

4.3. Caracterización preliminar de las actividades antimicrobianas.

Los microorganismos inhibidores producen diversas sustancias con efectos antimicrobianos como ácidos orgánicos, ácidos grasos, peróxido de hidrógeno, bacteriocinas y sustancias relacionadas [3]. Por esta razón, para determinar la naturaleza bioquímica de los compuestos antimicrobianos se analizaron los resultados tras ser sometidas a la actividad de proteasas y, a distintos valores de pH y temperatura [13].

Tratamiento térmico

En cuanto a la sensibilidad a la temperatura al enfrentar las muestras a *Shewanella sp.* SH2 y *Shewanella sp.* SH16, se observa que todas las actividades antimicrobianas son termolábiles a las temperaturas de ensayo, exceptuando el sobrenadante de las cepas 8.14 y 10.1, que mostraron resistencia al tratamiento térmico de 40 °C, resultando por tanto termoestables hasta dicha temperatura (tabla 8).

Tratamiento enzimático

Las actividades inhibitorias de las cepas 8.14 y 10.1 frente a *Shewanella sp.* SH2 y *Shewanella sp.* SH16, no mostraron inhibición por ninguna de las proteasas del ensayo, observándose el mismo resultado en la inhibición de la muestra 10.8 frente a *Shewanella sp.* SH16. Un comportamiento similar se observa en la actividad inhibitoria de la cepa 10.8 frente a *Shewanella sp.* SH2 y *Shewanella sp.* SH16, con la única excepción de la

inactivación mediante el tratamiento con Pronasa E usando como cepa indicadora *Shewanella sp.* SH2. Por el contrario, se considera que la cepa 10.7 frente a *Shewanella sp.* SH2 presenta inactividad frente a proteasas. El resultado de la inhibición de este ensayo no se espera en el enfrentamiento de la muestra 10.7 con *Shewanella sp.* SH16, ya que los resultados fueron negativos en la prueba de sensibilidad a compuestos bactericidas.

Cuando se realiza el ensayo de inactivación enzimática, la pérdida de actividad inhibitoria del sobrenadante de la muestra 10.7, después de haber sido sometida a la totalidad de enzimas, evidencia su naturaleza proteica, y nos permite considerarla como bacteriocina. De manera contraria, las cepas restantes mostraron no ser sensibles a los enzimas del ensayo, por lo que no se puede afirmar que estos compuestos son de síntesis ribosomal (tabla 9).

Efecto del pH

Al someter a los sobrenadantes de las cepas productoras a distintos valores de pH, se observa que todas las actividades inhibitorias se inactivan a pH 3. Por el contrario, ningún sobrenadante se inactivo a valores restantes de pH (4.5, 6.5, 7, 8 y 8.5), exceptuando la actividad inhibitoria de la cepa 10.7 frente a *Shewanella sp.* SH16, que solo presenta actividad a pH 4,5. Como muestran los resultados, (tabla 10) los sobrenadantes de los microorganismos inhibidores no pierden su actividad a valores de pH básico, de lo que se deduce que el metabolismo de las cepas productoras no genera ácidos orgánicos, sustancias de cadena corta, que causan cambios de pH intracelular. Estas sustancias resultan altamente tóxicas para los microorganismos patógenos al atravesar la membrana (en forma no ionizada) y acumularse en el interior (forma ionizada) limitando el crecimiento de los mismos [14].

Tabla 7. Actividad inhibitoria de los sobrenadante

		Cepas Patógenas													
		Periodo de incubación													
		Una noche							Dos noches						
		5μl			10μl				20μl				5μl		
Cepas bactericidas	Pdp11	Pdp13	SH2	SH4	SH6	SH19	35/03	SH16	16/00	13/01	Vs	Va			
5.5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
8.5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
8.7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
8.14	++	++	+	++	+++	++	+++	+++	++	++	++	++	++	++	
10.1	++	-	+	++	+	+	++	++	++	++	++	++	++	++	
10.7	-	+	++	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
10.8	++	++	++	++	++	-	+	+++	++	++	++	++	+	+	
11.1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
12b3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
12b6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
14.2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
16.3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
16.6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
19.3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
19.6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	



	SH2				SH16			
	8.14	10.1	10.7	10.8	8.14	10.1	10.7	10.8
T ^a								
40°C	+	+	-	-	+	+	-	-
60°C	-	-	-	-	-	-	-	-
100°C	-	-	-	-	-	-	-	-
Control	+	+	ND	ND	+	+	ND	+

Tabla 8. Tratamiento térmico.

Tratamiento enzimático	SH2				SH16			
	8.14	10.1	10.7	10.8	8.14	10.1	10.7	10.8
Tripsina	+	+	-	+	+	+	-	+
Pronasa E	+	+	-	-	+	+	-	+
α-Quimiotripsina	+	+	-	+	+	+	-	+
Proteinasa K	+	+	-	+	+	+	-	+
Control	+	+	ND	+	+	+	-	+

Tabla 9 Tratamiento enzimático.

	SH2				SH16			
pH	8.14	10.1	10.7	10.8	8.14	10.1	10.7	10.8
3	-	-	-	-	-	-	-	-
4,5	+	+	+	+	+	+	+	+
6,5	+	+	+	+	+	+	-	+
7	+	+	+	+	+	+	-	+
8	+	+	+	+	+	+	-	+
8,5	+	+	+	+	+	+	-	+
Control	+	+	+	+	+	+	ND	+

Tabla 10. Efecto del pH.

4.4. Caracterización genética de las cepas productoras.

Amplificación del 16S ARNr de las cepas con actividad bactericida.

Entre los métodos genotípicos, la caracterización del 16S ARNr es uno de los métodos más extendidos para identificar especies, géneros y familias bacterianas. Debido a que los genes que codifican para 16S ARNr son esenciales para la supervivencia de todos los microorganismos, el grado de similitud que presentan entre especies o géneros es muy elevado, de forma que se puede hacer una clasificación de los mismos siempre y cuando no presenten una relación filogenética muy estrecha.

Para conseguir la amplificación selectiva de una región del 16S ARNr, presente en las cepas productoras, se utiliza la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). En todas las cepas en las que se produjo amplificación, los amplicones obtenidos se muestran un tamaño superior a los 1000 Kb (figura 1), tamaño esperado para la amplificación con los primers 27F y 1492R [10].

A pesar de que en la calle 2 no se aprecia ninguna banda, se envió el ADN de esta amplificación a secuenciar.

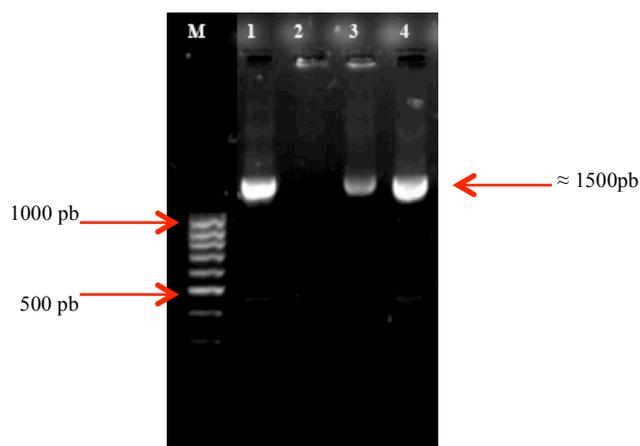


Figura 1. Patrones de bandas amplificadas (PCR). Gel de agarosa de los amplicones obtenidos en la PCR del gen 16S rRNA. Calle M: Marcador molecular; calles 1-4: cepas a estudio.

Amplificación del ISR ARNr de las cepas con actividad bactericida.

Este método se centra en la amplificación de familias multigénicas, como el operón ARNr, que normalmente presenta más de una copia en la mayoría de bacterias e incluye los genes 16S, 23S y 5S en orden 5'-3'. Estos genes están separados por unas regiones interespaciadoras ISR (del inglés Intergenic Spacer Regions), cuya longitud y secuencia de nucleótidos es muy variable a nivel de especies y géneros, ya que al sufrir una menor presión selectiva durante la evolución (codifican para ARNt con múltiples funciones), están menos conservadas que las regiones que codifican para los 16S ARNr 16S y 23S ARNr [10].

En el análisis de los resultados (figura 2) se hizo mediante la visualización de las bandas en gel de agarosa. Sin embargo, este método nos ofrece unos resultados poco fiables en cuanto al tamaño exacto del patrón de bandas y a la correcta visualización de los fragmentos amplificados, ya que en la muestra 3 no se observa ningún amplicón. Por esta razón, se utilizó el equipo DNA chip BIOANALYZER 2100.

En la figura 3 se muestran los patrones de bandas de las ISRs de las cepas productoras. La muestra 1 y la muestra 4 muestran dos patrones de bandas de 1000 bp y 200 bp respectivamente, por lo que podrían tratarse de la misma especie. En cuanto a la muestra 2, también se observa una banda de tamaño similar a la de las muestras

1 y 4, por lo que podría tratarse de una cepa que presenta menos homología que la existente entre ellas. Por otra parte en la muestra 3 se observan unos perfiles de bandas

de tamaños distintos a los de las muestras 1, 2 y 4, lo que indica que se trata de una especie diferente.

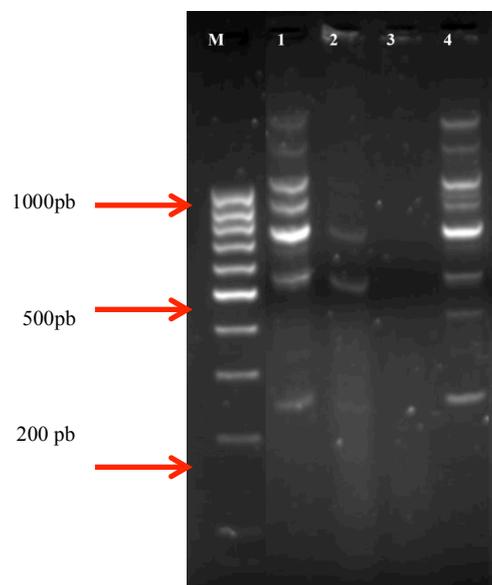


Figura 2. Patrones de bandas ISR-PCR. Gel de agarosa de los amplicones obtenidos en la ISR-PCR. Calle M: Marcador molecular; calles 1-4: cepas a estudio.

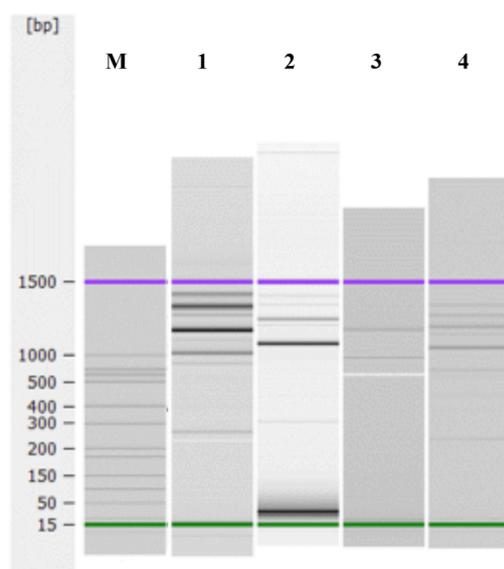


Figura 3. Patrones de bandas ISR-PCR. Resultado obtenido con el Bioanalyzer 2100 al separar los amplicones obtenidos en la ISR-PCR. Calle M: Marcador molecular; calles 1-4: cepas a estudio

Secuenciación génica.

Para proceder al análisis de la secuencia de las cepas productoras de interés, mediante el secuenciador ABI PRISM® 3130xl Genetic Analyzer, se utilizan los mismos oligonucleótidos universales 27F (5' AGAGTTTGATCMTGGCTCAG 3') y 1492R (5' TACGGYTACCTTGTTACGACTT 3') que fueron empleados para la reacción en cadena de la polimerasa [10]. Posteriormente se comparó del grado de homología de las secuencias con las depositadas en la base de datos del NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), con el objetivo de hacer una clasificación a nivel de especie.

La especie que presenta un grado de identidad mayor del 97% con las cepas 8.14, 10.1 y 10.8 es *Alcaligenes faecalis*.

Por el contrario, en la cepa 10.7 las especies con mayor grado de homología (identidad > 97%) son *Myroides gitamensis*, *Myroides odoratimimus*, *Myroides profundus*, *Myroides marinus*, *Myroides pelagicus* y *Myroides phaeus*. En este caso, para saber la especie exacta recurrimos a la descripción de su color cuando se crece en medio TSA y

crecimiento en alta concentración de NaCl (tabla 11). En medio TSA, la pigmentación de las colonias fue amarillo-naranja, por lo que la cepa podría clasificarse como *M. marinus* o *M. pelagicus*. De acuerdo con este criterio [15], cuando se cultivan estas dos cepas a diferentes concentraciones salinas, únicamente se observa el crecimiento a una concentración NaCl 5%, por lo que podemos decir que nuestra cepa es *M. marinus*.

También se construyó el árbol filogenético de las cepas. En primer lugar hay que realizar el alineamiento de las secuencias de las mismas, para lo que se utilizó el software Geneious R8 (Biomatters) con los siguientes parámetros: “Geneious alignment” del tipo “Global alignment with free ends and gaps” con un 65% de similitud en “Cost matrix”. En la figura 4 se representa el alineamiento obtenido de las 3 secuencias correspondientes a las cepas de la especie *A. faecalis*.

Para la realización del árbol filogenético se empleó también el software Geneious R8 y los algoritmos simples empleados en su construcción fueron Neighbor-Joining utilizando el modelo de Jukes Cantor [16].

Tabla 11. Caracterización morfológica y bioquímica de *Myroides*. (Adaptada de Prasad Talluri et col., 2014).

	<i>M. gitamensis</i>	<i>M. marinus</i>	<i>M. odoratiminus</i>	<i>M. profoundi</i>	<i>M. pelagicus</i>	<i>M. odoratus</i>
Hábitat	Suelo matadero	Agua de mar	Animales	Sedimento del fondo marino	Agua de mar	Heces
Diámetro celular	1,4 – 1,8	0,6 – 1	2,5 – 4	1,6 – 2,4	0,5 – 1	12 – 12
Pigmentación	Amarillo	Amarillo – naranja	Amarillo pálido	Amarillo pálido	Amarillo – naranja	Amarillo
Forma	Bacilos cortos	Bacilos	Bacilos	Bacilos con forma de huso	Bacilos cortos	Bacilos
Tª crecimiento	10-37/10-37	10-37	10-37	10-42	10-37	10-37
Rango pH	5-9	5-9	6-9	5-9	5-9	6-9
Rango NaCl (% p/v)	0,6 - 6	0 - 5	0 – 6	0 - 8	0 - 9	0 - 5
Contenido GC (mol%)	33,8	34,2	31,7	33	33,6	34,7

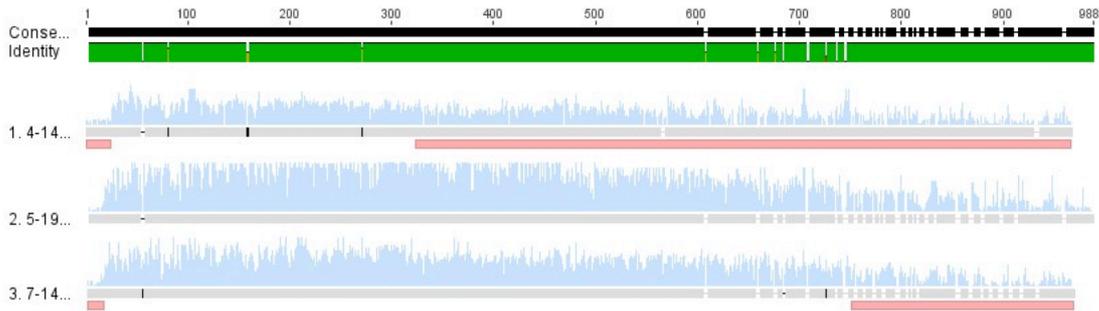


Figura 4. Alineamiento de secuencias génicas de las cepas de *A. faecalis* usando el software Geneious R8.

El árbol filogenético se construye a partir de esta matriz de distancias genéticas y en él se representan unas ramas cuya longitud se corresponde con las distancias evolutivas observadas entre las secuencias. De esta manera, se observa que, entre las cepas de *A. faecalis*, las que constituyen un grupo monofilético y están más estrechamente relacionadas con el antecesor común, que *A. faecalis* 8.14, son *A. faecalis* 10.1 y *A. faecalis* 10.8. De forma contraria, *M. marinus* es la cepa que muestra mayor grado de divergencia con respecto al antecesor común de todas las cepas.

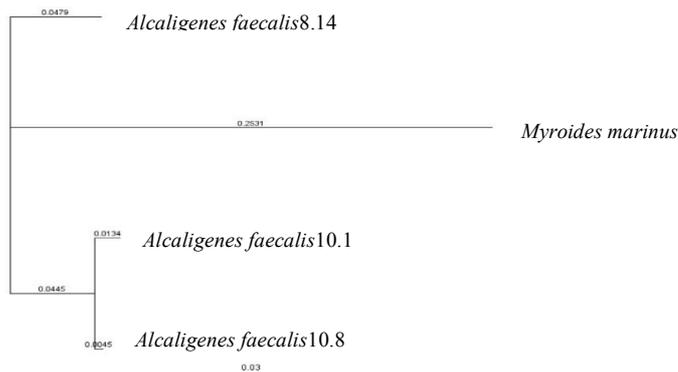


Figura 5. Árbol filogenético de las cepas con actividad inhibitoria.

4.5. Futuras líneas de estudio.

El presente estudio evidencia que *A. faecalis* y *M. marinus* inhiben a un amplio espectro de bacterias Gram negativas. Los resultados de este estudio, además sugieren que ambas cepas producen sustancias bactericonogénicas con actividad frente a proteasas, (a excepción de una actividad inhibitoria producida por *A. faecalis*), las cuales deberían ser purificadas e identificadas para determinar su actividad inhibitoria mínima en posteriores trabajos.

Estas nuevas líneas de estudio resultan interesantes por el gran interés comercial que suscita el empleo de estas cepas probióticas en la acuicultura, no solo por aumentar la rentabilidad de los cultivos reduciendo el uso de antibióticos, también por los beneficios resultantes de la interacción de las cepas probióticas con la mucosa intestinal de los peces, reforzando su sistema inmune y aumentando la resistencia a enfermedades, además de incrementar su valor nutricional por una correcta asimilación de nutrientes [2]. En este contexto también serían necesarias otras líneas de investigación posteriores con el objetivo de probar la eficacia y seguridad del empleo de estas sustancias con fines terapéuticos en animales destinados al consumo humano [17].

Por otra parte, para la correcta identificación de la naturaleza proteica de las sustancias que no mostraron inactividad frente a proteasas, serían necesarios otros ensayos que evidenciaran la sensibilidad del sobrenadante a enzimas proteolíticos (amilasa y lipasa), para confirmar que las fracciones glucídicas o lipídicas, de existir, serían necesarias para la actividad inhibitoria de la bacteriocina y demostrar así, la naturaleza proteica de las sustancias de estudio [18], [19] En este contexto también sería necesario el ensayo de la



catalasa, para demostrar que el efecto inhibitorio de estas sustancias no es debido a la producción de peróxido de hidrógeno [17], [20].

En la tabla 12 podemos ver resumidas las características de los compuestos antimicrobianos de cada una de las cepas.

Finalmente, puesto que en la base de datos de bacteriocinas Bagel (<http://bagel2.molgenrug.nl>) no aparece caracterizada ninguna bacteriocina producida por *A. faecalis* y solo se encuentran dos referencias de compuestos antimicrobianos que produce este microorganismo [17], [20], podríamos afirmar que se trata de una bacteriocina de reciente descubrimiento, cuyo aislamiento, caracterización genética y físico-química hace necesaria una línea de investigación en este sentido.

En lo referente a bacteriocinas producidas por cepas de *M. marinus*, no solo, no se encuentran descrita en la base de datos Bagel, sino que tampoco aparece citada en ningún artículo, por lo que estaríamos ante la identificación de una nueva bacteriocina.



Cepa indicadora	<i>Shewanella sp. SH2</i>				<i>Shewanella sp. SH16</i>			
	<i>A.faecalis</i>		<i>M.marinus</i>		<i>A.faecalis</i>		<i>M.marinus</i>	
	8.14	10.1	10.8	10.7	8.14	10.1	10.8	10.7
T^a								
40°C	+	+	-	-	+	+	-	-
60°C	-	-	-	-	-	-	-	-
100°C	-	-	-	-	-	-	-	-
Control	+	+	-	-	+	+	+	-
Enzimas								
Tripsina	+	+	+	-	+	+	+	-
Pronasa E	+	+	-	-	+	+	+	-
α-Quimiotripsina	+	+	+	-	+	+	+	-
Proteinasa K	+	+	+	-	+	+	+	-
Control	+	+	+	ND	+	+	+	ND
pH								
3	-	-	-	-	-	-	-	-
4,5	+	+	+	+	+	+	+	+
6,5	+	+	+	+	+	+	+	-
7	+	+	+	+	+	+	+	-
8	+	+	+	+	+	+	+	-
8,5	+	+	+	+	+	+	+	-
Control	+	+	+	+	+	+	+	ND

Tabla 12. Caracterización de las actividades antimicrobianas.

5. CONCLUSIONES.

1. Se han aislado 198 cepas de intestinos de 19 especies de peces salvajes de Mar Cantábrico.
2. De todas estas cepas, solamente 4 presentaban actividad inhibitoria frente a la mayoría las cepas patógenas de peces de acuicultura frente a las que se ensayaron.
3. La secuenciación del gen 16S rRNA nos permitió identificar tres de estas cepas de microorganismos como *Alcaligenes faecalis* y una como *Myroides sp.*
4. Los ensayos de crecimiento a altas concentraciones de NaCl permitieron caracterizar la cepa del género *Myroides* como *M. marinus*.
5. Se estudió la actividad inhibitoria de las 4 cepas en el sobrenadante de los cultivos, lo que permitió determinar que los microorganismos eran capaces de producir compuestos inhibidores que se secretaban al medio.
6. Los sobrenadantes no perdieron actividad inhibitoria a valores básicos de pH, por lo que se descarta que sean ácidos orgánicos.
7. Los sobrenadantes perdieron su actividad inhibitoria a temperaturas superiores a 40°C.
8. El tratamiento de los sobrenadantes con diferentes proteasas dio lugar a diferentes resultados, comprobándose que los compuestos secretados por las cepas de *Alcaligenes faecalis* son diferentes al secretado por la cepa de *Myroides marinus*.

BIBLIOGRAFÍA.

- [1] Organización de las Naciones unidas para la Alimentación y la Agricultura. (2014) El estado mundial de la pesca y la acuicultura.
- [2] T. Pérez Sánchez (2012) Selección y evaluación de cepas prebióticas para la prevención de la Lactococosis en la trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*). Tesis Doctoral. Universidad de Zaragoza.
- [3] B. Gómez Sala (2013) Aislamiento, identificación y actividad antimicrobiana de bacterias lácticas bacteriocinogénicas de origen marino: caracterización bioquímica y genética y producción heteróloga de las curvacinas G14 y G15 de *Lactobacillus curvatus* BCS35. Tesis Doctoral. Universidad Complutense de Madrid.
- [4] I. F. Nes (2012) Prokaryotic Antimicrobial Peptides. From Genes to Applications, pp. 255-327. D.Drider and S. Rebuffat (eds.). Springer Verlag New York..
- [5] R. Mosenthin, J. Zentek y T. Żebrowska (2006) Biology of Nutrition in Growing Animals pp 208, 314, 354-355, 419. Elsevier B.V.
- [6] T.K. Sahoo, P.K. Jena, A.K. Patel y S. Seshadri (2016) Bacteriocins and their applications for the treatment of bacterial diseases in aquaculture: a review. *Aquaculture Research*, 47(4): 1013-1027.
- [7] D. Merrifield y E. Ringø (2014) *Aquaculture Nutrition: Gut Health, Probiotics and Prebiotics*. WILEY Blackwell, U.K.
- [8] D.A. Kékessy y J.D. Piguet (1970) New Method for Detecting Bacteriocin Production. *Applied Microbiology*, 20(2): 282-283.
- [9] J. Howard y M Whitcombe.(1995) “Methods in Molecular Biology. Diagnostic Bacteriology Protocols” pp 5-13, Humana Press, New Jersey.
- [10] J. F. T. Spencer y A. L. Ragout de Spencer (1999) “Methods in Biotechnology. Environmental Microbiology, Methods and Protocols” pp. 3-9, 159-155, Humana Press, New Jersey.
- [11] N.J. Panaro, P.K. Yuen, T. Sakazume, P. Fortina, L.J. Kricka y P. Wilding. (2000) Evaluation of DNA fragment sizing and quantification by the Agilent 2100 Bioanalyzer. *Chemical Chemistry*, 46(11): 1851-1853.

- [12] M. T. Madigan, J. M. Martinko, D. A. Stahl y D. P Clark (2011) “Brock. Biology of Microorganisms” pp. 123-126, Pearson, San Francisco.
- [13] S. Delgado Palacio (2005) Microbiota intestinal humana. Análisis y evolución de poblaciones representativas e identificación de bacterias. Tesis Doctoral. Universidad de Oviedo.
- [14] L Sorroza Ochoa (2012) Propuesta de nuevas cepas probióticas para uso en acuicultura. Tesis Doctoral. Universidad de Las Palmas de Gran Canaria.
- [15] P.Talluri, Bhavana M., Siva Kumar K., Anil Kumar P. y Rajagopal S.V. (2014) *Myroides gitamensis* sp.nov., L-asparaginase Producing Bacteria Isolated from Slaughter House Soil Sample in Visakhapatnam, India. *Journal of Microbiology Biochemistry and Technology*, 6: 144-147.
- [16] Y. Díaz-Tejeda, A. Beltrán-Castillo, O. Coto-Arbelo y G. García-García (2013). Métodos empleados para determinar relaciones filogenéticas. Aplicaciones en ácaros de importancia agrícola. *CitriFrut* 30(1): 12-18.
- [17] I. Zahir, A. Houari, W. Bahafid, M. Iraqui y S. Ibnsouda (2013) A novel *Alcaligenes faecalis* antibacterial-producing strain isolated from a Moroccan tannery waste. *African Journal of Microbiology Research*, 7(47): 5314-5323.
- [18] S. P. Banerjee, K. C. Dora y S.Chowdhury (2013) Detection, partial purification and characterization of bacteriocin produced by *Lactobacillus brevis* FPTLB isolated from freshwater fish. *Journal of Food Science Technology*, 50(1): 17-25.
- [19] Shanouni F., Boutiba-Maatallah., Bouhadi., Boutiba Z. (2014) Characterization of bacteriocin produced by *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* strains isolated from marine fish caught in the Algerian west coast. *Turkish Journal of Agricultural and Natural Sciences*, special issue 2.1838-1843.
- [20] Misbah Aslam and Nazia Jamil (2015) Plasmid encoded bacteriocin transformation studies in *Alcaligenes* and *Brevundimonas* sp. In: *The battle against microbial pathogens: Basic Science. Technological Advances and Educational Programs* (A. Méndez-Vilas, ed.). pp: 336-345.
- [21] M. A. Riley y O. Gillor (2007) “Research and Applications in Bacteriocins” pp. 181-203, Horizon Bioscience U.K.