

# Actividad antibacteriana de extractos de huevos del erizo de mar *Arbacia dufresnii*

Avaro M<sup>1</sup>, Fernandez M<sup>2</sup>, Sequeiros C<sup>1,2</sup>, Vera-Piombo M<sup>1,2</sup>, Rubilar T<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup> Laboratorio de Química de Organismos Marinos (LabQuiOM), Instituto Patagónico del Mar (IPAM), Universidad Nacional de la Patagonia San Juan Bosco. Bv. Alte. Brown 3051, Puerto Madryn, Argentina

<sup>2</sup> Centro para el Estudio de Sistemas Marinos, Centro Nacional Patagónico, Centro Científico Tecnológico del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CESIMAR, CCT CENPAT, CONICET).

E-mail: mavaro@unpata.edu.ar

## INTRODUCCIÓN

El crecimiento acelerado de la acuicultura ha resultado en una serie de acciones perjudiciales para el medio ambiente y la salud humana. En especial, el uso generalizado y sin restricciones de antibióticos profilácticos en esta industria, especialmente en los países en desarrollo, para prevenir infecciones bacterianas resultantes de las deficiencias sanitarias en la cría de peces (Cabello, 2003). Los sistemas de cultivo de peces generalmente generan condiciones estresantes lo que produce una disminución en la efectividad de su sistema inmune (Cabello, 2003; Naylor y Burke, 2005). La resistencia a los antibióticos (RAM) encontrada en los cultivos de peces socava la eficacia del uso profiláctico de antibióticos en la acuicultura (L'Abée-Lund y Sørum, 2001; Sørum, 2006) y aumenta las posibilidades de que no solo se transmitan estas bacterias resistentes a los antibióticos, sino también sus determinantes a las bacterias de animales terrestres e inclusive de seres humanos, generando un problema de salud pública. En la reunión del G20 celebrada en Alemania en 2017, se planteó que la RAM es uno de los temas más difíciles de abordar y donde se requieren acciones concretas para avanzar en la mejora de la sostenibilidad en los sistemas de producción animal. La RAM representa una amenaza creciente para los humanos, los animales y el medio ambiente (OMS, 2017).

Otro problema creado por el uso excesivo de antibióticos en la acuicultura industrial es la presencia de antibióticos residuales en productos de pescado y marisco comercializados (Angulo et al., 2004; Sørum, 2006). Este problema ha llevado a un consumo no detectado de antibióticos por parte de los consumidores de pescado con la posible alteración adicional de su flora intestinal que aumenta su susceptibilidad a las infecciones bacterianas y también selecciona bacterias resistentes a los antibióticos (Greenlees, 2003; Cabello, 2004; Salyers et al., 2004). Además, el consumo no detectado de antibióticos en los alimentos puede generar problemas de alergia y toxicidad, de difícil diagnóstico por la falta de información previa sobre la ingestión de antibióticos (Alderman y Hastings, 1998; Cabello, 2004).

En este contexto tanto en EEUU como en la Unión Europea se han comenzado a disminuir y controlar el uso de antibióticos en acuicultura. A su vez, la comunidad internacional ha orientado sus esfuerzos en fomentar investigación en la búsqueda de agentes antimicrobianos naturales. Enmarcados en este objetivo, estudiamos la actividad antimicrobiana de extractos de huevos del erizo de mar *Arbacia dufresnii* sobre el crecimiento de bacterias patógenas de usual frecuencia en acuicultura.

## RESULTADOS

El extracto A1 presentó importante actividad inhibitoria del crecimiento todos los patógenos testeados, tanto bacterias Gram positivas (*Carnobacterium piscicola*) como Gram negativas, mientras que la muestra B1 presentó actividad antimicrobiana contra 3 cepas Gram negativas (*Vibrio alginolyticus*, *Yersinia ruckeri* y *Aeromonas salmonicida*). En cambio, la muestra A2 solamente presentó actividad contra *Vibrio alginolyticus*. La muestra B2 no presentó actividad antimicrobiana contra ninguno de los patógenos testeados (Figura 1; Tabla 1).

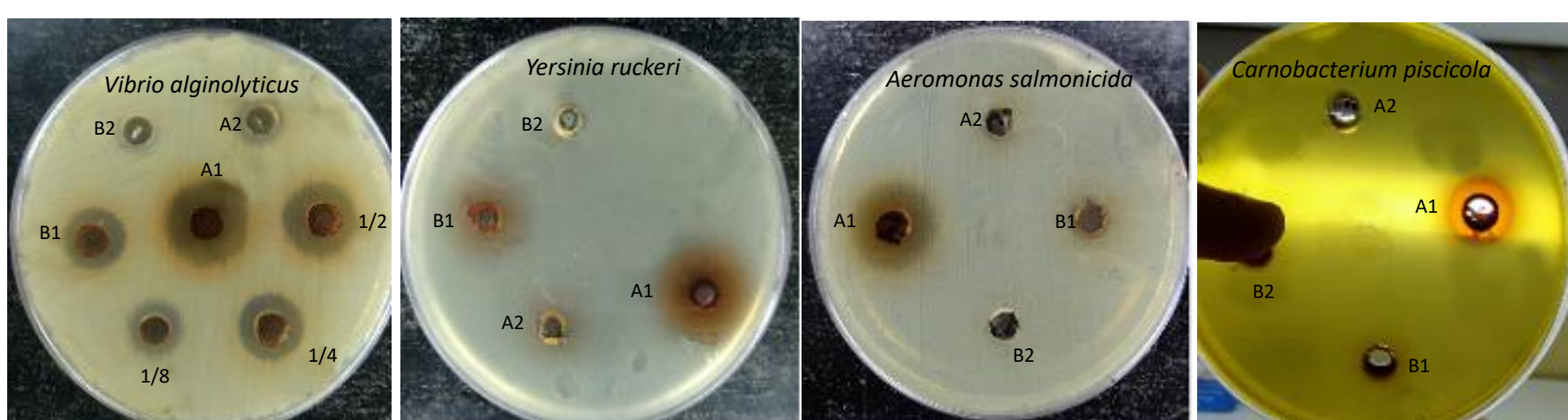


Figura 1 Actividad antimicrobiana mediante la técnica de difusión en agar de los extractos de erizo *A. dufresnii* contra 6 bacterias patógenas de peces (*Vibrio alginolyticus*, *Yersinia ruckeri*, *Aeromonas salmonicida*, y *Carnobacterium piscicola*)

Tabla 1 Diámetro de los halos de inhibición de 4 extractos provenientes de gametas de erizo de *A. dufresnii* sobre bacterias patógenas de peces.

Extractos <i>Arbacia dufresnii</i>	Cepas bacterianas / halo de inhibición en mm			
	<i>Vibrio alginolyticus</i>	<i>Yersinia ruckeri</i>	<i>Aeromonas salmonicida</i>	<i>Carnobacterium piscicola</i>
A1	18	13	15	14
A2	11	0	0	0
B1	15	8	10	0
B2	0	0	0	0

Tabla 2 Titulación de la actividad antimicrobiana de la muestra "A1" contra los diferentes patógenos que presentaron sensibilidad.

Patógenos	Actividad antimicrobiana de las diferentes diluciones de A1 (halo en mm)				Unidades arbitrarias (UA/ml)
	C	1/2	1/4	1/8	
<i>V. alginolyticus</i>	18	16,5	14	12	160
<i>Y. ruckeri</i>	-	12	9	0	80
<i>A. salmonicida</i>	18	15,5	12	0	80
<i>C. piscicola</i>	-	10,5	9,5	0	80

### *Vibrio alginolyticus*

Es un patógeno ubicuo en los ambientes y organismos marinos y está asociado a enfermedades oportunistas debido a su capacidad de adhesión a mucus (Thompson y Austin, 2006), factor crucial en su mecanismo de virulencia (Luo et al., 2016; Fernández Espinel et al., 2017). Puede causar una importante disminución en la tasa de crecimiento y de supervivencia de *Artemia* durante el proceso de producción como alimento vivo, ocasionando importantes pérdidas económicas para el sector acuícola (Rico-Mora y Voltolina 1995; Verschuere et al., 1999).

### *Aeromonas salmonicida*

Es un bacilo Gram negativo que se puede encontrar en casi todo el mundo en ambientes marinos y de agua dulce (Hiney y Olivier, 1999). Si bien es conocido como un patógeno de salmónidos, tiene un amplio rango de hospedadores y puede afectar tanto a peces de aguas continentales como marinos (Wiklund y Dalsgaard, 1998). Es el principal agente etiológico de la forunculosis, enfermedad que caracteriza por la aparición de forúnculos, coloración oscura de la piel, exoftalmia, esplenomegalia, nefritis y enteritis (Hiney y Olivier, 1999).

### *Yersinia ruckeri*

Es un bacilo Gram negativo y es el agente causal de la enfermedad de la boca roja, una de las enfermedades más comunes en salmónidos, especialmente en trucha arcoíris juvenil, pero se lo ha reportado en peces marinos como bacalao, rodaballo y róbalo, entre otros. La enfermedad de la boca roja es altamente contagiosa y ha sido reportada en América, Australia, Nueva Zelanda, África, Europa y Asia (Zorriehzahra et al., 2017).

### *Carnobacterium piscicola*

Es un cocobacilo Gram positivo y es uno de los agentes causales de la estreptococosis, enfermedad con síntomas variados, incluyendo septicemia, abdomen distendido con líquido ascítico, abscesos musculares, ampollas de sangre justo debajo de la piel y hemorragia interna (Austin y Austin, 2012). Esta enfermedad es de agua dulce, se distribuye en Europa y América (Austin y Austin, 2012) y afecta a distintas especies incluyendo salmónidos, carpa, lubina rayada y bagre (Michel et al., 1986; Baya et al., 1991; Toranzo et al., 1993).

## DISCUSIÓN

La capacidad de acumular metabolitos secundarios como las 1,4-naftoquinonas polihidroxiladas, comúnmente llamadas espinocromas, que poseen los huevos de los erizos de mar *Arbacia dufresnii*, sumada a la posibilidad de incrementar estas concentraciones por medio de biotecnología acuícola, brinda la posibilidad de generar a escala extractos sustentables, libres de solventes tóxicos. Estos extractos presentaron actividad antimicrobiana frente a cuatro patógenos frecuentes en acuicultura de peces. Todos los extractos produjeron actividad antimicrobiana contra *Vibrio alginolyticus* y presentaron una zona máxima de inhibición de 18mm. Las otras especies de patógenos fueron eficientemente eliminadas con el primer extracto probado.

De esta forma los extractos de los huevos de *Arbacia dufresnii* son efectivos en la eliminación de patógenos importantes para la acuicultura. Para poder analizar el alcance de estos resultados es realizaremos estudios de desafío y en lotes de cultivos de peces.

## MATERIALES Y METODOS

Para seleccionar los extractos que presentan actividad antimicrobiana, se utilizó la técnica de doble capa descrita por Dopazo et al. (1988). Una vez que se cultivaron las colonias, cada réplica se cubrió con 10 ml de agar blando (agar al 0,8% p / v) previamente inoculado con la cepa indicadora para alcanzar una concentración final de aproximadamente  $1 \times 10^7$  UFC (unidades formadoras de colonias) / ml. Los patógenos de peces utilizados como las cepas indicadoras y los medios de cultivo fueron los siguientes: *Vibrio alginolyticus* 03/8525 *Aeromonas salmonicida* ATCC 33658 y *Yersinia ruckeri* ATCC 29473 en TS medio, y *Carnobacterium maltaromaticum* (piscicola) CECT 4020 en medio MRS. Luego, cada réplica se incubó en las condiciones óptimas de crecimiento para cada cepa indicadora, según lo descrito por Sequeiros, Vallejos, Marguet y Olivera (2010), y fue examinado después de 24 a 48 hs. La actividad antimicrobiana extracelular se evaluó mediante el ensayo de agar de difusión de pozos descrito por Parente, Brienza, Moles y Ricciardi (1995). Brevemente, el agar TS o MRS fundido (45 ° C) fue el primero sembrado (1% v / v) con una suspensión estandarizada del indicador cepa ( $1 \times 10^7$  UFC / ml). El medio inoculado se dispuso rápidamente en placas de Petri estériles. Después de la solidificación, los pocillos de uniforme de diámetro (6 mm) se perforaron en el agar. Se sembraron alícuotas (50 µl) de sobrenadantes de cultivos libres de células de los aislados seleccionados obtenidos por centrifugación del cultivo (10.000 g; 6 min), ajustado a pH 6,5 con NaOH 1 M en cada pocillo. Se permitió difundir en las placas durante 2 horas a 4 ° C, antes de incubar bajo las condiciones óptimas de crecimiento para cada cepa indicadora (Sequeiros et al., 2010). La actividad antimicrobiana se expresó como el diámetro del halo de inhibición que rodea cada pocillo de agar. Alternativamente, se hicieron diluciones seriales de los sobrenadantes en los pocillos, y la actividad antimicrobiana se expresó en unidades arbitrarias (AU). Para obtener el AU por mililitro, se multiplicó el recíproco de la dilución más alta que produjo una zona de inhibición definitiva por el factor de conversión.

### BIBLIOGRAFÍA

- Alderman DJ & Hastings TS 1998 Int J Food Sci Technol 33: 139–155.  
 Angulo FJ, Nargund Nnd & Chiller TC 2004. J Vet Med 51:374–379.  
 Austin B & Austin DA 2012 Heidelberg, Germany: Springer. 5th ed.  
 Baya AM, Toranzo AE, Lupiani B, Li T, Roberson BS & Hetrick FM 1991 Appl Environ Microbiol 57: 3114–3120.  
 Cabello FC 2003. Fundación Terram. Analisis de Políticas Publicas No. 17, pp. 1–16.  
 Cabello FC 2004 Rev Med Chil 132: 1001–1006.  
 Fernández Espinel C, Flores Dominick V & Medina Morillo M 2017 Revi Peruana Biol 24: 93–100.  
 Greenlees KJ 2003 Int J Toxicol 22: 131–134.  
 Hiney M & Olivier G 1999 Microbiol Drug Resist. 7: 263–272.  
 Luo G, Huang L, Su Y, Qin Y, Xu X, Zhao, L, & Yan Q 2016 Emerg Microbes & Infections 5: 85.  
 Michel C, Faivre B & Kerouault B 1986. Annu Rev Environ Resources 30: 185–218.  
 OMS 2017  
 https://www.who.int/tb/features\_archive/G20\_leaders\_commitment\_end\_TB/en/  
 Rico-Mora R & Voltolina D 1995 J Invert Path 66: 203–204  
 Salyers AA, Gupta A & Wang Y 2004 Trends Microbiol 12: 412–416.  
 Sørum H 2006 Am Soc Microb Press, pp. 213–238.  
 Toranzo AE, Novoa B, Baya AM, Hetrick FM, Barja JL & Figueras A 1993 J Fish Dis 16: 261–267.  
 Verschuere L, Rombaut G, Huys G, Dhont J, Sorgeloos P & Verstraete W. 1999 Appl Environ Microb 65: 2527–2533.  
 Wiklund T & Dalsgaard I 1998 Dis Aquatic Org 32: 49–69.  
 Zorriehzahra MJ, Adel M & Torabi Delshad S 2017. Iranian J Fish Sci 16: 1135–1156.