

## ACTIVIDAD ANTILISTERIA DE BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS AISLADAS DE PECES MARINOS

Vallejo M<sup>1</sup>, Olivera N<sup>2</sup>, Sequeiros C<sup>2</sup>, Marguet E<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Cátedra de Biología Celular y Molecular, Facultad de Ciencias Naturales (Sede Trelew)  
Universidad Nacional de la Patagonia San Juan Bosco

<sup>2</sup>Centro Nacional Patagónico. CONICET. Pto. Madryn-Chubut.

**Resumen:** Con el propósito de caracterizar el efecto inhibitorio contra *Listeria monocytogenes*, se estudiaron 53 cepas de bacterias ácido lácticas (BAL) aisladas de peces marinos. Sobre la base de la actividad antilisteria se seleccionaron 5 cepas que posteriormente se identificaron por secuenciamiento de ARNr 16S. Dos cepas fueron identificadas como *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, dos como *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* y la restante como *Lactobacillus sakei*. En todos los casos, después de la neutralización con NaOH y tratamiento térmico (100 °C, durante 5 min, 121 °C durante 5 min) el efecto antagonista de los caldos libres de células se mantuvo activo. La actividad enzimática de lisozima, lipasa y catalasa no inhibió el efecto antimicrobiano. Por el contrario, se observó la supresión completa de la actividad inhibitoria después del tratamiento con tripsina, confirmando por esta manera la naturaleza proteica del agente activo. Las características bioquímicas y fisicoquímicas de los agentes antilisteria producidos por las BAL seleccionadas sugieren que la actividad del antagonista es llevada a cabo por sustancias inhibitorias tipo bacteriocinas (SITB). La estabilidad a los tratamientos térmicos y la actividad antilisteria exhibidas por las SITB estudiadas, las hace útiles para el uso en tecnologías de procesamiento de pescados y en la aplicación para el control en seguridad alimentaria.

**Palabras clave:** peces marinos, *Listeria monocytogenes*, bacterias ácido lácticas

## ANTILISTERIAL ACTIVITY OF LACTIC ACID BACTERIA ISOLATED FROM MARINE FISH

**Abstract:** In order to characterize inhibitory effect against *Listeria monocytogenes*, 53 strains of lactic acid bacteria (LAB) isolated from marine fish were studied. On the basis of antilisterial activity, 5 strains were selected and further identified by 16S rRNA sequencing. Two strains were identified as *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, two as *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* and the remaining as *Lactobacillus sakei*. In all cases, after neutralization with NaOH and heat treatment (100 °C for 5 min, 121 °C for 5 min) the antagonist effect of the cell-free broth remained active. The enzymatic activity of lysozyme, lipase and catalase did not inhibit the antimicrobial effect. On the other hand, complete suppression of inhibitory activity was observed after treatment with trypsin, confirming by this way the proteinaceous nature of the active agent. The biochemical and physicochemical characteristics of antilisterial agents produced by the selected LAB suggest that the antagonist activity is carried out by bacteriocin-like inhibitory substance (BLIS). The heat treatment stability and antilisterial activity exhibited by the BLIS studied, makes them useful for applications in fish processing technologies and food safety control applications.

**Key words:** marine fish, *Listeria monocytogenes*, lactic acid bacteria

Fecha de recepción: 20/05/09

Fecha de aprobación: 10/12/09

**Dirección para correspondencia:** Emilio Marguet. Cátedra de Biología Celular y Molecular, Facultad de Ciencias Naturales (Sede Trelew), Universidad Nacional de la Patagonia San Juan Bosco. Roca 115. (9100) Trelew.

**E-mail:** emarguet@yahoo.com.ar

## INTRODUCCIÓN

*Listeria monocytogenes* está ampliamente distribuida en la naturaleza y es un frecuente contaminante de alimentos (1, 2). Tiene la capacidad de infectar y reproducirse en el citoplasma de diversos tipos de células lo que le permite atravesar las barreras intestinal, meníngea y placentaria (1). Su habilidad para tolerar amplios rangos de pH, temperatura y concentración de sales constituye una propiedad que facilita la colonización de una gran variedad de alimentos como carnes, leche, vegetales, pescados y sus respectivos derivados (3, 4).

Esta bacteria ha sido la causa del aumento de enfermedades transmitidas por alimentos, especialmente en niños, ancianos y pacientes inmunocomprometidos. La listeriosis puede considerarse de baja frecuencia, sin embargo su tasa de mortalidad es alta, siendo responsable de aproximadamente la tercera parte de las muertes atribuidas a patógenos de origen alimentario (5).

En el ámbito marino, especialmente en sus estuarios, tanto como en peces se ha detectado una alta ocurrencia de miembros del género *Listeria* (8, 9). Si bien se ha demostrado que la carga bacteriana de los peces es baja, debe tenerse en cuenta que las características fisiológicas particulares de este patógeno permiten que se adapte a condiciones poco favorables y en consecuencia su número se eleva en forma frecuente después de la captura y procesos posteriores de manipulación (6,7). Esta situación crea un problema adicional debido a que *Listeria monocytogenes* no sólo puede colonizar el equipamiento utilizado en las plantas de procesamiento de pescado (8, 9, 10) sino que exhibe una gran resistencia a los más severos tratamientos de lavado y desinfección (8). Se ha demostrado que las cepas que colonizan y persisten bajo estas condiciones son genéticamente similares (11).

La situación expuesta sugiere la necesidad de buscar métodos alternativos que puedan mejorar la eficiencia de los procesos de desinfección en plantas procesadoras de pescado (12, 13). Durante los últimos años se ha intensificado el estudio de bacterias ácido lácticas (BAL), poniendo especial interés en la búsqueda de cepas productoras de metabolitos con capacidad antibiótica (14, 15). Las BAL se utilizan como fermentos en la industria láctea y es posible aislarlos de diversos nichos ecológicos y en una gran variedad de alimentos, donde desarrollan un importante papel conteniendo o limitando la presencia de *Listeria monocytogenes* y otros patógenos. La capacidad inhibitoria de las BAL se basa en la generación de productos metabólicos que exhiben mecanismos inespecíficos (ácidos orgánicos, peróxido de hidrógeno, diacetilo) o específicos como es el caso de las bacteriocinas (14, 16). Estos peque-

ños péptidos de síntesis ribosomal actúan sobre la membrana de las células blanco alterando su permeabilidad (16). Se han identificado más de 50 bacteriocinas producidas por BAL dentro de las cuales, la nisina y la lactocina son producidas en forma industrial y hasta nuestros días, las únicas admitidas para ser utilizadas como aditivos en alimentos (16). Un grupo especial de bacteriocinas producidas por BAL son las tipo pediocinas que pertenecen a la Clase IIa y son reconocidas por ser efectivos agentes antilisteria (17, 18).

En el presente trabajo se describe la capacidad inhibitoria contra *Listeria monocytogenes* de 5 cepas de bacterias lácticas productoras de sustancias inhibitorias tipo bacteriocinas (SITB) aisladas de peces capturados en el litoral marítimo del noreste de la provincia de Chubut. Se describen además las principales características fisicoquímicas de las bacteriocinas.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Aislamiento de bacterias ácido lácticas

Se tomaron muestras del tracto digestivo, tegumento y branquias de peces capturados en el litoral marítimo del noreste de la provincia de Chubut. Las muestras se trasladaron a 4 °C hasta el laboratorio y se procesaron dentro de las 6 h. El enriquecimiento primario se realizó en caldo de Man Rogosa Sharp (MRS), MRS ajustado a pH 4,6 y 5,4; MRS sin acetato a pH 8, MRS con NaCl al 6,5% y caldo M17. Los enriquecimientos se incubaron a 25 y 30 °C durante 24 h (30 °C) y 48 h (25 °C). Luego del período de incubación los cultivos líquidos se repicaron a agar MRS suplementado con ácido nalidíxico (40 µg/mL) y cicloheximide (10 µg/mL) y se incubaron durante 24 h (30 °C) y 48 h (25 °C).

### Identificación fenotípica

Las colonias sospechosas se sometieron a las siguientes pruebas bioquímicas:

Coloración de Gram.

Prueba de la catalasa.

Fermentación de azúcares.

Producción de gas (CO<sub>2</sub>) a partir de glucosa.

### Ensayos antimicrobianos de los sobrenadantes

Las cepas de BAL se cultivaron en caldo MRS a 32 °C hasta alcanzar la fase logarítmica. Luego del período de incubación los medios se centrifugaron a 3.000 rpm durante 15 min. El sobrenadante libre de células se empleó en el ensayo antimicrobiano que se realizó por el método de difusión en placa colocando 50 µL de sobrenadante en pocillos practicados en placas de agar BHI sembrados previamente con 50 µL de un cultivo overnight de la cepa *L. monocytogenes* ATCC 7644 (19). Las placas se mantuvieron a 4-8 °C durante 2 h y luego se incubaron a 35 °C

durante 18-24 h. También se ensayó la actividad antagonista según lo descrito cultivando las 5 cepas seleccionadas a 10 °C.

### Influencia de la temperatura, pH y tratamientos enzimáticos sobre la actividad inhibitoria

Los sobrenadantes crudos se trataron con NaOH 0,5 N hasta alcanzar la neutralidad. Los sobrenadantes neutralizados se sometieron posteriormente a una temperatura de 100 °C durante 5 min y 121 °C durante 5 min. En ambos casos la actividad residual se determinó por el procedimiento previamente descrito (19). La sensibilidad a enzimas se llevó a cabo, determinando la actividad residual luego de tratar los sobrenadantes durante 1 h con tripsina, lipasa, lisozima y catalasa (5mg/mL) en las condiciones óptimas para cada enzima.

### Identificación genotípica

Luego de una incubación a 32 °C durante 12 h en caldo MRS, las cepas de BAL seleccionadas sobre la base de su actividad antagonista, se centrifugaron a 12.000 g durante 5 min y el ADN se extrajo utilizando un equipo comercial de purificación (Wizard Genomics, Promega).

Mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se amplificó el gen que codifica ARNr 16S con un termociclador Multigene Gradient (Labnet International Inc., Woodbridge, NJ), usando los cebadores universales para procariontes 5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3' y 5'-GGT TAC CTT GTT ACG ACT T-3', según lo descrito en DeLong (20). Ambas hebras de los productos de PCR se secuenciaron utilizando los servicios comerciales de Macrogen Inc. (Seúl, Corea). Las secuencias obtenidas se compararon con las depositadas en la base de datos del NCBI utilizando el programa BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) (21).

## RESULTADOS

De las muestras procesadas se lograron aislar y clasificar mediante identificación fenotípica 53 cepas de bacterias ácido lácticas, 5 de las cuales exhibieron actividad inhibitoria sobre *Listeria monocytogenes* ATCC 7644. La identificación genotípica permitió clasificar a 2 cepas como *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, 2 cepas como *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* y una cepa como *Lactobacillus sakei*.

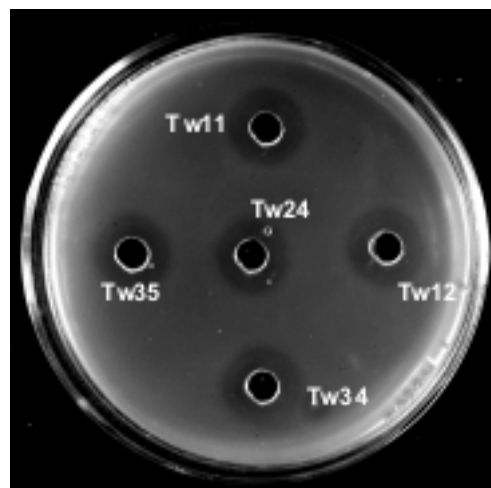
Luego de tratar los sobrenadantes obtenidos a 32 °C con NaOH hasta alcanzar la neutralidad, el efecto inhibitorio no exhibió modificaciones. Los mismos resultados se obtuvieron cuando los sobrenadantes neutralizados se sometieron al calentamiento de 100 °C durante 5 min o 121°C durante 5 min. Siguiendo el protocolo previamente descrito, también fue posible determinar el efecto antagonista ejercido por los sobrenadantes obtenidos a 10 °C.

El tratamiento enzimático llevado a cabo con lipasa, catalasa y lisozima no alteró la actividad antagonista ejercida por los sobrenadantes de las 5 cepas seleccionadas, en cambio el tratamiento con tripsina abolió por completo la capacidad de inhibir el crecimiento de *L. monocytogenes*.

En la Figura 1 se pueden observar los halos de inhibición de crecimiento de *L. monocytogenes* ATCC 7644 debido a la actividad antimicrobiana de los sobrenadantes obtenidos a 32 °C, neutralizados y calentados a 100 °C de las 5 cepas de BAL seleccionadas.

Fig. 1. Actividad inhibitoria de bacterias ácido lácticas aisladas de peces marinos sobre *Listeria monocytogenes* ATCC 7644. *Lc. lactis* subsp. *cremoris* (Tw11, Tw34), *Lc. lactis* subsp. *lactis* (Tw12, Tw35) y *Lb. sakei* (Tw24)

Fig. 1. Inhibitory activity of lactic acid bacteria isolated from marine fish on *Listeria monocytogenes* ATCC 7644. *Lc. lactis* subsp. *cremoris* (Tw11, Tw34), *Lc. lactis* subsp. *lactis* (Tw12, Tw35) and *Lb. sakei* (Tw24).



## DISCUSIÓN

En el estudio realizado, la alta frecuencia de aislamientos de cepas de BAL en peces sugiere que, no obstante los complejos requerimientos nutricionales exigidos por estos microorganismos, exhiben una alta adaptabilidad a un variado número de ambientes incluyendo, como en este caso, al medio marino.

La presencia de cepas de *Lactococcus* es frecuente en leche y sus derivados y en otros medios como la superficie de vegetales, pero en el medio marino sólo habían sido descritas por métodos moleculares y consideradas dentro del grupo de células viables pero no cultivables (VBNC) (22). Sin embargo, recientemente se logró aislar una cepa de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* y una cepa de *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* del intestino de un pez globo (*Takifugu niphobles*) (23).

En consecuencia es interesante destacar en este trabajo que, 4 de las 5 cepas seleccionadas

das pertenecen al género *Lactococcus*. *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* Tw11, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* Tw12 y Tw35 se aislaron de tegumento de pejerrey panzón (*Odontesthes platensis*), mientras que *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* Tw34 se aisló del intestino de la misma especie. La restante cepa, *Lactobacillus sakei* Tw24, también se aisló de tegumento de pejerrey panzón.

La actividad antagónica contra *Listeria monocytogenes* de los sobrenadantes de las 5 cepas seleccionadas efectuados a 32 °C y 10 °C, no sufrió alteraciones cuando se neutralizaron con NaOH, fenómeno que demuestra que la inhibición de crecimiento no era producida por efecto de los ácidos orgánicos generados por el metabolismo de las BAL. Tampoco el efecto antimicrobiano se vio afectado cuando los sobrenadantes se sometieron, luego de la neutralización, a una temperatura de 100 °C ó 121 °C durante 5 minutos, demostrándose la estabilidad del principio activo en las condiciones impuestas.

La actividad enzimática de lipasa y lisozima no alteró la actividad antilisteria de los sobrenadantes lo que permite descartar la existencia de lípidos o azúcares involucrados con la actividad del principio activo.

Algunas cepas de BAL tienen la capacidad de producir peróxido de hidrógeno, molécula con gran capacidad antagonista que puede ejercer su acción sobre una gran variedad de microorganismos. Sin embargo, la capacidad inhibitoria de los sobrenadantes ensayados no se vio afectada luego del tratamiento enzimático con catalasa y en consecuencia es posible afirmar que no existe una relación entre el fenómeno y la presencia del metabolito.

Luego de 1 hora de incubación la actividad proteolítica de la tripsina inactivó por completo la capacidad inhibitoria de los sobrenadantes, demostrándose de esta manera que el principio activo era de naturaleza proteica.

Las características determinadas en las pruebas descritas permiten afirmar que las 5 cepas seleccionadas ejercen su actividad antagónica gracias a la síntesis de sustancias inhibitorias tipo bacteriocinas (SITB). En los 5 casos estudiados, la estabilidad térmica de estas moléculas indicaría que se trata de péptidos de bajo peso molecular con actividad específica contra *L. monocytogenes*, propiedades que permitirían incluirlas dentro del grupo de bacteriocinas clase I o II (16, 18).

Se ha demostrado que la principal fuente de contaminación de los productos de mar en las plantas procesadoras está vinculada más al instrumental utilizado en las distintas fases que a la carga bacteriana natural (5, 10, 11). Los procesos de lavado y desinfección resultan, bajo determinadas condiciones, ineficaces para elimi-

nar la contaminación y en consecuencia ejercen una presión selectiva sobre la flora contaminante que conduce a la supervivencia de especies de *Listeria monocytogenes* que resultan dominantes y persistentes (8, 11, 13).

Esta situación induce a la búsqueda de métodos alternativos para controlar el desarrollo de patógenos alimentarios. El control biológico y la biopreservación mediante el uso de BAL productoras de metabolitos antagónicos constituyen metodologías que han empezado a utilizarse con éxito en sistemas de producción de alimentos (14, 15, 17).

Las cepas estudiadas en este trabajo son productoras de SITB que podrían resultar efectivas para el control de *Listeria monocytogenes* en plantas de procesamiento de pescados. Su aislamiento del medio marino les otorga algunas características particulares como desarrollarse y producir el principio antagónico a bajas temperaturas.

También se debe tener en cuenta que, a excepción de *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* Tw51, las cepas fueron aisladas de tegumento lo que permite pensar que tienen afinidad por el carácter hidrofóbico del mucus de este medio. Esta propiedad implica la posibilidad de incluir estas cepas en técnicas de pulverización que utilizan suspensiones celulares de microorganismos antagónicos de patógenos alimentarios. Esta metodología ya ha sido usada con éxito y demostrada su efectividad en el control específico de *Listeria monocytogenes* (17, 24).

## BIBLIOGRAFÍA

1. Jianshun C, Xiaokai L, Lingli J, Peijie J, Wei W, Dongyou L, Weihuan F. Molecular characteristics and virulence potential of *Listeria monocytogenes* isolates from Chinese food systems. *Food Microbiol.* 2009; 26:103-111
2. Byelashov OA, Carlson BA, Geornaras I, Kendall PA, Scanga JA, Sofos JN. Fate of post-processing inoculated *Listeria monocytogenes* on vacuum-packaged pepperoni stored at 4, 12 or 25 °C. *Food Microbiol.* 2009; 26:77-81
3. Nyachuba DG, Donnelly CW, Howard AB. Impact of nitrite on detection of *Listeria monocytogenes* in selected ready-to-eat (RTE) meat and seafood products. *J Food Sci.* 2007; 72 (7):267-275
4. Manfreda G, De Cesare A, Stella S, Cozzi M, Cantoni C. Occurrence and ribotypes of *Listeria monocytogenes* in Gorgonzola cheeses. *Int J Food Microbiol.* 2005;102 (3):287-293
5. Fønnesbech Vogel B, Henrik Huss H, Ojeniyi B, Ahrens P, Gram L. Elucidation of *Listeria monocytogenes* contamination routes in cold-smoked salmon processing plants detected by dna-based typing methods. *Appl Environ Microbiol.* 2001; 67:2586-2595
6. Rodas-Suárez OR, Flores-Pedroche JF, Betancourt-Rule JM, Quiñones-Ramírez EI, Vázquez-Salinas

- C. Occurrence and antibiotic sensitivity of *Listeria monocytogenes* strains isolated from oysters, fish, and estuarine water. *Appl Environ Microbiol.* 2006; 72:7410-7412
7. Jallewar PK, Kalorey DR, Kurkure NV, Pande VV, Barbuddhe SB. Genotypic characterization of *Listeria* spp. isolated from fresh water fish. *Int J Food Microbiol.* 2007; 114 (1):120-123.
8. Hansen CH, Vogel BF, Gram L. Prevalence and survival of *Listeria monocytogenes* in Danish aquatic and fish processing environments. *J Food Prot.* 2006; 69:2113-2122
9. Miettinen H, Wirtanen G. Prevalence and location of *Listeria monocytogenes* in farmed rainbow trout. *Int J Food Microbiol.* 2005; 104:135-143
10. Destro MT. Incidence and significance of *Listeria* in fish and fish products from Latin America. *Int J Food Microbiol.* 2000; 62:191-196
11. Wulff G, Gram L, Ahrens P, Fonnesbech Vogel B. One group of genetically similar *Listeria monocytogenes* strains frequently dominates and persists in several fish slaughter- and smokehouses. *Appl Environ Microbiol.* 2006; 72:4313-4322
12. Atanassova V, Reich F, Klein G. Microbiological quality of sushi from sushi bars and retailers. *J Food Prot.* 2008; 71 (4):860-864
13. Porsby CH, Vogel BF, Mohr M, Gram L. Influence of processing steps in cold-smoked salmon production on survival and growth of persistent and presumed non-persistent *Listeria monocytogenes*. *Int J Food Microbiol.* 2008; 122 (3):287-295
14. Stiles ME. Biopreservation by lactic acid bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek.* 1996; 70:331-345
15. Jones RJ, Hussein HM, Zagorec M, Brightwell G, Tagg JR. Isolation of lactic acid bacteria with inhibitory activity against pathogens and spoilage organisms associated with fresh meat. *Food Microbiol.* 2008; 25 (2):228-234
16. Papagianni M. Ribosomally synthesized peptides with antimicrobial properties: biosynthesis, structure, function, and applications. *Biotechnol Adv.* 2003; 21:465-499
17. Izquierdo E, Marchioni E, Aoude-Werner D, Hasselmann C, Ennahar S. Smearing of soft cheese with *Enterococcus faecium* WHE 81, a multi-bacteriocin producer, against *Listeria monocytogenes*. *Food Microbiol.* 2009; 26:16-20
18. Eijsink VGH, Skeie M, Middelhoven PH, Brurberg MB, Nes IF. Comparative studies of class IIa bacteriocins of lactic acid bacteria. *Appl Environ Microbiol.* 1998; 64:3275-3281.
19. Floriano B, Ruiz-Barba JL, Jiménez-Díaz R. Purification and genetic characterization of Enterocin I from *Enterococcus faecium* 6T1a, a novel antilisterial plasmid-encoded bacteriocin which does not belong to the pediocin family of bacteriocins. *Appl Environ Microbiol.* 1998; 64:4883-4890.
20. De Long EF. Archaea in coastal marine environments. *Proc Natl Acad Sci.* 1992; 89:5685-5689.
21. Altschul SF, Gish W, Miller M, Myers EW Lipman DJ. Basic local alignment search tool. *J Mol Biol.* 1990; 215:403-410
22. Shiina A, Itoi S, Washio S, Sugita H. Molecular identification of intestinal microflora in *Takifugu niphobles*. *Comp Biochem Physiol D.* 2006; 1:128-132
23. Itoi S, Abe T, Washio S, Ikuno E, Kanomata Y, Sugita H. Isolation of halotolerant *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* from intestinal tract of coastal fish. *Int J Food Microbiol.* 2008; 121:116-121
24. Byelashov OA, Kendall PA, Belk KE, Scanga JA, Sofos JN. Control of *Listeria monocytogenes* on vacuum-packaged frankfurters sprayed with lactic acid alone or in combination with sodium lauryl sulfate. *J Food Prot.* 2008; 71:728-734