

Potencial biotecnológico de bacterias comensales para la inhibición de la colonización de la glándula mamaria por patógenos asociados a mastitis bovina

Año
2017

Directores
Isaac, Paula

Este documento está disponible para su consulta y descarga en el portal on line de la Biblioteca Central "Vicerrector Ricardo Alberto Podestá", en el Repositorio Institucional de la **Universidad Nacional de Villa María**.

CITA SUGERIDA

Isaac, P. (2017). *Potencial biotecnológico de bacterias comensales para la inhibición de la colonización de la glándula mamaria por patógenos asociados a mastitis bovina*. Villa María: Universidad Nacional de Villa María



Esta obra está bajo una Licencia Creative Commons Atribución 4.0 Internacional

Potencial biotecnológico de bacterias comensales para la inhibición de la colonización de la glándula mamaria por patógenos asociados a mastitis bovina.

Director: ISAAC Paula

Integrantes: PORPORATTO Carina, FERRERO Marcela Alejandra, BRESER María Laura, BACHETTI Romina Andrea.

Informe Académico

El objetivo principal del presente proyecto es evaluar la producción de factores inhibidores de biofilms de *S. aureus* y otros patógenos asociados a mastitis por bacterias comensales con aplicación en el tratamiento de infecciones intramamarias en bovinos lecheros. En este contexto, durante la primera parte del desarrollo nos enfocamos en el desarrollo de las actividades planteadas a partir de aislamientos bacterianos de muestras de leche.

Se trabajó en conjunto con el Tambo Experimental de la Estancia Yucat, con un total de 168 vacas en ordeño, las cuales fueron diagnosticadas de acuerdo a síntomas generales, señales de inflamación y el Test California (CMT). Para el aislamiento de bacterias se seleccionaron muestras de leche de cuartos con diferentes grados de mastitis clínica y subclínica. Se trabajó además con las muestras de cuartos no infectados y sin antecedentes de mastitis, para el aislamiento de bacterias comensales de la glándula mamaria que puedan resultar de interés como productores de metabolitos bioactivos. Las bacterias aisladas fueron identificadas filogenéticamente de acuerdo a la secuencia del gen ARNr 16S, siendo *Staphylococcus* el género predominante, y detectándose en menor medida los géneros *Bacillus*, *Enterococcus*, *Proteus*, *Corynebacterium*, *Streptococcus* y *Enterobacter*. Sólo dos aislamientos bacterianos pudieron obtenerse a partir de muestras de animales sanos. Ambas bacterias, denominadas LN1 y LN2 se ubican dentro del grupo *Staphylococcus* coagulasa-negativos (SCN) y mostraron altos valores de identidad con *S. chromogenes* y *S. haemolyticus*, respectivamente. Se evaluó además la capacidad de los aislamientos de formar biofilm, de acuerdo a la técnica de tinción con cristal violeta. De acuerdo a los resultados obtenidos, se realizó una clasificación cuantitativa que nos permitió ubicar al 66 % de los aislamientos en el grupo de fuertes formadores de biofilm, 19 % clasificados como moderados productores de biofilms, y sólo un 14 % de débiles formadores. Los mayores formadores de biofilms correspondieron a aislamientos patogénicos, en su mayoría *S. aureus* y *S. haemolyticus*.

A continuación se evaluó la capacidad de los extractos libres de células (ELC) de las dos bacterias comensales aisladas (*S. chromogenes* LN1 y *S. haemolyticus* LN2) de inhibir la formación de biofilm de diferentes cepas patógenas clasificadas como fuerte y moderadas formadoras de biofilm. El ELC de *S. chromogenes* LN1 (ELC-LN1) inhibió la formación de biofilms de más de la mitad de 31 cepas evaluadas, sin producir ningún cambio en el crecimiento planctónico de las mismas. El efecto antibiofilm de LN1 resultó efectivo no sólo en porcentajes de inhibición (de 30 a 90 % de disminución en formación de biofilms), sino también en el amplio espectro de acción; incluyendo especies como *S. aureus*, *S. devresiei*, *S. xylosum*, *S. haemolyticus*, *S. warneri* y *S. hominis*.

Los efectos anti-biofilm de ELC-LN1 fueron corroborados por microscopía láser confocal (CLSM). Con esta técnica pudo analizarse la topografía de superficie y la arquitectura tridimensional de los biofilms con y sin tratamiento. Además, pudo evaluarse el efecto microbicida del ELC-LN1 mediante tinción fluorescente con el kit LIVE/DEAD BacLight Bacterial Viability. De acuerdo a las fotografías, el ELC-LN1 fue capaz de inhibir la adhesión de bacterias patógenas a la superficie, sin afectar el número de células muertas luego del tratamiento (Figura 3), confirmando la ausencia de mecanismos microbicidas en el modo de acción de ELC-LN1.

Finalmente, para definir la naturaleza del compuesto bioactivo se realizó una caracterización físico-química sometiendo el sobrenadante de LN1 a varios tratamientos. Los datos demostraron que el componente biológicamente activo es termoestable, con una masa molecular mayor a 5 kDa y la sensibilidad al tratamiento con Proteínasa K sugiere naturaleza proteica. Los resultados obtenidos nos permiten confirmar el elevado potencial biotecnológico de *S. chromogenes* LN1 para el desarrollo de terapias alternativas en mastitis bovina.

Los resultados parciales de la primera etapa de ejecución del proyecto traen como conclusión la obtención de un microorganismo comensal, *S. chromogenes* LN1, como productor de actividad anti-biofilm frente a patógenos asociados a mastitis. Considerando el modo de vida en biofilms como un importante factor de virulencia en el establecimiento de la mastitis, que favorece la resistencia a terapias antibióticas y la evasión del sistema inmune, los compuestos anti-biofilms producidos por *S. chromogenes* LN1 representan una alternativa promisoriosa para el tratamiento de la mastitis. La importancia biotecnológica de *S. chromogenes* LN1 denota la potencialidad del proyecto planteado e invita a seguir profundizando en la temática.

Producción científica relevante

Los resultados parciales de este Proyecto en ejecución, permitieron la publicación de un póster en un congreso internacional y un artículo en una revista científica indexada, detallados a continuación:

Actividad antibiofilm de *Staphylococcus coagulasa-negativos* comensales y su efecto inhibitorio en patógenos asociados a mastitis bovina. Autores: Paula Isaac, Agustín Conesa, Alberto Rampone, Marcela Alejandra Ferrero, Carina Porporatto. Evento: XXII Congreso Latinoamericano de Microbiología. Institución organizadora: Asociación Latinoamericana de Microbiología (ALAM). Fecha: Septiembre 2016. Sin referato. Se publica en libro de resúmenes.

Commensal coagulase-negative *Staphylococcus* from the udder of healthy cows inhibits biofilm formation of mastitis-related pathogens. Autores: Paula Isaac, Luciana Paola Bohl, María Laura Breser, María Soledad Orellano, Agustín Conesa, Marcela Alejandra Ferrero, Carina Porporatto. Revista: *Veterinary Microbiology* (IF: 2.564). Editorial: Elsevier

Vinculación científica relevante

A través del proyecto nuestro grupo se ha vinculado mediante diferentes colaboraciones con la Planta Piloto de Procesos Industriales Microbiológicos (PROIMI-CCT Tucumán, CONICET) y la Universidad Nacional de Tucumán. La Dra. Ferrero puso a disposición el equipamiento de su Laboratorio de Microbiología Ambiental de PROIMI, para el desarrollo de las técnicas involucradas con la purificación e identificación de compuestos de interés. Por otro lado la directora ha participado como docente del curso de posgrado CABBIO (Centro Argentino-Brasileño de Biotecnología) titulado "Sistemas de inmovilización de microorganismos y enzimas para su aplicación en bioconversiones de interés en biotecnología ambiental e industrial", a cargo de la temática inmovilización por biofilms que se dictó en colaboración con el Dr. Alexandre José Macedo de la Universidade Federale do Rio Grande du Sul.