

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

---

---

Año

2018

Directora de proyecto

Isaac, Paula

Equipo de investigación

Porporatto, Carina; Ferrero, Marcela; Breser, Laura y Bachetti,  
Romina

Alumnos integrantes

Rocha, Lautaro Fernando y Boyle, Leda

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., [et al.] (2018). *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



## INFORME ACADÉMICO FINAL

### Proyectos de Investigación 2016-2017

#### PROYECTO:

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

#### DIRECTOR:

Paula Isaac

#### CO-DIRECTOR:

#### EQUIPO DE INVESTIGACIÓN:

Carina Porporatto

Marcela Ferrero

Laura Breser

Romina Bachetti

#### ALUMNOS INTEGRANTES:

Lautaro Fernando Rocha

Leda Boyle

### 1. INFORME ACADÉMICO DEL PROGRAMA/PROYECTO<sup>1</sup>

#### RESUMEN

La mastitis es considerada la patología más relevante en vacas lecheras y responsable de las mayores pérdidas económicas en Argentina y el mundo. Si bien el control de mastitis ha mejorado notablemente en los últimos años, esta afección continúa generando serios problemas en sanidad animal y producción. En consecuencia, tanto la incidencia de la



## INFORME ACADÉMICO FINAL Proyectos de Investigación 2016-2017

mastitis en bovinos como las dificultades asociadas a su tratamiento y prevención, hacen que sea necesario la implementación de nuevas terapias alternativas. 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 se encuentran entre las nuevas drogas anti-mastitis más promisorias como alternativa terapéutica.

### RESULTADOS FINALES DEL PROYECTO

Como objetivo general del proyecto, planteamos evaluar la producción de factores anti-biofilms por bacterias comensales con aplicación en el tratamiento de infecciones intramamarias de *S. aureus* y otros patógenos asociados a mastitis en bovinos lecheros. Para cumplir este objetivo, nos propusimos: (1) aislar bacterias comensales y patógenas a partir de muestras de leche e hisopado externo del pezón de animales sanos y con diferentes grados de infecciones intramamarias, (2) evaluar la capacidad de los aislamientos de producir compuestos con actividad anti-biofilm de los tipos: inhibición de la formación de biofilms y/o erradicación de biofilms maduros, (3) purificar y caracterizar los compuestos con actividad anti-biofilm obtenidos y (4) caracterizar la interacción entre los agentes anti-biofilm y las células epiteliales e inmunes del tejido mamario bovino.

(1) Aislamiento de bacterias comensales y patógenas a partir de muestras de leche e hisopado externo del pezón de animales sanos y con diferentes grados de infecciones intramamarias

Las muestras biológicas para el desarrollo de este proyecto fueron colectadas en el Tambo Experimental de la Estancia Yucat. El tambo contaba al momento del muestreo con un total de 168 vacas en ordeño que 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 e hisopado de pezón 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.

Los aislamientos se obtuvieron a partir de 54 muestras colectadas a partir de 42 animales, luego del plaqueo en diferentes medios de cultivo: tripticasa soja (TSB) y cerebro-corazón (BHI) como medios no selectivos; manitol salado (MSA) para el aislamiento de estafilococos, McConkey para bacterias gram negativas y CHROMagar™ Staph aureus para el aislamiento de cepas de *S. aureus*. Las bacterias aisladas fueron identificadas filogenéticamente de acuerdo a la secuencia del gen ARNr 16S. De acuerdo a esta identificación, el género predominante fue *Staphylococcus*, detectándose en menor medida los géneros *Bacillus*, *Enterococcus*, *Proteus*, *Corynebacterium*, *Streptococcus* y *Enterobacter*. Sólo dos aislamientos bacterianos pudieron obtenerse a partir de muestras de leche de animales sanos y se consideraron comensales. Ambas bacterias, denominadas



## INFORME ACADÉMICO FINAL Proyectos de Investigación 2016-2017

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.

La diversidad bacteriana obtenida a partir de hisopado de pezón, no mostró diferencias notables entre animales diagnosticados como sanos o enfermos, definiéndose como aislamientos ambientales.

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*.

(2) Capacidad de los aislamientos de producir compuestos con actividad anti-biofilm de los tipos: inhibición de la formación de biofilms y/o erradicación de biofilms maduros

I. Estudio del efecto de los exoproductos de *S. chromogenes* LN1 en la formación de biofilms patogénicos.

Se evaluó la capacidad de los extractos libres de células 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 fuertes y moderadas formadoras de biofilm. En el ensayo se incluyeron como cepas patogénicas testigos los aislamientos mayores productores de biofilm de este trabajo, cepas de referencia en la temática y aislamientos de campo realizados por nuestro y otros grupos de investigación. Los sobrenadantes libres de células (SLC) se evaluaron en una proporción 25 % del volumen total en placas de 96 wells. Bajo estas condiciones, el SLC de *S. haemolyticus* LN2 no fue capaz de inhibir la formación de ninguna de las cepas patógenas, mientras que el SLC de *S. chromogenes* LN1 (SLC-LN1) inhibió la formación de biofilms de más de la mitad de 31 cepas evaluadas, sin afectar el crecimiento 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. xylosus*, *S. haemolyticus*, *S. warneri* y *S. hominis*.

El SLC-LN1 fue liofilizado y se evaluaron diferentes concentraciones en el tratamiento de cepas sensibles y resistentes, de manera de evaluar si el tratamiento resultaba dependiente de la dosis empleada. La actividad antibiofilm de SLC-LN1 resultó ser dosis-dependiente únicamente frente a *S. aureus* V329. En las otras cepas sensibles, el efecto inhibitorio no fue correlativo a la concentración del sobrenadante. Pudo observarse además, que aquellas cepas resistentes a los compuestos bioactivos de LN1 en el screening de actividad, no



## INFORME ACADÉMICO FINAL Proyectos de Investigación 2016-2017

resultaron afectados en su condición de hiper-formadores de biofilm, aun cuando la concentración de compuesto activo se incrementó 4 veces.

II. Estudio del efecto de *Bacillus* sp. H21 en la erradicación de biofilms maduros de *S. aureus*.

La actividad anti-biofilm de los aislamientos ambientales obtenidos a partir de los hisopados de pezón, se evaluó frente a biofilms maduros de cepas de *S. aureus* patogénicas asociadas a infecciones intramamarias en bovinos y caracterizadas previamente como hiper-formadoras de biofilm. De las 97 bacterias ambientales estudiadas, el aislamiento H21 identificado de acuerdo a el análisis del gen ARNr 16S como *Bacillus* sp. fue capaz de erradicar entre un 70 y un 100 % de biofilms maduros de las 15 cepas de *S. aureus* evaluadas. Resulta sumamente importante destacar que esta actividad anti-biofilm no se manifiesta como una consecuencia de una actividad antimicrobiana, ya sea microbioestática o microbicida. Además, la capacidad de erradicar biofilms patogénicos altamente resistentes a terapias antimicrobianas, resulta de suma importancia en patologías asociadas a biofilms bacterianos como mecanismos de virulencia, dado que pueden utilizarse en terapias complementarias al uso de antibióticos comerciales, aumentando la efectividad de los mismos.

(3) Caracterización de los compuestos con actividad anti-biofilm obtenidos

I. Caracterización físico-química de los exoproductos bioactivos de *S. chromogenes* LN1  
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 Proteinasa 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

II. Caracterización del componente activo de *Bacillus* sp. H21

De acuerdo a bibliografía consultada y teniendo en cuenta la morfología característica del microorganismo activo, se propuso que sustancias poliméricas extracelulares (EPS) pueden ser responsables de la actividad anti-biofilm. Para comprobar tal suposición, se realizó una extracción de EPS que permitió la purificación de tres fracciones diferentes: EPS soluble extracelular, EPS débilmente adherido a membrana y EPS fuertemente adherido a la membrana plasmática. De acuerdo a los resultados obtenidos luego de evaluar la capacidad de erradicar biofilms de las tres fracciones, pudo confirmarse que *Bacillus* sp. H21 produce un EPS fuertemente unido a membrana que actúa destruyendo biofilms formados de *S. aureus*.

(4) Caracterización de la interacción entre los agentes anti-biofilm y las células epiteliales e inmunes del tejido mamario bovino



## INFORME ACADÉMICO FINAL Proyectos de Investigación 2016-2017

Finalmente se determinó in vitro si los compuestos anti-biofilms encontrados en este trabajo generaban efectos citotóxicos en líneas celulares bovinas, mediante el ensayo del MTT (metil tiazol tetrazolio). Se evaluaron diferentes concentraciones de los compuestos bioactivos, y pudo observarse que únicamente las concentraciones más elevadas generaron efectos negativos sobre células epiteliales y macrófagos bovinos. Sin embargo, aquellas concentraciones activas como anti-biofilms frente a *S. aureus* patógenicos, no generaron ninguna modificación en los niveles de viabilidad y fenotipos celulares, confirmando su potencial para ser utilizados en tratamientos in vivo.

### 2. VINCULACIÓN CIENTÍFICA

#### 2.1. *Describir vínculos generados desde el Programa/Proyecto con referencia a demandas del Sector Productivo.*

Dado el nivel inicial de la línea de investigación planteada, en esta etapa no pudieron establecerse vínculos reales con empresas del sector productivo. Sin embargo, de acuerdo al éxito de proyecto obtenido en los resultados y la potencialidad comprobada del proyecto, se espera avanzar en estrategias de transferencia en un futuro cercano.

#### 2.2. *Describir vínculos que respondan a demandas internas de distintas áreas de la UNVM.*

En respuesta al crecimiento del Instituto de Ciencias Básicas y Aplicadas, durante la ejecución de este proyecto se planteó la necesidad de coordinar acciones conjuntas y organizadas para el uso de los laboratorios de Docencia e Investigación, el manejo de equipamiento, así como el establecimiento de estrategias de bioseguridad para desarrollar las actividades de la mejor manera posible. En este contexto, los miembros del proyecto forman parte de la Comisión de Bioseguridad de los laboratorios de la UNVM, que desde hace dos años se encuentra trabajando en la planificación de sistemas de evacuación y actividades preventivas de accidentes. A su vez, colaboran de manera activa con los miembros de la Comisión Coordinadora de los Laboratorios de Docencia e Investigación, para la elaboración de normativas y protocolos para el funcionamiento y trabajo seguro de los laboratorios de la UNVM.



**INFORME ACADÉMICO FINAL**  
**Proyectos de Investigación 2016-2017**

**3. PUBLICACIÓN EN REPOSITORIO DIGITAL DE LA UNVM**

*AUTORIZO LA PUBLICACIÓN DE ESTE INFORME ACADÉMICO FINAL EN EL REPOSITORIO DIGITAL DE LA UNVM: SI*