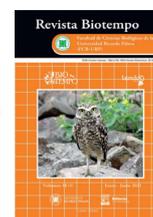


Biotempo (Lima)



<https://revistas.urp.edu.pe/index.php/Biotempo>

ORIGINAL ARTICLE / ARTÍCULO ORIGINAL

EXTRACTION, CHARACTERIZATION AND ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF CAROTENOID PIGMENT FROM *MICROCOCCUS LUTEUS*

EXTRACCIÓN, CARACTERIZACIÓN Y ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DEL PIGMENTO CAROTENOIDE DE *MICROCOCCUS LUTEUS*

Harley Fernández-Sánchez^{1*}; Tomás Agurto-Sáenz¹; Hugo Mauricio-Gonzales Molfino²; Andrés Ricardo Chavieri-Salazar³ & Alcides Guerra-Santa Cruz¹

¹ Laboratorio de Microbiología, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Ricardo Palma, Lima, Perú.

² Laboratorio de Biotecnología Animal, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Ricardo Palma, Lima, Perú.

³ Laboratorio de Ecología, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Ricardo Palma, Lima, Perú.

* Corresponding author: harley.fernandez@urp.edu.pe

Harley Fernández-Sánchez: <https://orcid.org/0000-0002-4408-0167>

Tomás Agurto-Sáenz: <https://orcid.org/0000-0001-5186-9265>

Hugo Mauricio-Gonzales Molfino: <https://orcid.org/0001-8632-5823>

Andrés Ricardo Chavieri-Salazar: <https://orcid.org/0000-0002-2644-959X>

Alcides Guerra-Santa Cruz: <https://orcid.org/0000-0002-5130-8190>

ABSTRACT

Micrococcus luteus (Schroeter) Cohn 1872 is one of the bacteria found in the environment that presents colonies with a very characteristic yellowish color. Previously, this color was identified as the result of carotenoid production in this species and that it can have a variety of beneficial properties that may depend on the origin of isolation. Currently, it is important to explore several food grade pigments from natural sources and their potential effects on the food industry, human or veterinary health since they tend to be less harmful. For that reason, the first objective of the study was to extract this carotenoid pigment from *M. luteus* isolated from the environment with volatile organic solvents. Second, to characterize this pigment using a Thin Layer Chromatography technique. Finally, to perform an antimicrobial essay testing some of most common pathogens in human and animal health all provided by the Ricardo Palma University Microbiology Laboratory, Lima, Peru. Results included not only a successful and simplified crude extraction of the carotenoid pigment, but probed its antibacterial activity against some pathogens strains such as *V. parahaemolyticus*, *P. fluorescens* and *R. equi*.

Keywords: antimicrobial – carotenoid – *Micrococcus luteus* – pigment

RESUMEN

Micrococcus luteus (Schroeter) Cohn 1872 es una de las bacterias que se encuentran en el ambiente, sus colonias presentan una pigmentación amarillenta. Este pigmento es un carotenoide cuyas propiedades varían según el ambiente de origen o aislamiento. En la actualidad, es importante explorar varias fuentes naturales de colorantes de grado alimenticio y sus potenciales efectos en la industria alimentaria, la salud humana o veterinaria. Por ello, el presente trabajo tuvo como objetivo realizar la extracción del pigmento carotenoide de *M. luteus* con solventes orgánicos y la respectiva caracterización mediante cromatografía en capa fina (TLC) del pigmento carotenoide de *M. luteus* aislado del Laboratorio de Microbiología de la Universidad Ricardo Palma, Lima, Perú, para, posteriormente, evaluar su actividad antimicrobiana frente a una serie de cepas proporcionadas por este mismo laboratorio. Consecuentemente, se obtuvo no solo una extracción simplificada cruda del pigmento con étil acetato y un factor de retención (R/ f) de 0,4 para ese pigmento, sino que también se confirmó su actividad antibacteriana contra algunas cepas patógenas de importancia humana y veterinaria como lo son *V. parahaemolyticus*, *P. fluorescens* y *R. equi*.

Palabras clave: *Micrococcus luteus* – carotenoide – pigmento - antimicrobiano

INTRODUCCIÓN

Micrococcus Cohn 1872 es un género de bacterias Gram positivas que pertenecen a la Familia Micrococcaceae. Las células de *Micrococcus* son esféricas, cocos que forman tétradas y sin motilidad; sin embargo, las colonias de *Micrococcus luteus* (Schroeter) Cohn, 1872 presentan adicionalmente una pigmentación de color amarillo (Whitman *et al.*, 2012). Este pigmento amarillento se debe a la producción de carotenoides relacionados a las decaprenoxantinas (Ibrahim, 2008; Baskar *et al.*, 2010; Pawar *et al.*, 2016). La mayoría de estos microorganismos viven en la piel del ser humano; sin embargo, pueden permanecer en ambientes donde éste frecuente, esparcidas en el aire (Whitman *et al.*, 2012). Por otro lado, *M. luteus* posee una gran importancia en la actualidad debido a la demanda de pigmentos naturales que existe; este resalta tanto por su seguridad ambiental como por sus posibles efectos beneficiosos sobre la salud humana (Mohana *et al.*, 2013). Es esencial explorar varias fuentes naturales de colorantes de grado alimenticio y sus potencialidades en otras industrias (Rostami *et al.*, 2016). Finalmente, se sabe que los pigmentos son metabolitos secundarios bioactivos en microbios, pues varios proyectos de bioprospección que buscan moléculas naturales se han enfocado en bacterias pigmentadas (Pascoal *et al.*, 2020). Por todo lo anterior mencionado, el presente trabajo tuvo como objetivo extraer y caracterizar el pigmento carotenoide de *M. luteus* aislado del ambiente, y posteriormente evaluar su actividad antimicrobiana.

MATERIALES Y MÉTODOS

Aislamiento de *Micrococcus luteus*

El medio de cultivo usado fue agar soya triptona con NaCl a una concentración de 1 g·L⁻¹, el cual se sirvió en placas Petri y se dejaron abiertas y expuestas al ambiente en el Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Ricardo Palma, Lima, Perú por dos h de 14:00 – 16:00 h. Al término, se cubrieron las placas y se trasladaron para su incubación a 27° C por 48 h.

Las colonias obtenidas de color amarillo fueron seleccionadas y aisladas en medio de cultivo hasta obtener colonias puras amarillas. Las presuntas colonias de *M. luteus* fueron sometidas a una tinción Gram, pruebas bioquímicas según Manual de Bergey (Whitman *et al.*, 2012) y verificación de formación de esporas.

Efecto de la concentración de NaCl sobre el crecimiento bacteriano

Las colonias aisladas fueron enriquecidas en un caldo soya triptona con NaCl a 1 g·L⁻¹ de concentración. De este cultivo se inocularon con un asa de 0,5 cm de diámetro en cinco tubos con caldo soya triptona a cuatro diferentes concentraciones de NaCl 1, 2, 3 y 5 g·L⁻¹. Se dejó incubando a 28°C agitando cada 6 h. A partir de las 24 h se analizó la turbidez del medio mediante la medición de la absorbancia por espectrofotometría UV de forma diaria por cuatro días consecutivos a una longitud de onda 660 nm.

Extracción y caracterización del pigmento carotenóide

Para la extracción del pigmento se utilizó el método de acuerdo a Pawar *et al.* (2016) con algunas ligeras modificaciones. Se tomó una colonia aislada y confirmada para *M. luteus* y fue estriada, abarcando en su totalidad, una placa con agar soya triptona con NaCl a 1 g·L⁻¹ de concentración. A continuación, se llevó a incubar a 28°C hasta observar la mayor cantidad de masa posible (96 h). Posteriormente, se cosecharon las bacterias con un asa de siembra y se colocó aproximadamente 0,5 g de masa bacteriana en un tubo de dos mL y a este se le añadió un mL de metanol a 4°C, se agitó bruscamente por cinco min con la ayuda de un vortex y se centrifugó a 14000 rpm por dos min. A continuación, se recuperó el solvente con el pigmento. Como segunda extracción, esta misma masa bacteriana fue resuspendida en un mL de etil acetato. Finalmente, ésta volvió a ser centrifugada de la misma forma anterior y el solvente fue recuperado junto con el pigmento (sobrenadante). Ambos extractos fueron llevados a espectrofotometría UV para medir sus absorbancias a 660 nm.

Cromatografía en capa fina (TLC): el procedimiento para TLC (gel de sílice GF234) que se utilizó fue descrito por Basker *et al.* (2010) con ligeras modificaciones. En este caso se diseñó un sistema disolvente adecuado que contuvo cloroformo: metanol: agua en la relación 5:13:2, el cual se obtuvo por el método de prueba y error. El factor de retención (R/f) se calculó posteriormente (Pawar *et al.*, 2016).

Determinación de la actividad antimicrobiana

Sé realizó un antibiograma con microorganismos patógenos humanos y otros de importancia veterinaria que incluyen (*Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar *typhimurium* (ex Kauffmann & Edwards, 1952) Le Minor & Popoff, 1987 ATCC 14028, *Escherichia coli* (Migula, 1895) Castellani & Chalmers, 1919 ATCC 25922, *Enterococcus faecalis* (Andrewes and Horder, 1906) Schleifer & Kilpper-Bälz, 1984 ATCC 29212, *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* Rosenbach, 1884 ATCC 25923, *Staphylococcus epidermidis* (Winslow & Winslow, 1908) Evans, 1916 ATCC 12228, *Listeria monocytogenes* (E. Murray *et al.*, 1926) Pirie, 1940 ATCC 19118, *Listeria ivanovii* Seeliger *et al.*, 1984 ATCC 19119, *Rhodococcus equi* (Magnusson, 1923) Goodfellow & Alderson, 1977 ATCC 6939 y *Pseudomonas aeruginosa* (Schröter, 1872) Migula, 1900 ATCC 19429, *Pseudomonas aeruginosa* (Schröter, 1872)

Migula, 1900 ATCC 27853, *Rhodotorula mucilaginosa* (Fresen.) F.C.Harrison (1928) ATCC 66034, *Vibrio parahaemolyticus* (Fujino *et al.* 1951) Sakazaki *et al.*, 1963 ATCC 17802 y *Pseudomonas fluorescens* (Flügge, 1886) Migula, 1895 aislada de suelo agrícola) se obtuvieron del banco de cepas administrado por el laboratorio de Microbiología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Ricardo Palma, Lima, Perú.

Todas las bacterias y la levadura probadas se mantuvieron en agar Luria y se usaron dos variantes a la hora inocular el pigmento para el ensayo antimicrobiano. El primer método descrito por Majeed (2017), requirió la preparación de placas de agar Mueller Hinton, se hicieron pocillos en cada placa usando una pipeta Pasteur, luego se distribuyó uniformemente los organismos respectivos en placas de agar y se agregó el extracto de pigmento a los pocillos con una micropipeta estéril de 50 µL en cuatro concentraciones 100%, 75%, 50% y 25%; después de 24 h de incubación a 37°C, la zona de inhibición se midió en mm. Mientras que, en el otro método del ensayo, se realizó de la forma tradicional sumergiendo los discos de papel filtro en soluciones con las concentraciones mencionadas del pigmento extraído y colocándolas en cada cuadrante (Mohana *et al.*, 2013).

Análisis estadístico

Los cuadros comparativos y los gráficos con línea de tendencias 2D fueron realizados usando el software de hoja de cálculo para computadora Excel 16.0.

Aspectos éticos: Los autores señalan que se cumplieron todos los aspectos éticos a nivel nacional e internacional.

RESULTADOS

Aislamiento de *Micrococcus luteus*

Se aislaron colonias presuntivas de *M. luteus* recopiladas del ambiente y fue corroborado con pruebas bioquímicas y tinción (Tabla 1). Asimismo, se observó la producción del pigmento característico de esta especie (Figuras 1 y 2).

Tabla 1. Resultado de las pruebas fenotípicas para la identificación de *Micrococcus luteus*.

Prueba	Resultado
Coloración Gram	Positivo (+)
Catalasa	Positivo (+)
Crecimiento a 45°C	Positivo (+)
Bacitracina	Sensible
Motilidad	Negativo (-)
Reducción del Nitrato	Negativo (-)
Voges Proskauer	Negativo (-)
Manosa	Positivo (+)
Dulcitol	Negativo (-)
Arabinosa	Positivo (+)
Caseína	Positivo (+)
Almidón	Negativo (-)
Propionato	Positivo (+)
Piruvato	Positivo (+)
Lactosa	Negativo (-)
Manitol	Negativo (-)

Efecto de la concentración de NaCl sobre el crecimiento bacteriano

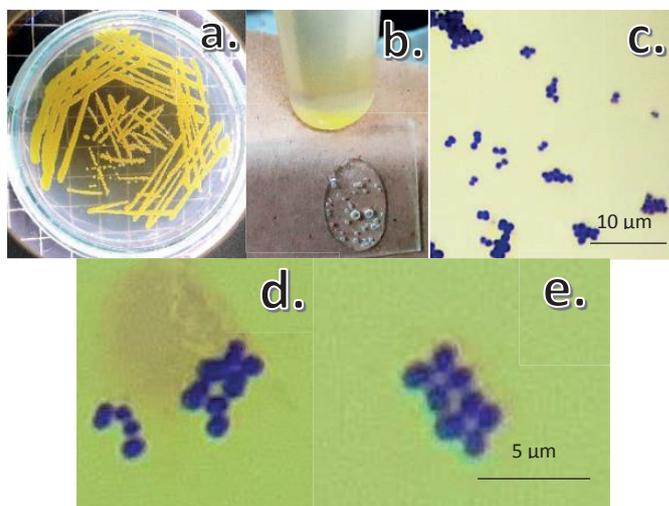


Figura 1. (a) *Micrococcus luteus* produciendo pigmentación en agar soya triptona a 1 g·L⁻¹ de NaCl. (b) Prueba de Catalasa positiva. (c-e) Tinción gram, observación en el microscopio a 1000X, Cocos gram positivos no esporulados y forman tétradas coincidiendo de esta manera con los resultados obtenidos por (Kooken *et al.*, 2012).

Se observó que a 3% y 5% de NaCl el crecimiento bacteriano se hace muy lento en comparación del 1%

(Figura 3). La masa bacteriana representada por la absorbancia se ve disminuida conforme se va aumentando

la concentración de NaCl (Figura 4). Adicionalmente, observamos que, si comparamos las absorbancias cada 24 h, a partir de las 48 h, la masa bacteriana (absorbancia) en concentración 1 g·L⁻¹ de NaCl alcanza su nivel óptimo;

mientras que al aumentar la concentración de NaCl, a las bacterias les toman más tiempo alcanzar dicho nivel de masa (Figura 4).



Figura 2. Aislamiento de colonias de *Micrococcus luteus* en agar soya triptona.

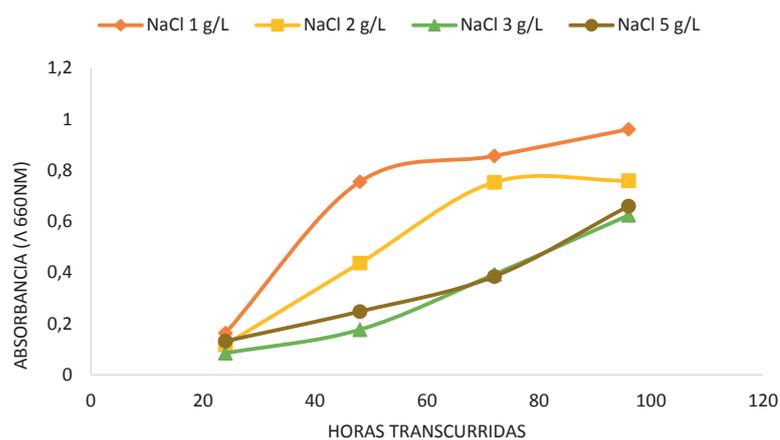


Figura 3. Crecimiento de *Micrococcus luteus* frente a diferentes concentraciones de NaCl.

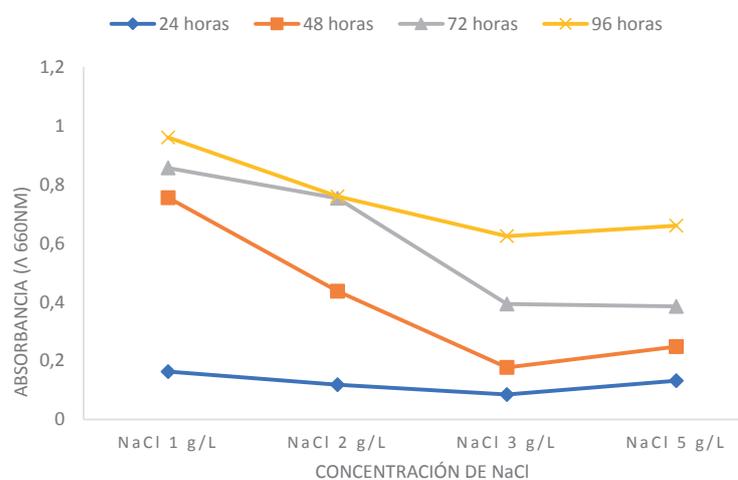


Figura 4. Comparación de las masas bacterianas alcanzadas por h según la concentración de NaCl.

Extracción y caracterización del pigmento carotenoide

Se observó una mayor efectividad en la segunda extracción

con el etil acetato, debido a que presentó mayor absorbancia que en la primera extracción del pigmento carotenoide producido por *M. luteus*, el cual se realizó con metanol (figura 5).

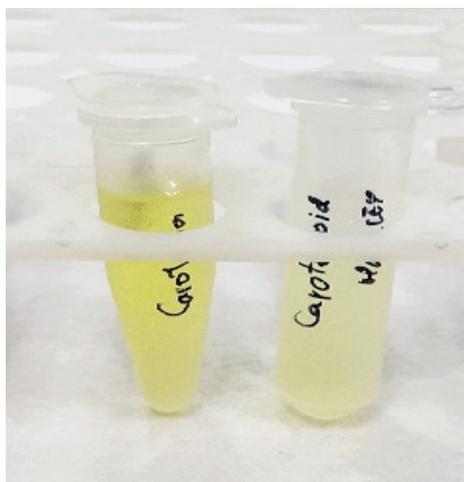


Figura 5. (Izquierda) Extracción con etil acetato D.O. (660 nm) de 0,059. (Derecha) Extracción con Metanol con D.O. (660 nm) de 0,034.

Cromatografía en capa fina (TLC): Se diseñó un sistema disolvente adecuado que contuvo cloroformo: metanol:

agua en la relación 5:13:2 por el método de prueba y error (Figura 6). El factor de retención (R_f) fue de 0,4.



Figura 6. Perfil de TLC (Cromatografía en capa fina) del pigmento extraído de *Micrococcus luteus*, con sistema cloroformo: metanol: agua en la relación 5:13:2, se obtuvo un R_f de 0,4.

Determinación de la actividad antimicrobiana

El extracto del pigmento de *M. luteus* resultó tener efecto antibacterial contra *P. fluorescens* aislado de suelo agrícola a través del antibiograma por el método de los pasillos en concentraciones de 100%, 75% y 50%. Adicionalmente, se debe resaltar una capacidad de este pigmento por inhibir el crecimiento de microorganismos no evaluados anteriormente como *V. parahaemolyticus* y de *R. equi*; el primero mostró una sensibilidad al

extracto del pigmento de *M. luteus* a concentraciones de 100% y 75%, mientras que el segundo de importancia veterinaria mostró sensibilidad a solo 100% del extracto (Figura 7).

Por otro lado, el antibiograma desarrollado por el método tradicional con discos de papel filtros sumergidos con el pigmento y sus respectivas concentraciones, no observó presencia de halo (Tabla 2).

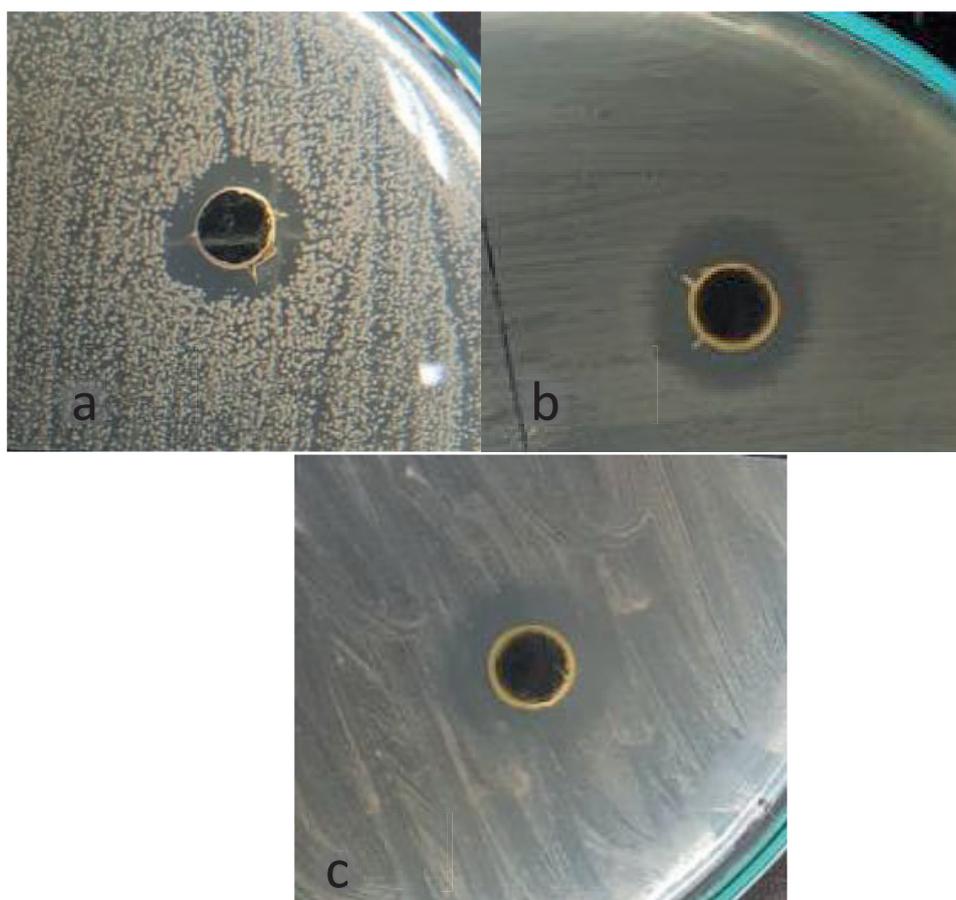


Figura 7. Halos obtenidos del antibiograma con el método del pocillo con el extracto del pigmento con concentración al 100% de *Micrococcus luteus* sobre bacterias patógenas humanas y de importancia veterinaria. Imágenes: a= *V. parahaemolyticus*, b= *P. fluorescens*, c= *Rhodococcus equi*.

Aspectos éticos:

Los autores señalan que se cumplieron todas las normas éticas nacionales e internacionales.

Tabla 2. Resultados del antibiograma contra microorganismos patógenos humanos y de importancia veterinaria, cuantificación de la inhibición por mm (halo) a diferentes concentraciones del pigmento de *M. luteus* y por dos técnicas diferentes. Ctrl=control negativo para ambos métodos.

Microorganismo	ATCC	Halo en mm								Ctrl	
		Método Pocillo				Método disco					
		100%	75%	50%	25%	100%	75%	50%	25%		
<i>Salmonella entérica</i> subsp. <i>enterica</i>											
<i>serovar. typhimurium</i>	14028	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Escherichia coli</i>	25922	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Enterococcus faecalis</i>	29212	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i>	25923	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	12228	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Listeria monocytogenes</i>	19118	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Listeria ivanovii</i>	19119	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Rhodococcus equi</i>	6939	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	19429	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	27853	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	66034	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	17802	5	2	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	-	3	2	1	-	-	-	-	-	-	-

DISCUSIÓN

En primer lugar, corroboramos nuestros resultados con los de Young *et al.* (2010) y estos indicaron que *M. luteus* es halotolerante y se observa crecimiento hasta 5 g·L⁻¹ de NaCl en caldo soya triptona. Sin embargo, es importante evaluar el crecimiento vinculado a la salinidad en otros medios de cultivos debido a la ligera variancia en su composición.

Por otro parte, después de observar que la masa bacteriana se ve disminuida conforme se va aumentando la concentración de NaCl en el medio, podemos concluir de forma similar a Puyen *et al.* (2012), que el aumento de la concentración de NaCl resulta en un estrés osmótico desfavoreciendo el crecimiento de *M. luteus* a lo igual que Kodali *et al.* (2014) que obtuvieron resultados semejantes con algunas otras bacterias ambientales catalogadas también como halotolerantes.

La primera extracción del pigmento carotenoide producido por *M. luteus* se realizó con metanol coincidiendo con el trabajo realizado por Mohana *et al.* (2013) y Majeed (2017). No obstante, esta extracción

puede ser considerada como “cruda”, ya que para poder identificarlas es necesario realizar una mayor purificación de los carotenoides previamente mediante una cromatografía de columna como lo demuestra Mohana *et al.* (2013). Asimismo, podemos sugerir que en próximos ensayos se considere usar el etil acetato como solvente desde la primera extracción del pigmento y no solo para la purificación del pigmento por cromatografía en columna como lo propone en su procedimiento con la finalidad de aumentar la polaridad de la solución (Pawar *et al.*, 2016; Surekha *et al.*, 2016).

Finalmente, cabe destacar que el método de los pocillos (Majeed, 2017), en el cual se cargan 50 µL de pigmento extraído para el ensayo del antibiograma resultó ser el más efectivo en comparación del método tradicional con discos de papel filtros sumergidos con la solución del carotenoide (Mohana *et al.*, 2013), en el cual no se observó presencia de halo. Esto podría indicar que se necesita una mayor cantidad de muestra del pigmento para provocar la inhibición la cual es motivo de estudio para futuros trabajos.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Baskar, V.; Madharanraj, P.; Kanimozhi, K. & Panneerselvam, A. 2010. Characterization of carotenoids from selected strains of *Streptomyces* sp. *Annals of Biological Research*, 1: 194-200.
- Fujino, T.; Okuno, Y.; Nakada, D.; Aoyama, A.; Fukai, K.; Mukai, T. & Ueho, T. 1951. On the bacteriological examination of shirasu food poisoning. *Journal of the Japanese Association of Infectious Diseases*, 25:11.
- Ibrahim, A. 2008. Production of carotenoids by a newly isolated marine *Micrococcus* sp. *Biotechnology*, 7: 469-474.
- Kodali, V.; Mikkili, I.; Karlapudi, A.; Badu, J.; & Math, S. 2014. Isolation, screening and extraction of Polyhydroxybutyrate (PHB) producing bacteria from sewage sample. *International Journal of PharmTech Research*, 6: 850-857.
- Kookan, J.; Fox, K.; Fox, A. 2012. Characterization of *Micrococcus* strains isolated from indoor air. *Molecular and Cell Probes*, 26: 1-5.
- Majeed, H. 2017. Antimicrobial activity of *Micrococcus luteus* carotenoid pigment. *Al-Mustansiriyah Journal of Science*, 28: 64-69.
- Mohana, D.; Thippeswamy, S. & Abhishek, R. 2013. Antioxidant, antibacterial, and ultraviolet-protective properties of carotenoids isolated from *Micrococcus* spp. *Radiation Protection and Environment*, 36: 168-174.
- Pascoal, F.; Magalhães, C. & Costa, R. 2020. The link between the ecology of the prokaryotic rare biosphere and its biotechnological potential. *Frontiers in microbiology*, 11: 231.
- Pawar, S.; Dhanya, P.; Sarath, J.; Pradeep, S & Sailas, B. 2016. *Micrococcus luteus* Strain BAA2, A novel isolate produces carotenoid pigment. *Electronic Journal of Biology*, 12: 83-89.
- Puyen, Z.; Villagrasa, E.; Maldonado, J.; Esteve, I. & Solé, A. 2012. Viability and biomass of *Micrococcus luteus* DE2008 at different salinity concentrations determined by specific fluorochromes and CLSM-Image analysis. *Current Microbiology*, 64:75-80.
- Rostami, H.; Hamed, H. & Yolmeh, M. 2016. Some biological activities of pigments extracted from *Micrococcus roseus* (PTCC 1411) and *Rhodotorula glutinis* (PTCC 5257). *International Journal of Immunopathology and Pharmacology*, 29: 684-695.
- Sakazaki, R.; Iwanami, S. & Fukumi, H. 1963. Studies on the enteropathogenic facultatively halophilic bacteria *Vibrio parahaemolyticus*. I. Morphological, cultural and biochemical properties and its taxonomical position. *Japanese Journal of Medical Science & Biology*, 16: 161-188.
- Seeliger, H.P.; Rocourt, J.; Schrettenbrunner, A.; Grimont, P.A. & Jones, D. 1984. *Listeria ivanovii* sp. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 34: 336-337.
- Surekha, P.; Dhanya, P.; Sarath, Josh.; Pradeep, S. & Sailas, B. 2016. *Micrococcus luteus* Strain BAA2, A novel isolate produces carotenoid pigment. *Electronic Journal of Biology*, 12: 83-89.
- Young, M.; Artsatbanov, V.; Beller, H.; Chandra, G.; Chater, K.; Dover, L.; Goh, E.; Kahan, T.; Kaprelyants, A.S.; Kyrpides, N.; Lapidus, A.; Lowry, S.R.; Lykidis, A.; Mahillon, J.; Markowitz, V.; Mavromatis, K.; Mukamolova, G.V.; Oren, A.; Rokem, J.S.; Smith, M.C.M.; Young, D.I. & Greenblatt, C.L. 2010. Genome sequence of the Fleming strain of *Micrococcus luteus*, a simple free-living *Actinobacterium*. *Journal of Bacteriology*, 192: 841-860.
- Whitman, W. B.; Goodfellow, M.; Kämpfer, P.; Busse, H.; Trujillo, M.E.; Ludwig, W. & Suzuki, K. (Eds.). 2012. *Bergey's manual of systematic bacteriology: Volume 5: The Actinobacteria*. Springer Science & Business Media.

Received April 3, 2021.

Accepted May 31, 2021.