

**EFECTO ANTIBIÓTICO DE PIOCIANINA DE
Pseudomonas aeruginosa SOBRE *Escherichia coli* y
Staphylococcus aureus.**

Santiago Justo¹,
Tania Churasacari¹,
Carlos Elías¹,
Alcides Guerra¹

RESUMEN

Pseudomonas aeruginosa es una bacteria gramnegativa, patógeno oportunista de importancia clínica pues causa gran cantidad de enfermedades intrahospitalarias. Además este es un organismo ubicuo debido principalmente a su alta capacidad para metabolizar variedad de sustratos. Esta bacteria tiene la capacidad de producir varios pigmentos extracelulares, uno de ellos, la piocianina es una exotoxina perteneciente al grupo de las fenazinas que cuenta con la capacidad de inhibir el desarrollo de organismos competidores. Se utilizaron 8 cepas de *Pseudomonas aeruginosa*, 2 ambientales, 5 nosocomiales y 1 cepa de referencia (ATCC 27853). Para estimular la producción de piocianina las cepas fueron incubadas por 7 días a 37°C en caldo P. La extracción de Piocianina se realizó por el método propuesto por Knight (1978) que constó de una extracción clorofórmica, seguida de una extracción con HCl. No se observó diferencias en el efecto de la piocianina de cepas nosocomiales y ambientales frente a *Staphylococcus aureus*, sin embargo sólo la piocianina de la cepa de muestra respiratorio mostró un leve efecto sobre *Escherichia coli*.

Palabras clave: *Pseudomonas aeruginosa*, Piocianina, Antibiótico

¹ Laboratorio de Microbiología. Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad Ricardo Palma. sanjusare@hotmail.com

SUMMARY

Pseudomonas aeruginosa is a Gramnegative bacteria, opportunistic pathogen of clinical importance as it causes lot of nosocomial diseases. Moreover this is a ubiquitous organism mainly due to its high capacity to metabolize variety of substrates. This bacterium has the ability to produce various extracellular pigments, one of them is an exotoxin pyocyanin belonging to the group of phenazines that has the capability of inhibiting the growth of competing organisms. 8 strains of *Pseudomonas aeruginosa*: 2 environmental, 5 nosocomial and one reference strain (ATCC 27853) were used. To stimulate the production of pyocyanin strains were incubated for 7 days at 37°C in P broth. The extraction was performed with the method proposed by Knight (1978) which consisted of a chloroform extraction, followed by extraction with HCl. No differences in the effect of nosocomial and environmental pyocyanin against *Staphylococcus aureus* strains was observed, however only pyocyanin strain of respiratory sample showed a slight effect on *Escherichia coli*.

Keywords: *Pseudomonas aeruginosa*, Pyocyanin Antibiotic.

INTRODUCCIÓN

Pseudomonas sp. es un género cosmopolita, este grupo es capaz de utilizar y metabolizar un amplio rango de sustratos, ya sean orgánicos o inorgánicos, por ello puede vivir bajo muy diversas condiciones, poseen también gran plasticidad génica (Ruiz L, 2007); encontrándose en suelos y aguas, tanto continentales como marinas (Baumann, L. *et al.* 1971), *Pseudomonas aeruginosa* es el patógeno más importante de este género, debido a que es un patógeno oportunista (Francis, K. y Brown, P.; 2012) siendo el más importante en humanos debido al número, tipo de infecciones y mortalidad asociadas (Ruiz, L. 2007), así mismo es también conocido por su capacidad de sintetizar diferentes pigmentos hidrosolubles extracelulares entre los que se destaca un pigmento verde fluorescente, pioverdina (Merino, L. 2007) que actúa como sideróforo en condiciones mínimas de Fe (III) y actúan como inhibidores del crecimiento de microorganismos patógenos en plantas (Bello, D. *et al.* 2006) y un pigmento azul, piocianina (Young, G. 1947), perteneciente a las fenazinas, soluble en cloroformo.

Se ha demostrado que este pigmento posee actividad antibacteriana (Merino, L, 2007), y que su producción es activada principalmente bajo efecto de *quorum sensing* (Williams, P. 2009).

El objetivo del presente trabajo es determinar la actividad antibacteriana del pigmento piocianina sobre una cepa de *Escherichia coli* y una cepa de *Staphylococcus aureus*.

MATERIALES Y MÉTODOS:

Obtención de Cepas de Pseudomonas

Se trabajó con 8 cepas de *Pseudomonas aeruginosa* (Tabla 1); 5 fueron aislamientos nosocomiales, 1 aislada a partir de eyecciones de paloma, 1 de un manantial ubicado en la costa verde, además de la cepa ATCC 27853 de *Pseudomonas aeruginosa*. Para la confirmación de las cepas se utilizaron pruebas bioquímicas que consistían en metabolismo de glucosa, degradación de citrato, motilidad, producción de Indol y producción de pigmentos.

Obtención de Pigmentos

Las ocho cepas aisladas fueron sembradas en 5 ml de caldo CASO por 18 horas a 37 ° C, luego se ajustó la turbidez del caldo hasta una OD de entre 0.10 y 0.08 a 625 nm; por último se tomó una alícuota de 1 ml y se sembró en 50 ml de caldo P, los cuales fueron incubados por 7 días a 37°C, agitándose manualmente dos veces al día para favorecer la oxigenación del medio.

Extracción de Piocianina

Transcurridos los 7 días se tomaron muestras de 10 ml de Caldo P, se centrifugaron a 3000 rpm por 10 minutos y se transfirió el sobrenadante a un tubo limpio; se realizó una primera extracción con cloroformo seguido de una extracción con HCl 0.2N. La fase ácida fue neutralizada con NaOH 0.2N hasta observar el cambio de coloración. Una vez más se realizó la extracción clorofórmica y a partir de esta se cargaron discos de 6 mm de papel filtro Whatman N° 42 con 10 ul del extracto.

Prueba de Sensibilidad

Para esta prueba se utilizó una cepa de *Escherichia coli* ATCC 25922 y una cepa de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. Se ajustó la turbidez del caldo CASO, donde fueron previamente inoculadas, entre 0.10 y 0.08 de OD a 625 nm. Cada extracto fue probado por triplicado en placas con agar Muller Hinton, como control positivo se utilizó discos de gentamicina.

ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

Se realizó la prueba de ANOVA para determinar diferencias significativas entre los efectos inhibitorios de los extractos de piocianina de las diferentes cepas utilizadas.

RESULTADOS

No se observó diferencias significativas entre los halos de inhibición del extracto de piocianina frente a la cepa de *Staphylococcus aureus* (Tabla 2). Sólo la piocianina de la cepa aislada de muestra respiratorio (Tabla 1) mostró un leve efecto inhibitoria sobre *Escherichia coli*.

DISCUSIONES:

Stephen et al (1981) realizan un ensayo similar con piocianina donde una cantidad de 2.5 ug por disco resulta en un halo de inhibición de 17 mm para *Staphylococcus aureus*. Un resultado similar se evidencia en la cepa G la cual también mostró halo de inhibición frente a *Staphylococcus aureus* esto sugiere que las concentraciones obtenidas pueden haber sido inferiores en los otros casos a los 2.5 ug por disco.

Baron y Rowe (1981) encuentran que la actividad antibacteriana de *Pseudomonas aeruginosa* no se manifiesta frente a cepas como *Proteus vulgaris*, *Enterobacter aerogenes* otras *Pseudomonas* ni frente a *Eschehrichia coli*; sin embargo otros autores como Young G (1947) y Nowroozi et al (2012) han determinado que la Piocianina sí tiene efecto contra *Escherichia coli* e incluso Nowroozi *et al.* (2011) menciona que las nanopartículas de plata tienen un efecto sinérgico inhibitorio tanto

en *Escherichia coli* como en *Staphylococcus aureus*. En este trabajo se utilizan discos cargados con 2 ug, nuestro trabajo también reportó efecto inhibitorio sobre *E. coli*, esto demuestra que al parecer el efecto de antibacteriano de la piocianina es dependiente de la concentración y se necesita mayores concentraciones para inhibir el crecimiento de bacterias gramnegativas.

Esto se confirma con el trabajo de Knight *et al.* (1978) que utilizando el método de pocillos en agar, una metodología conocida por ser más directa que los discos de difusión, reportan efecto inhibitorio de la piocianina sobre *Proteus morganii* sugiriendo que altas concentraciones del pigmento no permiten el desarrollo bacteriano.

Por último, de manera muy interesante ninguno de los trabajos mencionados anteriormente reportaron un efecto inhibitorio de la piocianina sobre cepas de *Pseudomonas* sugiriendo la existencia de un mecanismo que contrarreste la acción de la piocianina.

CONCLUSIONES:

La cepa de *Staphylococcus aureus* se mostró sensible frente al extracto de piocianina de todas las cepas obtenidas de *Pseudomonas aeruginosa*, por el contrario *Escherichia coli* se mostró sensible solo frente al extracto de piocianina producido por la muestra G, aislada de HNGAI.

Estudios bibliográficos no muestran efecto inhibitorio de la Piocianina sobre *Pseudomonas aeruginosa* lo que sugiere un mecanismo de protección frente al efecto de este pigmento.

REFERENCIAS:

- Baron, S. y Rowe, J. 1981. Antibiotic action of Pyocyanin. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 20(6): 814-820.
- Baumann, L; Baumann, P; Mandel, M. y Allen, R. 1972. Taxonomy of aerobic marine eubacteria. *Journal of Bacteriology*. 1972; 110(1): 402-429.

- Bello, D; Santo, J; Díaz, M; Bell, A; Torres, E. y Villa, P. 2006. *Purificación parcial del pioverdin a partir de caldos de fermentación de Pseudomonas aureginosa PSS ICIDCA*. 11(1): 36-39.
- Francis, K. y Brown P. 2012. Diversity of antimicrobial resistance and virulence determinants in *Pseudomonas aeruginosa* associated with fresh vegetables. *International Journal of Food Microbiology*. 426241. Doi:10.1155/2012/426241.
- Knight, M; Hartman, P; Hartman, Z. y Young, V. 1978. A new Method of Preparation of Pyocyanin and Demonstration of an Unusual Bacterial Sensivity. *Analytical Biochemistry*. 95(1): 19-23.
- Merino L. 2007. *Pseudomonasaureginosa: Una bacteria con personalidades múltiples*. *Revista Argentina de Microbiología*. 39:143.
- Nowroozi, J; Sepahi, A. y Rashnonejad A. 2012. Pyocyanine Biosynthetic genes in Clinical and Environmental Isolates of *Pseudomonas aeruginosa* and Detection of Pyocyanine's Antimicrobial Effects with or without Colloidal Silver Nanoparticles. *Cell Journal*. 14(1): 7-18.
- Ruiz, L. 2007. *Pseudomonas aureginosa: Aportación al conocimiento de su estructura y al de los mecanismos que contribuyen a su resistencia a los antimicrobianos*. Tesis Doctoral. Barcelona – España. *Universidad de Barcelona*. 180 pp.
- Williams, P. y Cámara, M. 2009. Quorum sensing and environmental adaptation in *Pseudomonas aeruginosa*: a tale of regulatory networks and multifunctional signal molecules. *Current Opinion in Microbiology*. 12(2): 182-191.
- Young, G. 1947, Pigment production and antibiotic activity in cultures of *Pseudomonas aeruginosa*. *Universidad de Boston, Massachusetts*. 54: 109-117.

Tabla 1. Cepas utilizadas de *Pseudomonasa eruginosa*

Código	Origen	Descripción
A	A	Aislamiento de eyecciones de palomas
B	A	Manantial de la Costa Verde en Playa La Estrella
C	N	Aislamiento del Hospital Grau
D	N	Heridas epiteliales aislada en el HNGAI
E	N	Heridas epiteliales aislada en el HNGAI
F	N	Heridas epiteliales aislada en el HNGAI
G	N	Muestra respiratoria aislada en el HNGAI
ATCC 27853	-----	Donación del aisladas en el HNGAI

N= Nosocomial, A=Ambiental. HNGAI= Hospital Nacional Guillermo Almenara Irigoyen

Tabla 2. Mediciones de halos de Inhibición de Piocianina frente a *E. coli* y *S. aureus*

Código	<i>Escherichia coli</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
A	-	15.79
B	-	16.02
C	-	18.00
D	-	15.13
E	-	14.37
F	-	16.00
G	8.61	16,70
ATCC 27853	-	14.07
Gentamicina	21.30	21.30

*Los resultados mostrados son la media de tres ensayos expresados en mm.