

## Identificación de péptidos antimicrobianos a partir de *Enterococcus faecium* IP5-2a aislado del intestino de tilapia mediante espectrometría de masas

Identification of antimicrobial peptides from *Enterococcus faecium* IP5-2a isolated from tilapia gut using mass spectrometry

Arnaldo E. Castañeda<sup>1,2,3\*</sup>, Manuel Feria Zevallos<sup>1,2,3</sup>, Adrian E. Zatan<sup>1,2,3</sup>, Odalis E. Toledo<sup>1,2,3</sup>, Jorge L. Aguilar<sup>1,2,3</sup>, Pedro Masías<sup>1</sup>, Virna Cedeño<sup>1,4</sup>, Benoit Diringer<sup>1,2</sup>

### RESUMEN

Los péptidos antimicrobianos son moléculas pequeñas que poseen una fuerte actividad antagonista frente a microorganismos patógenos y son sintetizados por una amplia variedad de organismos, entre ellos, bacterias probióticas. El objetivo del estudio fue identificar péptidos con actividad antimicrobiana en la cepa *Enterococcus faecium* IP5-2a previamente aislada del tracto intestinal de tilapia del Nilo. Se realizó extracción de proteínas celulares y extracelulares, electroforesis en gel SDS-PAGE 1D y espectrometría de masas MALDI-TOF/TOF. Los resultados mostraron péptidos con actividad antimicrobiana, entre ellos la proteína P54 (SagA), una proteína similar a bacteriocina y un lantibiótico. Estas proteínas juegan un rol importante en la capacidad antagonista de la cepa *E. faecium* IP52a, permitiendo considerarla como un potencial probiótico en la industria acuícola.

**Palabras clave:** péptidos bioactivos, probióticos, bacteria ácido láctico, MALDI-TOF/TOF

<sup>1</sup> Inca Biotec S.A.C, Tumbes, Perú

<sup>2</sup> Facultad de Ingeniería Pesquera y Ciencias del Mar, Universidad Nacional de Tumbes, Tumbes, Perú

<sup>3</sup> Pezbiotec S.A.C, Piura, Perú

<sup>4</sup> Concepto Azul, Guayaquil, Ecuador

\* E-mail: [arnaldoc.ve@gmail.com](mailto:arnaldoc.ve@gmail.com)

Recibido: 16 de junio de 2023

Aceptado para publicación: 26 de enero de 2024

Publicado: 29 de febrero de 2024

©Los autores. Este artículo es publicado por la Rev Inv Vet Perú de la Facultad de Medicina Veterinaria, Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Este es un artículo de acceso abierto, distribuido bajo los términos de la licencia Creative Commons Atribución 4.0 Internacional (CC BY 4.0) [<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/deed.es>] que permite el uso, distribución y reproducción en cualquier medio, siempre que la obra original sea debidamente citada de su fuente original

## ABSTRACT

Antimicrobial peptides are small molecules that exhibit strong antagonistic activity against pathogenic microorganisms and are synthesized by a wide variety of organisms, including probiotic bacteria. The aim of the study was to identify peptides with antimicrobial activity in the *Enterococcus faecium* IP5-2a strain previously isolated from the intestinal tract of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). Cellular and extracellular proteins extraction was performed, followed by 1D SDS-PAGE gel electrophoresis and MALDI-TOF/TOF mass spectrometry. The results revealed peptides with antimicrobial activity, including P54 (SagA) protein, a bacteriocin-like protein and a lantibiotic. These proteins play an important role in the antagonistic capacity of the *E. faecium* IP52a strain, allowing it to be considered as a potential probiotic in the aquaculture industry.

**Key words:** bioactive peptides, probiotics, lactic acid bacteria, MALDI-TOF/TOF

## INTRODUCCIÓN

El uso de antibióticos ha sido útil para el control de infecciones bacterianas en el cultivo de peces; sin embargo, producen un impacto negativo en la conformación de la microbiota y la morfología intestinal (Shi *et al.*, 2022). Además, su uso inadecuado supone un riesgo a la salud pública debido a su persistencia en productos alimenticios de origen acuícola, el cual conduce al desarrollo de resistencia antimicrobiana y contaminación ambiental (De *et al.*, 2014; Hasan *et al.*, 2022).

Una de las alternativas para reducir la dependencia al uso de antibióticos son los probióticos, que en su mayoría son bacterias ácido-lácticas (BAL) (Zorriehzaha *et al.*, 2016). Los mecanismos de acción incluyen la competencia por nutrientes, contribución a la digestión, la regulación positiva de la respuesta inmunológica del huésped y la exclusión competitiva (El-Saadony *et al.*, 2021). Esta última hace referencia a la producción de péptidos antimicrobianos (AMPs) capaces de hacer frente a otras bacterias manteniendo una microbiota balanceada (Oulas *et al.*, 2021).

El género *Enterococcus* forma parte del grupo de las BAL y contiene 36 especies. Además, forma parte de la microbiota gastrointestinal de animales y algunas de estas son capaces de producir AMPs, motivo por el cual son ampliamente utilizados en la actividad acuícola (Ness *et al.*, 2014; Cui *et al.*, 2017). Los AMPs actúan sobre la membrana celular, generando su disrupción y posterior lisis, pudiendo además ingresar a la célula y unirse a los ácidos nucleicos y proteínas cruciales para el correcto funcionamiento celular (Benfield y Henriques, 2020).

Para la identificación de los AMPs se utilizan diversas técnicas, entre ellas, la espectrometría de masas (MS) que se caracteriza por su alta rapidez y confiabilidad (Girolamo *et al.*, 2013). Por otro lado, la técnica de ionización/desorción láser asistida por matriz con detección de masas por tiempo de vuelo (MALDI-TOF) se ha utilizado para caracterizar péptidos de diferente origen como microalgas (Guzmán *et al.*, 2019), mucus de peces (Okella *et al.*, 2021) y bacterias potencialmente probióticas (Feria Zevallos *et al.*, 2019). Ante esto, el presente estudio tuvo como objetivo identificar péptidos de interés antimicrobiano a partir de la cepa *Enterococcus faecium* IP5-2a aislada de la microbiota de tilapia del Nilo mediante espectrometría de masas MALDI-TOF/TOF.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Para la extracción de proteínas celulares se cultivó la cepa *E. faecium* IP2a previamente aislada (Castañeda *et al.*, 2018) en caldo Man Rogosa Sharpe (MRS) a 28 °C durante 24 h. Se centrifugó a 10 000 rpm durante 10 min, al pellet se le agregó 100 µl de buffer de lisis (1 ml de buffer nativo, 10 µl de lizosima y 1 µl benzonasa/nucleasa), se sometió a ultrasonido por 5 min y se incubó a -20 °C durante 30 min. Finalmente se centrifugó a 14 000 g y se recuperó 20 µl del sobrenadante.

Para la extracción de proteínas extracelulares, la cepa *E. faecium* se cultivó en caldo MRS, se centrifugó a 3500 rpm a 4 °C durante 10 min, el sobrenadante fue pasado por filtros de membrana de 0.22 µm. Posteriormente se agregó 10% de ácido trifluoroacético (TFA) y 1 mM de fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF), dejándose precipitar a -20 °C por 8 h. El sobrenadante libre de células se centrifugó a 3500 rpm a 4 °C por 30 min, el pellet obtenido se lavó dos veces con acetona helada y se rehidrató en buffer con 5 M de urea, 2 M thiourea, 2% CHAPS, 40 mM Tris-HCl pH 8.5, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 65 mM DTT, 1 mM PMSF.

Las proteínas extraídas se migraron por electroforesis en gel SDS-PAGE 1D (12%) a 90 V por 2 h. Posteriormente, las bandas de proteínas fueron coloreadas con azul de Coomassie y observadas en un transiluminador de luz blanca. Luego fueron escindidas del gel y colocadas en 100 µl de bicarbonato de amonio 100 mM/acetoni-trilo (v:v). Los procesos de decoloración y digestión se realizaron siguiendo el protocolo de Shevchenko *et al.* (2007). Finalmente, las muestras fueron depositadas en la placa OPTI-TOF para su análisis por espectrometría de masas.

El análisis de proteínas se realizó mediante un espectrómetro de masas MALDI AB SCIEX TOF/TOF™ 5800 (AB Sciex) y

los espectros captados en modo MS/MS Reflector Positive con un Láser Nd:YAG de  $\lambda$  335 nm, frecuencia 200 Hz. El análisis de datos se realizó mediante el software ProteinPilot™, basado en el algoritmo Paragon™ 4.5.0.0 (Matrix Science, Boston, USA) y considerando las condiciones de alquilación con yodoacetamida y la digestión con tripsina. Los péptidos obtenidos del procesamiento por doble fragmentación (MS/MS) fueron analizados en función a sus características de longitud, porcentaje de confianza y valor de expectación en el software ProteinBLAST y ProteinPilot.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados del estudio muestran secuencias de aminoácidos de la cepa *Enterococcus faecium* IP5-2a relacionadas con péptidos antimicrobianos (Cuadro 1). En coincidencia con Choisoongnern *et al.* (2021), se mostró la capacidad de la bacteria ácido-láctica *E. faecium* para producir AMPs incluyendo proteínas que participan en su síntesis.

Se identificaron secuencias de aminoácidos con 99 y 100% de identidad con la proteína SagA (P54 para *E. faecium*) por el software ProteinPilot y Protein BLAST, respectivamente (Cuadro 1). Así mismo, de los 509 aminoácidos que conforman dicha proteína, se identificaron 36 aminoácidos divididos en dos secuencias que representan el 7% del total (Figura 1A). De manera similar, Roy *et al.* (2015) lograron identificar el 30% de aminoácidos de la proteína P54 mediante LC-MS/MS en *E. faecium*. Por su parte, Paganelli *et al.* (2015) la determinaron como la proteína más abundante en el sobrenadante de *E. faecium* formador biofilm. Esta proteína pertenece a la familia NlpC/60 y está relacionada a la pared celular de *E. faecium*, tiene la capacidad de hidrolizar la pared celular, inhibir la expresión de genes de virulencia de patógenos, modular indirectamente la microbiota intestinal, así como mejorar la función de barrera e inmunidad intestinal (Roy *et al.*, 2015; Kim *et al.*, 2019).

Cuadro 1. Secuencias de aminoácidos identificadas por MALDI-TOF/TOF de la cepa *Enterococcus faecium* IP5-2a

Prec MW	Mejor secuencia	Proteína	Plataforma	Identidad (%)
2793.38	EAQVSNTSSNYIDAVLNADSLADAIGR	Protein P54	Protein Pilot	99.0
1097.53	YVYLQVTGR	Protein P54	NCBI Blast	99.0
2793.38	NATENQIFVETVSDQELEMLIGGAGR	Lantibiotic	NCBI Blast	99.0
2192.24	MNLYVNMRSAWKAIKNNR	ABC transporter permease	NCBI Blast	100.0
2715.16	QIHSVLSKDAYVQTHSEGDEPYR	RNA-binding protein Jag	NCBI Blast	100.0
1674.93	LNNFSQLSGGEQQR	ABC transporter, ATP-binding protein	NCBI Blast	100.0
2715.21	LFATDPMKMITNIMPAPIIYR	ABC transporter permease	NCBI Blast	78.0
2793.42	PETKNPEALLNRLVNYIRSVLAGR	bacteriocin immunity protein	NCBI Blast	77.0
2715.21	VYITTPPTAMETVVAKTEDIIYR	RNase J family beta-CASP ribonuclease	NCBI Blast	100.0



Figura 1. Análisis bioinformático de secuencias de aminoácidos identificadas. A: Secuencias identificadas (en rojo) que hacen «match» con la secuencia de aminoácidos de la proteína P54; B: estructura tridimensional del dominio hidrolasa de peptidoglucano de la proteína SagA (P54) (morado) y en amarillo la región de residuos de aminoácidos que hacen «match» con la secuencia de aminoácidos de la proteína SagA (P54)

Una segunda secuencia tuvo un 77% de identidad con una proteína similar a bacteriocina (BLPs) (Cuadro 1). Estas contribuyen a la funcionalidad de los probióticos de tres maneras, como péptidos colonizadores que facilitan la competición bacteriana, péptidos de destrucción que eliminan patógenos de manera directa y péptidos de

señalización a través de otras bacterias o del sistema inmune (Dobson *et al.*, 2012). Además, se identificó una tercera secuencia como lantibiótico con una identidad del 99% (Cuadro 1). Sawa *et al.* (2012) aislaron y caracterizaron un lantibiótico (enterocin W) con gran actividad inhibitoria producido por *E. faecalis*, sugiriendo su utilidad en diferentes industrias.

Se identificó una secuencia perteneciente a RNAase J family beta-CASP ribonuclease con una identidad del 100%, similar a los reportados por Sánchez *et al.* (2017), quienes la identificaron en el sobrenadante de BAL aisladas del sistema digestivo de lechón, Estos autores la describieron como un péptido con acción enzimática frente a bacterias patógenas; sin embargo, Bugrysheva y Scott (2010) la describen como una endo y exo ribonucleasa con participación en la degradación y regulación del ARN mensajero (ARNm) y como componente esencial para el crecimiento de las bacterias.

Por lo tanto, se concluye que las secuencias de aminoácidos detectadas por MALDI TOF/TOF de la cepa *Enterococcus faecium* IP5-2a son altamente homólogas a proteínas con capacidad antagónica resaltando la proteína SagA (P54) y bacteriocinas, sugiriendo su uso como potencial probiótico en la acuicultura.

### Agradecimiento

Los autores agradecen al Programa de Maestría en Biotecnología Molecular de la Universidad Nacional de Tumbes (código 000190-2015-Fondecyt).

### LITERATURA CITADA

1. **Benfield AH, Henriques ST. 2020.** Mode-of-action of antimicrobial peptides: membrane disruption vs intracellular mechanisms. *Front Med Technol* 2: 610097. doi: 10.3389/fmedt.2020.610997
2. **Bugrysheva JV, Scott JR. 2010.** The ribonucleases J1 and J2 are essential for growth and have independent roles in mRNA decay in *Streptococcus pyogenes*. *Mol Microbiol* 75: 731-743. doi: 10.1111/j.1365-2958.2009.07012.x
3. **Castañeda AE, Aguilar JL, Zátán AE, Toledo OE, Feria Zevallos MA, Castillo D. 2018.** Identificación molecular de bacterias ácido lácticas con propiedades probióticas aisladas del intestino posterior de tilapia del Nilo (*Oreochromis niloticus*). *Rev Investig Altoandin* 20: 429-438. doi: 10.18271/ria.2018.420
4. **Choeisoongnern T, Sirilun S, Waditee-Sirisattha R, Pintha K, Peerajan S, Chaiyasut C. 2021.** Potential probiotic *Enterococcus faecium* OV3-6 and its bioactive peptide as alternative bio-preservation. *Foods* 10: 2264. doi: 10.3390/foods10102264
5. **Cui J, Xiao M, Liu M, Wang Z, Liu F, Guo L, Huang S. 2017.** Coupling metagenomics with cultivation to select host specific probiotic microorganisms for subtropical aquaculture. *J Appl Microbiol* 123: 1274-1285. doi:10.1111/jam.13555
6. **De BC, Meena DK, Behera BK, Das P, Mohapatra PD, Sharma AP. 2014.** Probiotics in fish and shellfish culture: immunomodulatory and ecophysiological responses. *Fish Physiol Biochem* 40: 921-971. doi: 0.1007/s10695-013-9897-0
7. **Dobson A, Cotter PD, Ross RP, Hill C. 2012.** Bacteriocin production: a probiotic trait. *Appl Environ Microb* 78: 1-6. doi: 10.1128/AEM.05576-11
8. **El-Saadony MT, Alagawany M, Patra AK, Kar I, Tiwari R, Dawood MAO, Dhama K, Abdel-Latif HMR. 2021.** The functionality of probiotics in aquaculture: An overview. *Fish Shellfish Immun* 117: 36-52. doi: 10.1016/j.fsi.2021.07.007
9. **Feria Zevallos MA, Castañeda A, Toledo O, Caballero D, Cueva M, Cedeño V. 2019.** Caracterización molecular ómica de una cepa de *Bacillus amyoliquefaciens* aislada de la microbiota del paiche *Arapaima gigas* con actividad antagonista contra bacterias patógenas de peces. *Rev Inv Vet Perú* 32: 908-22. doi: 10.15381/rivep.v30i2.-15407
10. **Girolamo FD, Lante I, Muraca M, Putignani L. 2013.** The role of mass spectrometry in the «omics» era. *Curr Org Chem* 17: 2891-2905. doi: 10.2174/1385272817888131118162725

11. **Guzmán F, Wong G, Román T, Cárdenas C, Álvarez C, Schimitt P, Alberico F, Rojas V. 2019.** Identification of antimicrobial peptides from microalgae *Tetraselmis suecica* (Kylin) butcher and bactericidal activity improvement. *Mar Drugs* 17: 453. doi: 10.3390/md17080453
12. **Hasan MM, Rafiq K, Ferdous MRA, Hossain MT, Ripa AP, Haque SM. 2022.** Screening of antibiotic residue in transported live fish and water collected from different fish markets in Mymensingh district of Bangladesh. *J Adv Vet Anim Res* 9: 104-112. doi: 10.5455/javar.2022.i574
13. **Kim B, Wang YC, Hespen CW, Espinosa J, Salje J, Rangan KJ, Oren DA, et al. 2019.** *Enterococcus faecium* secreted antigen A generates muropeptides to enhance host immunity and limit bacterial pathogenesis. *eLife* 8: e45343. doi: 10.7554/eLife.45343
14. **Ness IF, Diep DB, Ike Y. 2014.** Enterococcal bacteriocins and antimicrobial proteins that contribute to niche control. En: Gilmore MS, Clewell DB, Ike Y, Shankar N (eds). *Enterococci: from commensals to leading causes of drug resistant infection*. Boston, USA. [Internet]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK190428/>
15. **Okella H, Ikiriza H, Ochwo S, Ajayi CO, Ndekezi C, Nkamwesiga J, Kaggwa B, et al. 2021.** Identification of antimicrobial peptides isolated from the skin mucus of African catfish, *Clarias gariepinus* (Burchell, 1822). *Front Microbiol* 12: 794631. doi: 10.3389/fmicb.2021.794631
16. **Oulas A, Zachariou M, Chasapis CT, Tomazou M, Ijaz UZ, Schmartz GP, Spyrou GM, et al. 2021.** Putative antimicrobial peptides within bacterial proteomes affect bacterial predominance: a network analysis perspective. *Front Microbiol* 12: 752674. doi: 10.3389/fmicb.2021.752674
17. **Paganelli FL, de Been M, Braat JC, Hoogenboezem T, Vink C, Bayjanov J, Leavis HL. 2015.** Distinct SagA from hospital-associated clade A1 *Enterococcus faecium* strains contributes to biofilm formation. *Appl Environ Microb* 81: 6873-6882. doi: 10.1128/AEM.01716-15
18. **Roy U, Chalasani AG, Shekh MR. 2015.** The anti-Candida activity by ancillary proteins of an *Enterococcus faecium* strain. *Front Microbiol* 6: 339. doi: 10.3389/fmicb.2015.00339
19. **Sánchez Suárez H, Ochoa Mogollón G, Rojas Mogollón C, Peralta Ortiz T, Ordinola Zapata A. 2017.** Aislamiento de péptidos inhibidores de bacterias a partir de bacterias ácido lácticas del tracto digestivo del lechón e identificación mediante prueba proteómica. *Sci Agropecu* 8: 437-443. doi: 10.17268/sci.agropecu.2017.04.15
20. **Sawa N, Wilaipun P, Kinoshita S, Zendo T, Leelawatcharamas V, Nakayama J, Sonomoto K. 2012.** Isolation and characterization of enterocin W, a novel, two-peptide lantibiotic produced by *Enterococcus faecalis* NKR-4-1. *Appl Environ Microbiol* 78: 900-903. doi: 10.1128/AEM.06497-11.
21. **Shevchenko A, Tomas H, Havli J, Olsen JV, Mann M. 2007.** In-gel digestion for mass spectrometric characterization of proteins and proteomes. *Nat Protoc* 1: 2856-2860. doi:10.1038/nprot.2006.468
22. **Shi F, Huang Y, Yang M, Lu Z, Li Y, Zhan F, Lin L, Qin Z. 2022.** Antibiotic-induced alternations in gut microflora are associated with the suppression of immunerelated pathways in grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*). *Front Immunol* 13: 970125. doi: 10.3389/fimmu.2022.970125
23. **Zorriehzahra MJ, Delshad ST, Adel M, Tiwari R, Karthik K, Dhama K, Lazado CC. 2016.** Probiotics as beneficial microbes in aquaculture: an update on their multiple modes of action: a review. *Vet Quart* 36: 228-241. doi: 10.1080/01652176.2016.1172132