

Higiene y Sanidad Ambiental, **19** (4): 1791-1797 (2019)

Pruebas bioguiadas para la detección de actividad antimicrobiana y antibiofilm en sustancias extraídas de algas marinas en la costa de Ceará (Brasil)

BIOGUIDED TESTS FOR THE DETECTION OF ANTIMICROBIAL AND ANTIBIOFILM ACTIVITY IN SUBSTANCES EXTRACTED FROM SEAWEED ON THE COAST OF CEARÁ (BRAZIL)

Yasmin GIRÃO FERREIRA, Marina T. TORRES, Jade OLIVEIRA ABREU, Fátima Cristiane TELES DE CARVALHO, Oscarina VIANA DE SOUSA

Laboratorio de Microbiología Ambiental y do Pescado (LAMAP). Instituto de Ciências do Mar (LABOMAR), Universidade Federal do Ceará (UFC). Avenida Abolição No. 3207, Meireles – CEP: 60165-08, Fortaleza, Ceará, Brasil.

Correspondencia: Marina T. Torres. Correo-e: marinatorresrodriguez@gmail.com

RESUMEN

Productos naturales de origen marino como los extractos de macroalgas, contienen sustancias que presentan acción antimicrobiana y antibiofilm frente a patógenos de interés. Este trabajo tuvo como objetivo principal investigar la bioactividad de extractos de algas frente a bacterias del género *Enterococcus* con perfil de multirresistencia a antimicrobianos y su acción inhibitoria sobre la formación de biofilm y actividad antibacteriana. Fueron probados los extractos acuosos, acetónicos y metanólicos de las algas: *Dictyota menstrualis* (alga parda), *Hypnea pseudomusciformis* (alga roja) y *Ulva fasciata* (alga verde). Algunos extractos en determinadas concentraciones fueron capaces de inhibir el crecimiento bacteriano de las estirpes evaluadas. El extracto acuoso de *H. pseudomusciformis* presentó la mayor eficiencia de actividad antimicrobiana. Todos los extractos presentaron capacidad de inhibir la formación de biofilm de la estirpe bacteriana evaluada, resultando el extracto acetónico de la alga *H. pseudomusciformis* el único que presentó inhibición del biofilm en la menor concentración evaluada (100 µg/mL). Fue verificado el potencial que los extractos de algas presentan como fuente de nuevas sustancias antimicrobianas y antibiofilm para su uso en la clínica humana y animal contra bacterias del género *Enterococcus* multirresistentes a antimicrobianos de uso comercial.

Palabras clave: *Enterococcus*, bioactividad, adherencia, solvente, exopolisacárido.

ABSTRACT

Natural products of marine origin, such as macroalgae extracts, contain substances that have antimicrobial and antibiotic action against pathogens of interest. The main objective of this work was to investigate the bioactivity of algae extracts against bacteria of the *Enterococcus* genus with a multimicrobial resistance profile and its inhibitory action on biofilm formation and antibacterial activity. The aqueous, acetonic and methanolic extracts of the algae were tested: *Dictyota menstrualis* (brown algae), *Hypnea pseudomusciformis* (red algae) and *Ulva fasciata* (green algae). Some extracts in certain concentrations were able to inhibit the bacterial growth of the evaluated strains. The aqueous extract of *H. pseudomusciformis* showed the highest efficiency of antimicrobial activity. All extracts showed the ability to inhibit the biofilm formation of the bacterial strain evaluated, resulting in the acetonic extract of the *H. pseudomusciformis* algae, the only one that presented biofilm inhibition at the lowest concentration evaluated (100 µg / mL). The potential that algae extracts present as a source of new antimicrobial and antibiofilm substances for use in the human and animal clinic against bacteria of the *Enterococcus* genus multiresistant to commercial antimicrobials was verified.

Keywords: *Enterococcus*, bioactivity, adherence, solvent, exopolysaccharide.

INTRODUCCIÓN

Una de las formas de extraer valor económico de la biodiversidad es la búsqueda sistemática por organismos, genes, enzimas, compuestos y procesos que puedan eventualmente llevar al desarrollo de un producto. En esa búsqueda, la etapa de estandarización y organización de organismos indicadores es fundamental para generar resultados confiables y comparables. Investigaciones en esa área contribuyen a la prospección de nuevos fármacos antibacterianos, pudiendo por tanto contribuir a la mitigación del impacto generado por la emergencia de bacterias resistentes a los antimicrobianos.

El uso indiscriminado de drogas antimicrobianas resulta en la selección de bacterias que pueden predominar en una población y desarrollar nuevas estrategias para evitar la acción de esas sustancias, como en el caso de la transferencia de material genético a bacterias susceptibles tornándolas en resistentes (Águila-Ramírez *et al.*, 2012; Vaz, 2009). Esos eventos resultan en impactos sociales, económicos y ambientales.

El incremento en la incidencia de la resistencia bacteriana a los antimicrobianos viene instigando la búsqueda de sustancias químicas que sean eficientes en la inhibición del crecimiento de microorganismos patogénicos para los humanos y los animales (Mayer *et al.*, 2011). La utilización de los compuestos naturales como fuentes alternativas al empleo de antimicrobianos sintéticos viene siendo relatada, y algunos vegetales han sido blanco de investigación (Peixoto *et al.*, 2011; Vieira *et al.*, 2010; Ao *et al.*, 2008; Nair y Chanda, 2007). Ante la necesidad de desarrollo de nuevas alternativas para el uso de antimicrobianos sintéticos, el potencial de compuestos bioactivos procedentes de algas marinas viene ganando importancia (Lima-Filho *et al.*, 2002; Vieira y Noronha, 1971). Las algas marinas han sido objeto de varios estudios debido a su capacidad de producir metabolitos secundarios con gran actividad biológica (Bansemir *et al.*, 2006). Otros estudios sugieren que los compuestos bioactivos presentan actividad farmacológica, anticancerígena, antiviral y antimicrobiana, entre otras actividades (Pérez *et al.*, 2016).

La capacidad antibiofilm de extractos de macro y microalgas contra patógenos de interés ha sido estudiada por diferentes autores (Gayatri *et al.*, 2019; Gadhi *et al.*, 2018; Jafari *et al.*, 2018; Buseti *et al.*, 2015).

Diferentes estudios relatan la eficiencia antibacteriana de macroalgas marinas en bacterias Gram positivas y Gram negativas (Rizzo *et al.*, 2017; Troncoso *et al.*, 2015; Goeck *et al.*, 2012; Rios *et al.*, 2009). Tomando en cuenta lo anteriormente expuesto, el objetivo de este trabajo fue investigar la acción inhibitoria de extractos de algas marinas sobre la actividad microbiana y la formación de biofilm por bacterias del género *Enterococcus*. Actualmente, ese

género presenta, según la colección germánica de microorganismos (DSMZ), 59 especies conocidas incluyendo dos subespecies pertenecientes al género (DSMZ, 2018).

MATERIAL Y MÉTODOS

Origen de los extractos de algas

Los extractos utilizados en este trabajo hacen parte del acervo del Laboratorio de Microbiología Ambiental y del Pescado (LAMAP), del Instituto de Ciencias del Mar (LABOMAR) de la Universidad Federal de Ceará (UFC-CE). Las algas fueron colectadas en bancos naturales durante la marea de zizigia en la playa de Pacheco, en el municipio de Caucaia-CE, en Agosto de 2017.

Fueron utilizados extractos orgánicos (acetona, metanol y agua), de las siguientes especies de algas: *Ulva fasciata* (Uf), *Hypnea pseudomusciformis* (Hp) e *Dictyota menstrualis* (Dm).

Origen de las estirpes bacterianas

Fueron evaluadas 44 estirpes bacterianas del género *Enterococcus* con resistencia a diferentes familias de antimicrobianos de uso en la clínica y en la veterinaria. Estas estirpes forman parte de la bacterioteca del Laboratorio de Microbiología Ambiental y del Pescado (LAMAP), del Instituto de Ciencias del Mar (LABOMAR) de la UFC. Las estirpes bacterianas fueron aisladas de galerías pluviales (Galería Riacho Maceió y Galería frente a la playa de Meireles) y puntos de mar adyacentes en la costa de la ciudad de Fortaleza.

Pureza de las estirpes

Las estirpes de *Enterococcus* fueron inicialmente inoculadas en tubos de ensayo con caldo Brain Heart Infusion (BHI, Difco) e incubadas en estufa bacteriológica a 35°C/24h. Después de este período, fue verificado el crecimiento bacteriano de acuerdo con la turbidez de los tubos. La ausencia de crecimiento fue indicada por la transparencia del medio.

Los tubos que tuvieron crecimiento bacteriano fueron inoculados y estriados en placas de Agar m-*Enterococcus* (medio selectivo - Difco) e incubadas en estufa bacteriológica a 35°C/48h. Después de este periodo, colonias características del género *Enterococcus* fueron seleccionadas e inoculadas en medio Agar Brain Heart Infusion (Agar BHI, Difco) para su posterior verificación de pureza mediante la técnica de coloración de Gram.

Formación de exopolisacárido (EPS)

Las estirpes fueron inoculadas en placas de Agar Rojo Congo e incubadas en estufa bacteriológica a 35°C/48h. Después de ese período de incubación se realizó la lectura de las placas. Fue considerado un resultado positivo cuando fue observada una

coloración prieta en el área de crecimiento. La ausencia de coloración fue considerada un resultado negativo para la formación de EPS. Como control positivo fue utilizada una estirpe del género *Pseudomonas* disponible en la bacterioteca del LAMAP y aislada de una industria de procesamiento de pescado.

El medio de cultivo Agar Rojo Congo fue preparado con 0,8 g del colorante Rojo Congo (SIGMA) para 1L de Agar Brain Heart Infusion (BHI, Difco) con adición de 36 g de sacarosa. La incubación fue realizada primero a 35 °C por 24 h seguida de una incubación a temperatura ambiente por 48 h. Esta prueba fue realizada siguiendo la metodología descrita por Freeman *et al.* (1989) con adaptaciones.

Prueba de adherencia en microplacas de poliestireno

Las estirpes que presentaron un resultado positivo en la prueba de formación de exopolisacárido fueron inoculadas en tubos de ensayo conteniendo caldo BHI (Difco) e inmediatamente incubadas en estufa bacteriológica a 35°C/48h después de ese periodo, 200 µl de células en suspensión fueron inoculadas en microplacas de poliestireno estériles con 96 pozos e incubadas en estufa por 46h.

Posteriormente el inóculo fue retirado y los pozos fueron lavados tres veces con agua destilada seguido de un proceso de secado en estufa bacteriológica a 60°C/1h. Enseguida, los pozos fueron coloreados con una solución de cristal violeta al 1% por un minuto. Fueron realizados lavados sucesivos con agua destilada de los pozos de la microplaca y colocadas para secar a temperatura ambiente.

Fue considerado un resultado positivo para agregación cuando fue visualizado un halo con residuo de cristal violeta alrededor de los pozos.

La prueba de agregación fue realizada de acuerdo con Christensen *et al.* (1985), con adaptaciones.

Evaluación de la actividad antibacteriana

Con la finalidad de conocer la respuesta de las estirpes de *Enterococcus* en la reducción del cloruro de trifenil tetrazolium (TTC, sigla en inglés) para su utilización en la evaluación de la actividad antibacteriana, fueron probadas diferentes concentraciones del colorante (0,01%, 0,015%, 0,025% e 0,030%). De esta forma, fueron inoculadas las estirpes en placas de Plate Count Agar (PCA, Difco). Las placas fueron incubadas en estufa bacteriológica a 35°C/24-48h. Crecimiento con coloración roja del medio fue considerado un resultado positivo (reducción del TTC). Como cepas estándar fueron evaluadas bacterias Gram positivas (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923 y *Enterococcus faecium* INCQS 00071) y Gram negativas (*Escherichia coli* ATCC 25922 y *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853).

Para verificar el potencial antimicrobiano de los diferentes extractos, fue realizada la técnica de micro-

dilución en caldo BHI (Minimal Inhibition Concentration, MIC) mediante la metodología descrita por Clinical and Laboratory Standard Institute (CLSI, 2010), con algunas modificaciones.

La prueba fue realizada en microplacas de 96 pozos con fondo plano para un volumen final de 200µL. Las estirpes estándar utilizadas fueron *Escherichia coli* ATCC 25922 y *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

Cada estirpe a ser probada fue renovada en agar BHI a 35°C/24h y ajustada de acuerdo con la escala de McFarland 0,5 en espectrofotómetro con lectura a 625 nm. En la microplaca, cada pozo fue inoculado con un volumen constante de bacterias (50 µL) y volúmenes de extractos y medios de cultivo (caldo BHI doble) variables y ajustados para obtener las concentraciones: 100 µg/mL, 300 µg/mL, 500 µg/mL y 1000 µg/mL. Enseguida las microplacas fueron incubadas a 35 °C por 24 horas (CLSI, 2010). Para la prueba fue utilizada la solución reveladora de TTC al 5% para la verificación del crecimiento bacteriano.

Un resultado positivo para la actividad antibacteriana del extracto de alga fue considerado con la ausencia de crecimiento bacteriano en los micropozos y por consiguiente la no reducción del TTC.

Evaluación de la capacidad de inhibición de la formación de biofilms microbianos

La verificación de la acción inhibitoria en la formación de biofilms fue realizada en microplacas de poliestireno de 96 pozos con fondo plano. Para la evaluación de la adherencia, las estirpes fueron renovadas en Agar BHI a 35°C/24h y ajustadas de acuerdo con la Escala de McFarland 0,5 en espectrofotómetro con lectura a 625 nm. En cada pozo el volumen final fue de 200 µL (inóculo bacteriano con volumen constante en cada pozo, 100 µL y los volúmenes de extractos e medios de cultivo variable y ajustado para obtener las concentraciones: 100 µg/mL y 1000 µg/mL).

Después del periodo de incubación, el medio de cultivo fue descartado de las microplacas y los pozos fueron lavados con agua destilada para remover las células no adheridas. Fue adicionada una solución de cristal violeta al 1% y dejada a temperatura ambiente por 1 minuto. La formación de biofilm fue verificada por la observación de la presencia de color en las paredes de los pozos (Wakimoto, 2004).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Pureza de las estirpes

De las 44 estirpes evaluadas, 31 (70,45%) crecieron en medio selectivo Agar m-*Enterococcus* y presentaron las características del género: cocos Gram positivos, agrupados en cadenas cortas y células aisladas.

Formación de exopolisacáridos (EPS)

De las 31 estirpes analizadas, solamente seis (19.35%) fueron capaces de producir exopolisacárido en Agar Rojo Congo (Figura 1). En las restantes estirpes de *Enterococcus* fue verificado crecimiento bacteriano, mas no fue observada coloración negra en el medio de crecimiento.

El biofilm bacteriano es una aglomeración de una o más especies de bacterias, hongos y protozoos envueltos por una matriz exopolisacáridica (Begun *et al.*, 2007). Esa matriz es capaz de impedir la penetración del agente antimicrobiano en el biofilm (Kasnowski, 2010), lo que hace la identificación del biofilm de suma importancia como expresión de la patogenicidad (Ghellai *et al.*, 2014).

Debido a la importancia que tiene la identificación de la actividad antibiofilm en sustancias naturales para la expresión de la patogenicidad bacteriana, diferentes autores han abordado el estudio de esta temática. En Belfast, UK, Buseti *et al.* (2015), evaluaron extractos metanólicos del alga *Halidrys siliquosa* para la verificación de la actividad antibiofilm, antibacteriana y citotóxica frente a diferentes patógenos de interés en la clínica humana. Fue verificado la actividad antibiofilm del alga en los diferentes solventes evaluados.

Deepa *et al.* (2017) en la India, evaluaron el potencial de productos bioactivos de diferentes macroalgas marinas con la utilización de cuatro solventes: metanol, etanol, butanol y agua. Los autores observaron que más del 50% de los extractos analizados revelaron actividad antibiofilm. Resultados similares fueron encontrados en nuestro estudio mediante la detección de la actividad antibiofilm en los extractos evaluados.

Prueba de adherencia en microplacas de poliestireno

De las seis estirpes que presentaron resultados positivos para la formación de exopolisacáridos, solo una (16,66%) fue capaz de adherirse en microplacas de poliestireno. Es necesario destacar que la adherencia es un pre-requisito para la colonización del tracto gastrointestinal (Kos *et al.*, 2003).

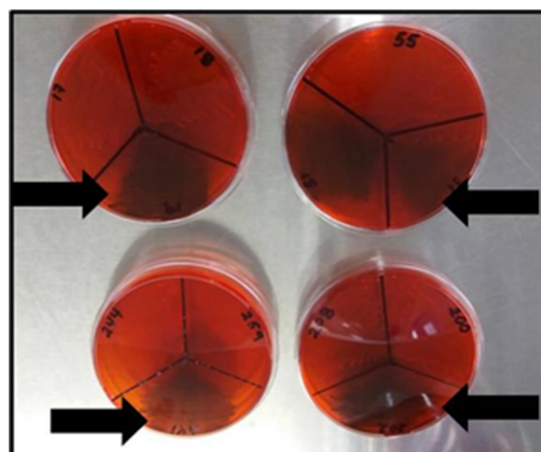


Figura 1. Formación de exopolisacáridos (EPS).

Evaluación de la capacidad de inhibición de la formación de biofilms microbianos

Fue evaluada la capacidad de inhibición de formación de biofilm por los extractos de algas para la estirpe que presentó resultado positivo en la prueba de adherencia (Tabla 1).

La concentración de 100 µg/mL fue capaz de inhibir el crecimiento bacteriano en diferentes algas: *U. fasciata* (extractos: acetónico, metanólico y acuoso); *H. pseudomusciformis* (extractos: metanólico y acuoso); y *D. menstrualis* (extracto acuoso). El extracto *H. pseudomusciformis* acetónico fue capaz de inhibir el biofilm bacteriano (respuesta positiva) en las dos concentraciones probadas (100 µg/mL e 1000 µg/mL).

La formación de biofilm es un factor de virulencia de especial importancia para el estudio de las infecciones por enterococos. El biofilm es capaz de proteger la bacteria no solo del sistema inmune del hospedero sino que también ejerce una protección contra la fagocitosis y contra la acción biocida de diferentes agentes antimicrobianos (Martí *et al.*, 2010).

Prabhakaran *et al.* (2012) evaluaron el potencial antiincrustante de varios extractos de algas y plantas marinas así como, de mangle. Comparando la actividad de inhibición de todos los extractos, fue

Tabla 1. Acción antibiofilm de los extractos de algas frente a la estirpe probada (*Enterococcus*, estirpe 296).

Extractos															
Acetónico				Metanólico						Acuoso					
UF		HP		UF		HP		DM		UF		HP		DM	
Concentración (µg/mL)				Concentración (µg/mL)						Concentración (µg/mL)					
100	1000	100	1000	100	1000	100	1000	100	1000	100	1000	100	1000	100	1000
+	-	+	+	+	-	+	-	-	-	+	-	+	-	+	-

Uf: *Ulva fasciata*; Hp: *Hypnea pseudomusciformis*; Dm: *Dictyota menstrualis*;

Tabla 2. Resultados de la actividad antibacteriana de los extractos de algas frente a las estirpes evaluadas.

Extractos	Alga	Conc.	Estirpes bacterianas							
			19	37	51	202	241	296	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>
Acetónico	Uf	C1	-	-	NT	NT	-	NT	NT	-
		C2	-	-	-	-	-	-	-	-
		C3	-	-	NT	NT	-	NT	NT	-
		C4	-	+	-	-	-	-	-	-
	Hp	C1	-	-	NT	NT	-	NT	NT	-
		C2	-	-	-	-	-	-	-	-
		C3	-	-	NT	NT	-	NT	NT	+
		C4	-	-	-	-	-	-	-	+
	Dm	C1	-	-	NT	NT	-	NT	NT	-
		C2	-	-	NT	NT	-	NT	NT	-
		C3	-	-	NT	NT	-	NT	NT	-
		C4	-	-	NT	NT	-	NT	NT	-
Metanólico	Uf	C1	-	-	NT	NT	-	NT	NT	-
		C2	-	-	-	-	-	-	-	-
		C3	-	-	NT	NT	-	NT	NT	-
		C4	-	-	-	-	-	-	-	-
	Hp	C1	-	-	NT	NT	-	NT	NT	+
		C2	-	-	-	-	-	-	-	+
		C3	-	-	NT	NT	-	NT	NT	+
		C4	-	-	-	+	-	-	-	+
	Dm	C1	-	-	NT	NT	-	NT	NT	-
		C2	-	-	-	-	-	-	-	-
		C3	-	-	NT	NT	-	NT	NT	-
		C4	-	-	-	-	-	-	-	+
Acuoso	Uf	C1	-	-	NT	NT	-	NT	NT	-
		C2	-	-	-	-	-	-	-	-
		C3	-	-	NT	NT	-	NT	NT	-
		C4	+	-	-	-	-	+	-	-
	Hp	C1	-	-	NT	NT	-	NT	NT	-
		C2	-	-	-	-	-	-	-	-
		C3	-	-	NT	NT	-	NT	NT	-
		C4	+	-	+	+	-	-	-	-
	Dm	C1	-	-	NT	NT	-	NT	NT	-
		C2	-	-	-	-	-	-	-	-
		C3	-	+	NT	NT	-	NT	NT	-
		C4	-	+	-	-	-	-	-	-

C1: 100 µg/mL; C2: 300 µg/mL; C3: 500 µg/mL; C4: 1.000 µg/mL; Uf: *Ulva fasciata*; Hp: *Hypnea pseudomusciformis*; Dm: *Dictyota menstrualis*; estirpes: 19, 37, 51, 202, 296 (estirpes de *Enterococcus* analizadas); *Escherichia coli* (ATCC 25922); *Staphylococcus aureus* (ATCC 23923); (+) Actividad antibacteriana del extracto; (-) Ausencia de actividad antibacteriana del extracto; NT: No probada por falta de cantidad de extracto disponible.

verificado que los extractos de mangle tuvieron mayor actividad inhibitoria contra bacterias formadoras de biofilm primario que los extractos de algas y plantas marinas. En el presente trabajo algunos extractos de algas marinas presentaron actividad antibiofilm frente a la estirpe de *Enterococcus* productora de exopolisacárido.

Evaluación de la actividad antibacteriana

En la prueba realizada para identificar la capacidad de las estirpes para reducir el colorante TTC (sigla en inglés), fue detectado que en todas las

concentraciones evaluadas, las estirpes estándar evaluadas presentaron un resultado positivo a la reducción del colorante (colonias rojizas), destacándose que las estirpes bacterianas Gram positivas tardaron más tiempo para la expresión de sus respuestas.

Belotti *et al.* (1999), probó similares concentraciones de TTC (sigla en inglés), para la cuantificación de colonias bacterianas en muestras de leche, destacando que el mejor desempeño del TTC para el conteo de colonias en Plate Count Agar (PCA) fue observado con la concentración de 0.015%.

Al-Shamary y Abdalali (2011), evaluaron la carga microbiana de leche importada vendida en diferentes supermercados de Bagdad, Irak. El TTC (0.015%) no fue eficiente en la reducción de microorganismos Gram positivos. A diferencia de estos resultados, en el presente trabajo fue verificada la eficiencia en la reducción del colorante a la concentración de 0.01%.

Los resultados obtenidos de la reducción del TTC frente a las estirpes evaluadas son presentados en la Tabla 2.

El extracto Uf acuoso inhibió el crecimiento bacteriano de dos estirpes del género *Enterococcus* (19 y 296). Los extractos acuosos de Dm y Uf fueron capaces de inhibir las estirpes 19 y 37, respectivamente. El extracto Hp metanólico resultó eficiente solo frente a la estirpe 202.

El extracto Hp acuoso presentó la mayor actividad antibacteriana, siendo capaz de inhibir el crecimiento de tres (50%) de las seis (100%) estirpes probadas.

Kolanjinathan y Stella (2009), evaluaron extractos de metanol, etanol y acetona de seis especies de algas marinas de la costa sudeste de la India, verificando que el extracto acetónico de *Hypnea pseudomusciformis* presentó actividad antibacteriana frente a estirpes de *E. coli*, resultado que no fue obtenido en el presente trabajo. Los autores también verificaron que los extractos acetónicos y metanólicos fueron capaces de inhibir *Staphylococcus aureus*. Similarmente en nuestro trabajo fue verificado que el extracto metanólico de Hp presentó un resultado positivo en las cuatro concentraciones probadas, el extracto acetónico Hp mostró también un resultado positivo en dos de las concentraciones probadas (500 µg/mL e 1000 µg/mL).

Sustancias bioactivas de diferentes tipos de algas: rojas, verdes y marrón del Mar Rojo, Arabia Saudita fueron evaluadas por Al-Saif *et al.* (2014) utilizando los siguientes solventes para la extracción: etanol, cloroformo, éter de petróleo y agua. Los autores reportaron la eficiencia de las sustancias bioactivas de las algas evaluadas en la inhibición de bacterias patógenas Gram positivas (*Enterococcus faecalis* y *Staphylococcus aureus*) y Gram negativas (*E. coli* y *Pseudomonas aeruginosa*).

En el presente trabajo, fue verificada la capacidad de los extractos de algas (diferentes concentraciones probadas) de inhibir el crecimiento bacteriano de las estirpes del género *Enterococcus* evaluadas.

CONCLUSIONES

Fue posible identificar la producción de sustancias con acción antimicrobiana y capacidad antibiofilm de extractos de algas marinas existentes en la costa de Ceará frente a estirpes bacterianas multirresistentes a antimicrobianos de uso común pertenecientes al género *Enterococcus*.

BIBLIOGRAFÍA

- Águila-Ramírez, R.N.; Arenas-González, A.; Hernández-Guerrero, C.J.; González-Acosta, B.; Borges-Souza, J.M.; Verón, B.; Pope, J.; Hellio, C. (2012). Antimicrobial and antifouling activities achieved by extracts of seaweeds from Gulf of California, Mexico. *Hidrobiologica*, 22: 8-15.
- Al-Saif, S.S.A.; Abdel-Raouf, N.; El-Wazanani, H.A.; Aref, I.A. (2014). Antibacterial substances from marine algae isolated from Jeddah coast of Red sea, Saudi Arabia. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 2: 57-64.
- Al-Shamary, A.H.A.; Abdalali, N.I. (2011). Detection of microbial load in Imported UHT milk in Baghdad Markets. *Journal of Veterinary Sciences*, 4: 103-107.
- Ao, C.; Li, A.; Abdelnaser, A.; Tran D., X.; Shinkichi, T. (2008). Evaluation of antioxidant and antibacterial activities of *Ficus microcarpa* L. fil. extract. *Food Control*, 19: 940-948.
- Bansemir A.; Blume, M.; Schroder, S.; Lindequist, U. (2006). Screening of cultivated seaweeds for antibacterial activity against fish pathogenic bacteria. *Aquaculture*, 252: 79-84.
- Begun, J.; Gaiani, J.N.; Rohde, H.; Macks, D.; Calderwoods, S.B.; F. Ausubel, F.; Sifri, C.D. (2007). Staphylococcal biofilm exopolysaccharide protects against *Caenorhabditis elegans* immune defenses. *Plos Pathogens*, 3: 526-540.
- Beloti, V.; Barro, M.A.F.; de Freitas, J.C.; Nero, L. A.; de Souza, J.A.; Santana, E.H.W.; Franco, B. D.G.M. (1999). Frequency of 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride (TTC) non-reducing bacteria in pasteurized milk. *Revista de Microbiologia*, 30: 137-140.
- Buseti, A.; Thompson, T.P.; Tegazzini, D.; Megaw, J.; Maggs, C.; Gilmore, B.F. (2015). Antibiofilm Activity of the Brown Alga *Halidrys siliquosa* against Clinically Relevant Human Pathogens Marine. *Drugs*, 13: 3581-3605.
- Christensen, G. D. Simpson, W.A.; Bisno, A.L.; Beachey, E.H. (1985). Adherence of coagulase - negative staphylococci to plastic tissue culture plates: a quantitative model for the adherence of staphylococci to medical devices. *Journal of Clinical Microbiology*. 22: 996-1006.
- CLSI – Clinical and Laboratory Standard Institute (2010). Methods for Broth Dilution Susceptibility Testing of Bacteria Isolated from Aquatic Animals. Guideline. M49 A, 26, n. 24, 50p.
- Deepa, S.; Venkateshwaran, P.; Vinithkumar, N.V.; Kirubakaran, R. (2018). Bioactive Propensity of Macroalgae from the Andaman & Nicobar Islands. *Pharmacognosy Journal*, 9: 815-820.
- DSMZ- Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen. Disponible en: www.dsmz.de/fileadmin/Bereiche/ChiefEditors/BacterialNomenclature/DSMZ_supplem_0115.pdf.

- Freeman, D.; F.R. Falkiner, C.T. Keane. (1989). New method for detecting slime production by coagulase negative staphylococci. *Journal of Clinical Pathology*, 42: 872-874.
- Gadhi, A.A.A.; El-Sherbiny, M.M.O.; Al-Sofyani, A.M.A.; Ba-Akdah, M.A.; Satheesh, S. (2018). Antibiofilm activities of extracts of macroalga *Halimeda* sp. from the red sea. *Journal of Marine Science and Technology*, 26: 838-846.
- Gayatri, K.V.; Soundhari, C.; Pavithra, B. (2019). Biofilm inhibitory effect of *Chlorella* extracts on *P. aeruginosa*. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 10: 1966-1971.
- Ghellai, L.; Hassaine, H.; Klouche, N.; Khadir, A.; Aissaoui, N.; Nas, F.; Zingg, W. (2014). Detection of biofilm formation of a collection of fifty strains of *Staphylococcus aureus* isolated in Algeria at the University Hospital of Tlemcen. *Journal of Bacteriology Research*, 6: 1-6.
- Goeke, F.; Labes, A.; Wiese, J.; Imhoff, J.F. (2012). Dual effect of macroalgal extracts on growth of bacteria in Western Baltic Sea. *Revista de Biología Marina y Oceanografía*, 47: 75-86.
- Jafari, S.; Mobasher, M.A.; Najafipour, S.; Ghasemi, Y.; Mohkam, M.; Ebrahimi, M.A.; Mobasher, M. (2018). Antibacterial Potential of *Chlorella vulgaris* and *Dunaliella salina* Extracts Against *Streptococcus mutans*. *Jundishapur Journal of Natural Pharmaceutical Products*, 14: 8p.
- Kasnowski, M. C.; Mantilla, S.P.S.; Oliveira, L.A.T.; Maia, F.R. (2010). Formação de biofilme na indústria de alimentos e métodos de validação de superfícies. *Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária*, 15: 1-23.
- Kolanjinathan, K.; Stela, D. (2009). Antibacterial activity of marine macro algae against human pathogens. *Recent Research in Science and Technology*, 1: 20-22.
- Kos, B.; Suskovic, J.; Vukovic, S.; Simpraga, M.; Frece, J.; Matosic, S. (2003). Adhesion and aggregation ability of probiotic strain *Lactobacillus acidophilus* M92. *Journal of Applied Microbiology*, 94: 981-987.
- Lima-Filho, J. V.; Carvalho, A.F.F.U.; Freitas, S.M.; Melo, V.M.M. (2002). Antibacterial activity of extracts of six macroalgae from the northeastern Brazilian coast. *Brazilian Journal of Microbiology*, 33: 311-313.
- Martí, M.; Trotonda, M.P.; Tormo-Más, M.A.; Vergara-Irigaray, M.; Cheung, A.L.; Lasa, I.; Penadés, J.R. (2010). Extracellular proteases inhibit protein-dependent biofilm formation in *S. aureus*. *Microbes and Infection*, 12: 55-64.
- Mayer, M.J.; Garefalaki, V.; Spoerl, R.; Narbad, A.; Meijers, R. (2011). Structure-Based Modification of a *Clostridium difficile*-Targeting Endolysin Affects Activity and Host Range. *Journal of Bacteriology*, 193: 5477-5486.
- Nair, R.; Chanda, S. (2007). In-vitro antimicrobial activity of *Psidium guajava* L. leaf extracts against clinically important pathogenic microbial strains. *Brazilian Journal of Microbiology*, 38: 452-458.
- Peixoto, J.R.O.; Silva, G.C.; Costa, R.A.; Fontenelle, J.L.S.; Vieira, G.H.F.; Fonteles Filho, A.A.; Vieira, R.H.S.F. (2011). In vitro antibacterial effect of aqueous and ethanolic *Moringa* leaf extracts. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 4: 201-204.
- Pérez, M. J.; Falqué, E.; Domínguez, H. (2016). Antimicrobial Action of Compounds from Marine Seaweed. *Marine Drugs*, 14: 32.
- Prabhakaran, S.; Rajaram, R.; Balasubramanian, V.; Mathivanan, K. (2012). Antifouling potentials of extracts from seaweeds, seagrasses and mangroves against primary biofilm forming bacteria., 2: S316- S322.
- Ríos, N.; Medina, G.; Jiménez, J.; Yáñez, C.; García, M.Y.; Di Bernardo, D.L.; Gualieri, M. (2009). Actividad antibacteriana y antifúngica de extractos de algas marinas venezolanas. *Revista Peruana de Biología*, 16: 97- 100.
- Rizzo, C.; Genovese, G.; Morabito, M.; Faggio, C.; Pagano, M.; Spano, A. *et al.* (2017). Potential Antibacterial Activity of Marine Macroalgae against Pathogens Relevant for Aquaculture and Human Health. *Journal of Pure and Applied Microbiology*, 11: 1695-1706.
- Troncoso, N.; Saavedra, R.; Olivares, A.; Farías, J.; San-Martín, S.; Urrutia, H. *et al.* (2015). Identificación de compuestos antibacterianos en macroalgas presentes en la Región del Biobío, Chile. *Revista de Biología Marina y Oceanografía*, 50: 199-204.
- Vaz, E. K. (2009). Resistência antimicrobiana: como surge e o que representa para a suinocultura. *Acta Scientiae Veterinariae*, 37: 147-150.
- Vieira, F.P.; Noronha, M.C.C. (1971). Atividade antibiótica de algumas algas marinhas do estado do Ceará. *Arquivos de Ciências do Mar*, 11: 91-93.
- Vieira, G. H. F., Mourão, J.A.; Ângelo, A.M.; Costa, R.A.; Vieira, R.H.S.F. (2010). Antibacterial effect (*in vitro*) of *Moringa oleifera* and *Annona muricata* against Gram positive and Gram negative bacteria. *Revista do Instituto de Medicina Tropical*, 52: 129-132.
- Wakimoto, N.; Nishi, J.; Sheiki, J.; Nataro, J.P.; Sarantuya, J.; Iwashita, M. *et al.* (2004). Quantitative biofilm assay using a microtiter plate to screen for Enterococci. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 71: 687-690.