

AISLAMIENTO DE ACTINOBACTERIAS ASOCIADAS A ESPONJAS MARINAS Y EVALUACIÓN DE ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA.

Andrés Cumsille Montesinos

andres.cumsille@gmail.com

Agustina Undabarrena Canusso

agus.undabarrena@gmail.com

Beatriz Cámara Herrera

beatriz.camara@usm.cl

RESUMEN: *La aparición de microorganismos resistentes a antibióticos ha generado la necesidad de buscar nuevos compuestos bioactivos. Un enfoque utilizado para esto es la bioprospección de microorganismos que puedan producir nuevos compuestos, como bacterias pertenecientes al phylum Actinobacteria, uno de los mayores productores de compuestos bioactivos de origen natural.*

En este estudio se aislaron actinobacterias desde la caleta Chañaral de Aceituno, asociadas a esponjas marinas. Se pudo identificar un total de 51 cepas con afiliaciones genéticas a 7 géneros. La potencial producción de compuestos bioactivos se evidenció por la presencia de genes que codifican policétidos sintetas y sintetasas de péptidos no ribosomales en 22 Actinobacterias. Adicionalmente se realizaron ensayos de actividad antibacteriana frente a cepas modelo, donde se logró observar actividad en 2 cepas.

Se concluye que las Actinobacterias asociadas a esponjas marinas de la caleta Chañaral de Aceituno, poseen un potencial para la producción de compuestos bioactivos con actividad antibacteriana.

PALABRAS CLAVE: *Actinobacterias, actividad antibacteriana, compuestos bioactivos, esponjas marinas.*

1. INTRODUCCIÓN

La falta de nuevos antibióticos con mecanismos de acción novedosos para el tratamiento de enfermedades infecciosas, junto a la aparición y propagación de microorganismos patógenos resistentes a estas drogas, constituyen uno de los mayores problemas para la salud a nivel mundial [1]. Nuevos agentes terapéuticos son necesitados con urgencia, donde los productos de origen natural juegan un rol importante para el descubrimiento de nuevas drogas [2].

Debido a que los organismos presentes en los ecosistemas marinos están sometidos a diversas condiciones ambientales y físicas [3], es que estos se han diferenciado de los organismos terrestres tanto a nivel

genético como metabólico [4]. Por esta razón y porque gran parte de los ecosistemas marinos se encuentran inexplorados, es que se reconoce el potencial de estos ecosistemas como fuente de nuevas drogas para tratamientos anti infectivos [2, 5].

Los filos bacterianos más relevantes para la producción de nuevos compuestos bioactivos son las Actinobacterias (40%) [6]. Este *phylum* es de vital importancia para el medio ambiente, debido a su capacidad para degradar materia orgánica y para producir metabolitos secundarios, muchas veces con propiedades antibacterianas, antifúngicas, anticancerígenas, entre otras (Bentley *et al.*, 2002). Para detectar el potencial para la producción de compuestos bioactivos se puede identificar los genes involucrados en la biosíntesis de estos compuestos [8] o a través de ensayos antagónicos de actividad antimicrobiana [9].

En este estudio se aislaron cepas pertenecientes al *phylum Actinobacteria* provenientes de 2 muestras de esponjas marinas de la caleta Chañaral de Aceituno en la región de Atacama, Chile. Se analizó la presencia de genes que codifican biosíntesis de compuestos bioactivos y también se realizaron ensayos antagónicos de actividad antibacteriana para demostrar el potencial de las cepas aisladas para producir compuestos con actividad antibacteriana.

2.1 MUESTREO DE ESPONJAS MARINAS

Se recolectaron 2 muestras de esponjas marinas en mayo del 2014, desde la Caleta Chañaral de Aceituno Chile (Figura 1). Donde Se recolectó 2 especies diferentes de esponjas: *Cliona chilensis* y *Clionaopsis platei* (Figura 2)

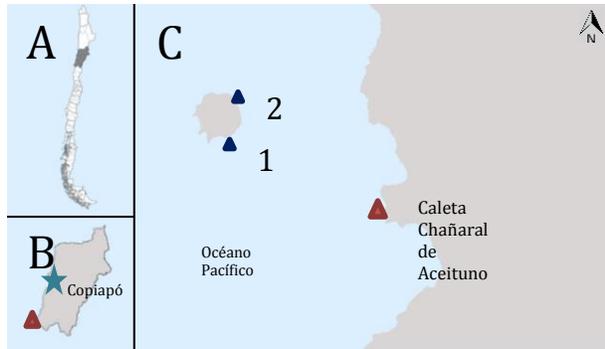


Figura 1. Mapas de los sitios de muestreo A) Mapa de Chile B) Mapa de la región de Atacama. C) Mapa de la Caleta Chañaral de Aceituno. C.1) Las paredes de Neptuno. C.2) El Cañón.



Figura 2 Fotografías submarinas de esponjas recolectadas. A) Fotografía de esponja 1, *Cliona chilensis*. B) Fotografía de esponja 2, *Clionaopsis platei*.

2.2 AISLAMIENTO DE MICROORGANISMOS DESDE ESPONJAS MARINAS

Los microorganismos pertenecientes a las muestras recolectadas fueron sembrados en placa mediante 4 métodos de cultivo selectivo (Directo, dilución de 10^{-4} , Estampado y Capilar). Se utilizaron 6 medios de cultivo selectivos: M3, ISP-2, Marine agar 2216 (Difco), Actinomycete Isolation Agar (Actino Agar), Agar de esponja e ISP3. Los medios ISP-1, ISP-2 y Actino agar fueron preparados con ASW. Con el objetivo de replicar el ecosistema brindado por las esponjas marinas a los microorganismos, todos los medios fueron suplementados con un 2% de extracto acuoso de esponja a excepción del medio agar de esponja que fue suplementado con un 10%. Para favorecer el crecimiento de Actinobacterias, los medios fueron suplementados con ácido nalidixico (25 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y cicloheximida (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) como inhibidor de Gram negativas y antifúngico,

respectivamente. Las placas fueron incubadas a 20°C durante 5 meses.

2.3 EXTRACCIÓN DE DNA GENÓMICO

La extracción de DNA fue realizada a partir de un cultivo fresco. Las colonias fueron resuspendidas en 100 μL de agua Milli-Q estéril e incubadas a 96°C por 10 minutos para lisar las células. Luego fueron puestas directamente en hielo por 10 minutos y posteriormente centrifugadas a 10.000 RPM durante 10 minutos para separar el DNA de los residuos celulares. El sobrenadante con el DNA se conservó a -20°C para su posterior uso.

El DNA genómico de cada una de las cepas se utilizó como templado para la amplificación de genes por PCR.

2.4 AMPLIFICACION POR PCR DEL GEN rRNA 16S DE ACTINOBACTERIAS

Se realizó un *screening* mediante PCR para identificar las potenciales actinobacterias aisladas. Para esto, se utilizaron partidores específicos para actinobacterias S-C-Act-0235-a-S-20 y S-C-Act-0878-A-19, los cuales amplifican la región V3 a V5 (aproximadamente 640 bp) del gen rRNA 16S de actinobacterias.

2.5 AMPLIFICACION POR PCR Y SECUENCIACIÓN DEL GEN rRNA 16S.

Para amplificar el gen rRNA 16S bacteriano se utilizaron partidores universales. Para las secuenciaciones parciales, se utilizó el partidor 800 R. Se determinó la relación filogenética de cada cepa bacteriana al comparar los productos secuenciados con las secuencias individuales del gen rRNA 16S publicadas en la base de datos del servidor BLAST del National Center for Biotechnology Information (NCBI).

2.6 AMPLIFICACION POR PCR DE GENES QUE CODIFICAN PKS Y NRPS

Se realizó la amplificación por PCR de ciertos dominios de genes que codifican para policétido sintasas (PKS) y sintetasas de péptidos no ribosomales (NRPS). Se utilizaron los partidores A3F/A7R (Ayuso-Sacido *et al.*, 2004), KSLF/KSLR [10]; KS α /KS β (Ayuso *et al.*, 2005) para los genes que codifican NRPS, PKS-I y PKS-II respectivamente

2.7 ENSAYOS DE ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA

Las cepas modelo para probar su susceptibilidad contra los aislados de esponjas marinas fueron *Staphylococcus aureus* (STAU), *Listeria monocytogenes* (LIMO), *Escherichia coli* (ESCO), *Pseudomonas aeruginosa* (PSAU) y *Salmonella entérica* (SAEN). Estas fueron incubadas en 5 [ml] de caldo LB en tubos de ensayo por 48 horas a 30°C antes de ser utilizadas en el ensayo.

Las actinobacterias seleccionadas para el ensayo de actividad antibacteriana fueron inoculadas formando una línea recta que divide la placa de Petri en dos mitades iguales y se incubaron durante 7 días a 30°C. Posteriormente se inoculó 10 [µL] de cultivo fresco de la cepa modelo en una zona cercana a la colonia de actinobacteria y con un asa en Loop se estrió formando una línea perpendicular a la colonia cerciorándose que el cultivo se reparta de forma uniforme a través de la línea. La placa se dejó secar antes de ser sellada y se incubó por 48 horas a 37°C.

3.1 BIODIVERSIDAD DE ACTINOBACTERIAS

Se realizó un PCR del gen rRNA 16S con partidores universales para bacterias de las cepas provenientes de esponjas marinas que obtuvieron un amplicón en el tamaño esperado para el PCR con partidores específicos para el *phylum Actinobacteria*, de las cuales todas fueron purificadas y secuenciadas por Macrogen Inc en Corea. Las secuencias fueron editadas manualmente, eliminando los fragmentos laterales erróneos. Del total de cepas secuenciadas 51 cepas resultaron ser del *Phylum Actinobacteria* al ser comparadas con la base de datos de BLAST de NCBI. En total se encontró cepas pertenecientes a 7 géneros: *Brevibacterium* (28), *Brachybacterium* (10), *Streptomyces* (5), *Kocuria* (4), *Janibacter* (2), *Gordonia* (1) y *Micrococcus* (1) (Figura 3).

De las Actinobacterias aisladas fue posible observar una gran variedad de morfologías, como cepas con hifas aéreas y exudados, y cepas con pigmentos de diversos colores (Figura 4). La presencia de hifas es una característica propia del *phylum Actinobacteria*, por ende fue corroborada bajo microscopio (figura 5).

Al analizar los métodos utilizados para aislar bacterias a partir de esponjas marinas, se puede observar que desde el método directo se aislaron 56 cepas en total, donde 8 (14,3%) pertenecen al *Phylum Actinobacteria*. Utilizando el método por dilución se aislaron 34 cepas y 4 de estas (11,8%) pertenecen a este *phylum*; en cambio con el método del estampado se aislaron 151 cepas y 38 de ellas (25,2%) son parte del *phylum* mencionado y con el método capilar se aisló 4 cepas, donde 1 de ellas (25%) forma parte de este filo (Figura 6).

Al observar los medios de cultivo utilizados para aislar actinobacterias, fue posible aislar 20 cepas del

Phylum Actinobacteria desde el medio ISP-2/ASW, 11 desde el agar de esponja, 8 desde el actino agar, 7 desde el agar marino, 5 desde M3 y desde el medio ISP-3/ASW no se obtuvo ningún aislado perteneciente a este filo (Figura 7).

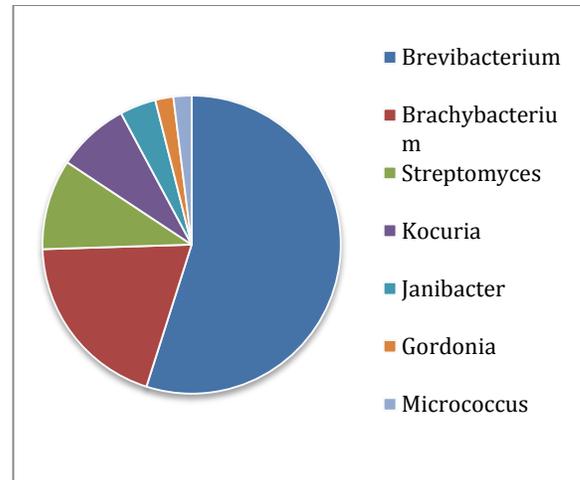


Figura 3 Gráfico del número de aislados por género

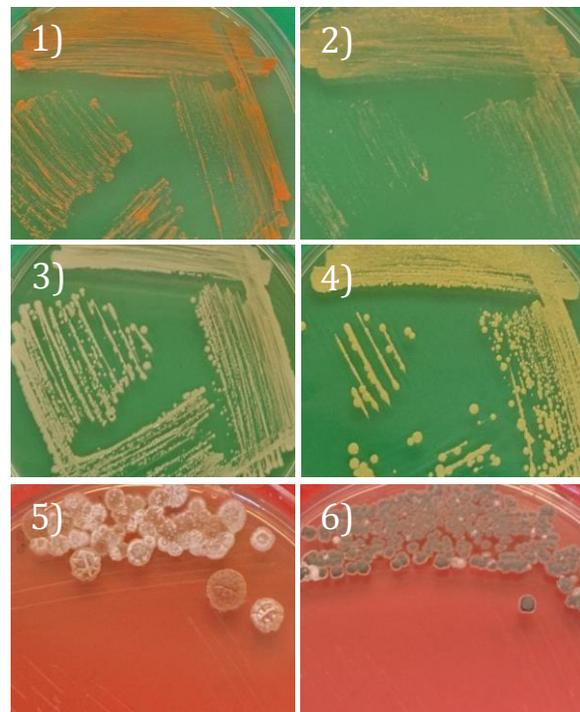


Figura 4 Morfología de Actinobacterias aisladas

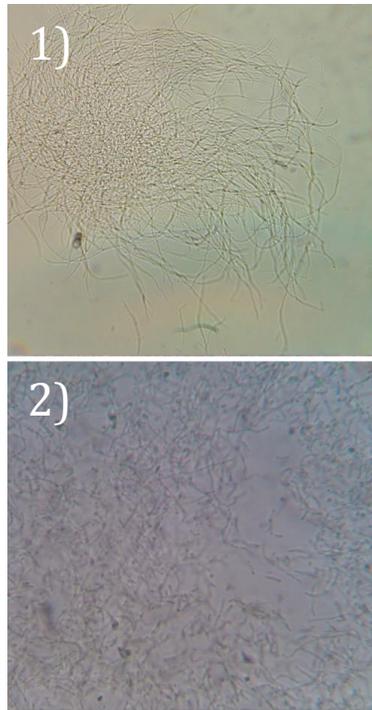


Figura 5 Vista microscópica 1000x de algunos aislados de *Streptomyces* sp. 1) Vista microscópica del aislado C16. 2) Vista microscópica del aislado D67. Flecha indica la morfología micelial.

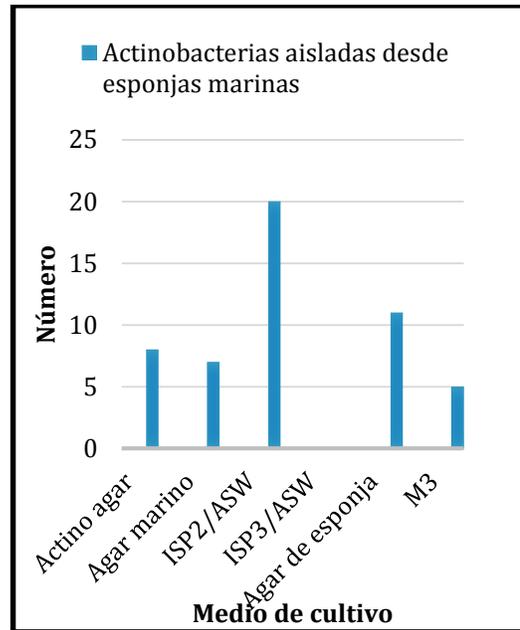


Figura 7 Gráfico del total de Actinobacterias aisladas por medio de cultivo.

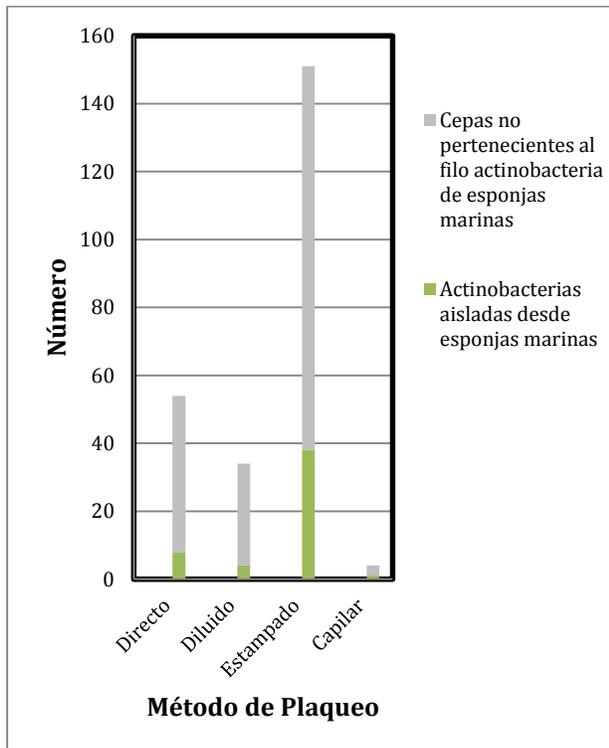


Figura 6 Gráfico del número de Actinobacterias y total de bacterias aisladas por método de cultivo.

3.2 Identificación de potenciales agrupamientos genéticos que codifican PKS y NRPS

Fue posible observar un amplicón en el tamaño esperado de 15 cepas para PKS-I, 16 para PKS-II y 10 para NRPS, 15 de estas cepas amplificaron al tamaño esperado de por lo menos dos genes involucrados en la síntesis de compuestos bioactivos y 4 cepas amplificaron para los 3 genes analizados. No fue posible observar amplicón para el tamaño esperado en ningún gen de solo 3 cepas (Figura 8).

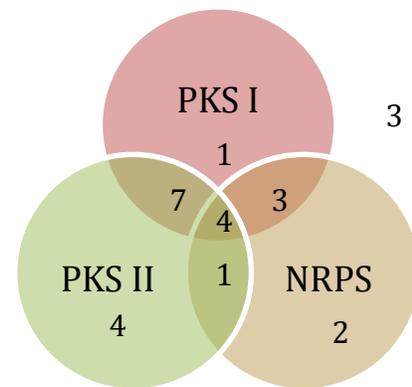


Figura 8 Esquema representativo de presencia de amplicones de genes PKS-I, PKS-II y NRPS.

Estos resultados evidencian el potencial genético para la biosíntesis de metabolitos secundarios en gran parte de las actinobacterias aisladas.

3.3 Ensayos de actividad antibacteriana

Se investigó el potencial de algunas cepas pertenecientes al *Phylum Actinobacteria* para producir compuestos de interés farmacéutico con actividad antibacteriana. La actividad de 9 de las cepas aisladas con mayor potencial para producir compuestos con esta actividad fue probada en un ensayo antagónico contra 5 cepas de interés clínico.

De las cepas testeadas 4 pertenecen al género *Streptomyces* y el resto de las cepas testeadas son 1 cepa perteneciente a cada uno de los siguientes géneros *Brevibacterium*, *Gordonia*, *Janibacter* y *Kocuria*. De las cepas utilizadas en este ensayo fue posible encontrar actividad antibacteriana solo en 2 cepas del género *Streptomyces* contra por lo menos una de las cepas de interés clínico. (Figura 9).

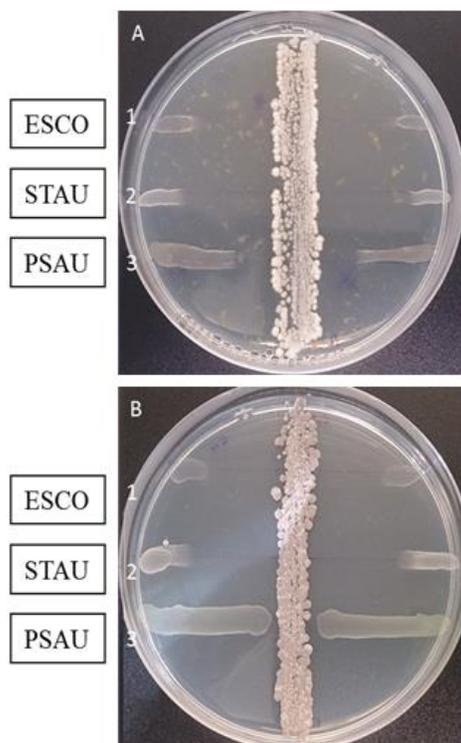


Figura 9 Antibiogramas con actividad antibacteriana observada. A) Cepa *Streptomyces* sp. C8 A.1) Inhibición “+++” contra ESCO. A.2) Inhibición “+++” contra STAU. A.3) Inhibición “+” contra PSAU. B) Cepa *Streptomyces* sp. C16 B.1) Inhibición “+++” contra ESCO. B.2) Inhibición “+++” contra STAU. B.3) Inhibición “-” contra PSAU.

4 CONCLUSIONES

Las esponjas marinas de la caleta Chañaral de Aceituno poseen una gran biodiversidad de actinobacterias cultivables.

El potencial que presentan las actinobacterias aisladas para la producción de compuestos con actividad antibiótica se evidencia por la presencia de genes que codifican enzimas relacionadas con la biosíntesis de compuestos bioactivos como PKS y NRPS, sumado a la actividad antibacteriana frente a cepas modelo de interés clínico.

Este estudio revela la gran biodiversidad y el gran potencial para la producción de compuestos antimicrobianos de las cepas aisladas desde sedimentos y esponjas marinas de la caleta Chañaral de Aceituno.

5 AGRADECIMIENTOS

Esta tesis fue financiada por los proyectos Fondecyt 11121571 y PIE>A UTFSM. Agradecemos al Dr. Michael Seeger y a Myriam González, del Laboratorio de Microbiología Molecular y Biotecnología Ambiental de la Universidad Técnica Federico Santa María, por su valiosa colaboración a lo largo de todo esta investigación.

6 REFERENCIAS

1. Genilloud, O.: The re-emerging role of microbial natural products in antibiotic discovery. *Antonie van Leeuwenhoek, Int J Gen Mol Microbiol.* 106, 173–188 (2014).
2. Zhang, L., An, R., Wang, J., Sun, N., Zhang, S., Hu, J., Kuai, J.: Exploring novel bioactive compounds from marine microbes. *Curr Opin Microbiol.* 8, 276–281 (2005).
3. Bull, a T., Ward, a C., Goodfellow, M.: Search and discovery strategies for biotechnology: the paradigm shift. *Microbiol Mol Biol Rev.* 64, 573–606 (2000).
4. Manivasagan, P.: Introduction to Marine Actinobacteria. *Mar Microbiol* (2013).
5. Haefner, B.: Drugs from the deep: marine natural products as drug candidates. *Drug Discov Today.* 8, 536–544 (2003).
6. Williams, P.G.: Panning for chemical gold: marine bacteria as a source of new therapeutics. *Trends Biotechnol.* 27, 45–52 (2009).
7. Bentley, S., Chater, K., Cerdeño-Tárraga, a-M., Challis, G.L., Thomson, N.R., James, K.D.,

- Harris, D.E., Quail, M. a, Kieser, H., Harper, D., Bateman, a, Brown, S., Chandra, G., Chen, C.W., Collins, M., Cronin, a, Fraser, a, Goble, a, Hidalgo, J., Hornsby, T., Howarth, S., Huang, C.-H., Kieser, T., Larke, L., Murphy, L., Oliver, K., O'Neil, S., Rabbinowitsch, E., Rajandream, M., Rutherford, K., Rutter, S., Seeger, K., Saunders, D., Sharp, S., Squares, R., Squares, S., Taylor, K., Warren, T., Wietzorrek, a, Woodward, J., Barrell, B.G., Parkhill, J., Hopwood, D. a: Complete genome sequence of the model actinomycete *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Nature*. 417, 141–147 (2002).
8. Ayuso-Sacido, a., Genilloud, O.: New PCR primers for the screening of NRPS and PKS-I systems in actinomycetes: Detection and distribution of these biosynthetic gene sequences in major taxonomic groups. *Microb Ecol*. 49, 10–24 (2005).
9. Haber, M., Ilan, M.: Diversity and antibacterial activity of bacteria cultured from Mediterranean *Axinella* spp. sponges. *J Appl Microbiol*. 116, 519–532 (2014).
10. Izumikawa, M., Murata, M., Tachibana, K., Ebizuka, Y., Fujii, I.: Cloning of modular type I polyketide synthase genes from salinomycin producing strain of *Streptomyces albus*. *Bioorganic Med Chem*. 11, 3401–3405 (2003).