

NUEVA PLATAFORMA PARA EL DESCUBRIMIENTO DE METABOLITOS SECUNDARIOS Y LA APLICACIÓN ACUÍCOLA DE CEPAS DE ACTINOMICETOS AISLADAS DE DIVERSOS AMBIENTES.

UNIDAD EJECUTORA PRINCIPAL DEL RESULTADO: Centro de Bioactivos Químicos (CBQ) de la Universidad Central “Marta Abreu” de Las Villas (UCLV).

AUTOR PRINCIPAL: Dr. C. Ricardo Polinars Medina Marrero

OTROS AUTORES: Dra. C. Milagro García Bernal (Centro de Bioactivos Químicos. UCLV). Dr. C. Gerard Wright (Universidad de McMaster, Hamilton, Canadá). Dr. C. José Manuel Mazón Suástegui (Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, La Paz B.C.S., México).

COLABORADORES:Dr. C. Kalinka Koteva, Universidad de McMaster, Hamilton, Canadá. Dr. C. Wenliang Wang, Universidad de McMaster, Hamilton, Canadá. Dr. C. Maulik Thaker, Universidad de McMaster, Hamilton, Canadá. Dr. C. Nicholas Waglechne, Universidad de McMaster, Hamilton, Canadá. Dr. C. Dan Sorensen, Universidad de McMaster, Hamilton, Canadá. Dr. C. Peter Spanogiannopoulos, Universidad de McMaster, Hamilton, Canadá. Dr. C. Andrew King, Universidad de McMaster, Hamilton, Canadá. Dr. C. Natalia Trabal Fernández, Universidad de la República, Rocha, Uruguay. MSc. Norma Ochoa Álvarez, Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, La Paz, México. Dr. C. Ángel Isidro Campa Córdova, Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, La Paz, México. Dr. C. Pedro Enrique Saucedo Lastra, Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, La Paz, México. Dra. Carmen Rodríguez Jaramillo, Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, La Paz, México. Dr. C. Zenaida Rodríguez Negrín, Centro de Bioactivos Químicos, UCLV. Téc. Marlén Casanova González, Centro de Bioactivos Químicos, UCLV. Téc. Micaela Hernández Gárciga, Centro de Bioactivos Químicos, UCLV. Dr. C. Alfredo Meneses Marcel, Centro de Bioactivos Químicos, UCLV. M. Sc. Osmany Marrero Chang, Centro de Bioactivos Químicos, UCLV. Est. Ricardo Medina García, Facultad de Química Farmacia, UCLV.

AUTOR PARA LA CORRESPONDENCIA:

Dr. C. Ricardo Polinars Medina Marrero

Departamento de Microbiología. Centro de Bioactivos Químicos.

Universidad Central “Marta Abreu” de Las Villas. Carretera a Camajuaní, Km 5¹/₂. Santa Clara, Villa Clara. C.P. 54830.

Email: rpedina@uclv.edu.cu.

RESUMEN:

Existe una crisis global por el uso indiscriminado de los antibióticos en la medicina, la agricultura y la acuicultura que ha conllevado al desarrollo y diseminación de microorganismos multirresistentes, los cuales representan una amenaza para la salud pública. Por tanto, se deben desarrollar nuevas estrategias que permitan descubrir nuevos antimicrobianos así como métodos de control que permitan la sustitución de éstos en esferas no relativas a la salud humana. Los actinomicetos son bacterias grampositivas excelentes productoras de metabolitos secundarios y de enzimas extracelulares que pueden suplir esta demanda de nuevos agentes para el control de enfermedades. En la presente propuesta de premio se establece un banco de cepas de actinomicetos que sirve como soporte para el descubrimiento de nuevos metabolitos secundarios usando metodologías novedosas, así como para el desarrollo de agentes probióticos eficaces para el control de enfermedades en la acuicultura, con el propósito de sustituir el uso de antibióticos en la misma. De esta manera, fue posible aislar tres nuevos antibióticos así como dos nuevos candidatos probióticos con cualidades únicas para el cultivo de diferentes especies de ostiones y camarones. Estos resultados demuestran la validez de la metodología científica empleada y permitirá la introducción práctica de éstos y de otros resultados derivados de la estrategia descrita. La presente propuesta queda avalada por 8 publicaciones en revistas de alto impacto, 2 de ellas sometidas, así como 1 tesis doctoral y 5 presentaciones en Congresos Internacionales.

COMUNICACIÓN CORTA DEL RESULTADO

INTRODUCCIÓN

El uso continuado de los antibióticos en la medicina y la agricultura ha provocado el desarrollo y diseminación de bacterias patógenas multirresistentes [1]. Muchas bacterias que provocan infecciones hospitalarias llevan genes de resistencia a antibióticos usados en la alimentación animal o adquiridos del medio ambiente [2]. Por tanto, el uso de agentes antimicrobianos con fines profilácticos o como promotores del crecimiento animal está siendo sustituido por otras tecnologías como los agentes probióticos. En la acuicultura, por ejemplo, se han demostrado mejoras en la calidad del agua, resistencia a las enfermedades, mayores rendimientos productivos, actividad de las enzimas digestivas y respuesta inmune del hospedero con el uso de algunos microorganismos probióticos tales como *Bacillus* y *Lactobacillus* [3].

La búsqueda de **agentes probióticos** efectivos es una **necesidad** para disminuir o suplantar el uso indiscriminado de antibióticos. A su vez, es necesario **descubrir nuevos agentes antimicrobianos** que actúen a través de dianas no explotadas o en dianas conocidas, pero sin resistencia cruzada con antibióticos usados clínicamente [4]. Se plantea que los **actinomi-cetos** son aún una fuente inestimable de nuevos metabolitos secundarios para suplir esta demanda, a pesar del redescubrimiento continuado de agentes conocidos. Debido a que también son excelentes productores de enzimas extracelulares, estos microorganismos pudieran ser fuente de probióticos eficaces para suplir el uso de antibióticos en la acuicultura. Por tanto, para

desarrollar una plataforma que permita el descubrimiento de nuevos antibióticos y probióticos a partir de actinomicetos nos propusimos los siguientes objetivos:

- Desarrollar un banco de cepas de actinomicetos aislados a partir de diferentes fuentes que sirva como plataforma para el descubrimiento de nuevos metabolitos secundarios con actividad antimicrobiana, usando diferentes estrategias.
- Desarrollar nuevos métodos de biocontrol de enfermedades en la acuicultura basado en el uso de cepas de actinomicetos con propiedades únicas para dicho propósito.

MATERIALES Y MÉTODOS

Aislamiento, caracterización y tamizaje primario de cepas de actinomicetos. Se procesaron muestras procedentes de sedimentos de mar, ríos, lagunas, suelos y plantas. Diluciones decimales de estas muestras se sembraron en medios selectivos suplementados con cicloheximida y ácido nalidíxico, e incubaron a 25-30 °C durante 15–21 días [5]. Las colonias características de actinomicetos fueron aisladas y conservadas en glicerol a -20 °C, y caracterizadas por secuenciación del ARNr 16S. El tamizaje primario de actividad antimicrobiana se realizó por el método de los plugs frente a microorganismos de referencia.

Aislamiento de metabolitos secundarios a partir de actinomicetos. La obtención de factumicina se realizó por extracción con acetato de etilo a partir de agar Bennett sembrado con la cepa WAC5292 durante 5 días a 30 °C; seguido de rotoevaporación y purificación usando cromatografía flash de fase reversa y gradiente lineal de acetonitrilo y agua. La cromatografía HPLC analítica se realizó en columna C18 a una velocidad de flujo de 1 ml min⁻¹ en condiciones isocráticas. La purificación de Lunalin A y B se realizó por extracción con acetato de etilo a partir de *Streptomyces* sp. RL8 incubado por 10 días a 30 °C en medio SGG, seguido de fraccionamiento en resina HP20 usando un gradiente de agua-metanol.

La fracción activa se procesó en columna de Sephadex LH-20 por elución con diclorometano-metanol en proporción 30:70. Las fracciones activas se combinaron y se separaron por cromatografía CombiFlash con columna C18 y por HPLC, utilizando un gradiente acetonitrilo/agua. El aislamiento de pekiskomycin se basó en la determinación de la resistencia a vancomicina seguido de secuenciación de genes de biosíntesis específicos de glicopéptidos (*oxyB*, *oxyC*, *hall*, *DpgC*, *oxyE*, *vanHAX*) y análisis filogenético hasta seleccionar la cepa candidata WAC1420; la cual se cultivó por 3 semanas a 30 °C en agar de Bennett, seguido de extracción con NH₄OH, elución del extracto con metanol (0, 10, 20, 40%) en columna HP-20 y purificación por HPLC eluyendo con MeCN 12% en H₂O. Los espectros de masas de alta resolución se obtuvieron en un instrumento LTQ Orbitrap XL y la estructura de los compuestos se confirmó por Resonancia Magnética Nuclear 1-D y 2-D en un instrumento Bruker AVIII a 700 MHz.

Selección *in vitro* de candidatos a probióticos. Los actinomicetos no hemolíticos se seleccionaron en agar sangre 5% y NaCl 2.5%, y los hidrofóbicos en TSA conteniendo Rojo Congo y por la prueba de adhesión a hidrocarburos (BATH) [6]. La producción de sideróforos se realizó en agar Chrome Azurol S (CAS) y la hidrólisis de macromoléculas en medios conteniendo almidón, celulosa, tween 80, caseína y gelatina [7]; mientras que la tolerancia a diferentes pH y salinidades se realizó a diferentes concentraciones hidrogenoiónicas y de sal.

Efecto probiótico de *Streptomyces* spp. en *C. sikamea* y *C. corteziensis*. Cinco grupos de ostiones recibieron los tratamientos V4 (*Streptomyces* sp. V4); RL8 (*Streptomyces* sp. RL8); N7 (*Streptomyces* sp. N7); una mezcla de bacilos BMix [8] y un grupo Control (sin probiótico) durante 30 días. Se determinó el incremento en talla y peso así como la actividad superóxido dismutasa (SOD) del tejido homogenizado con el kit SOD Assay Kit-WST #19160. Para el análisis se utilizaron ANOVAs de una vía y la prueba de rangos múltiples de medias de Tukey. Se estudió el efecto de *Streptomyces* sp. RL8 y N7 sobre la microbiota de *C. sikamea* a través de secuenciación en un secuenciador FLX-Junior. La clasificación taxonómica se realizó con el Clasificador Naïve Bayesiano [9]; mientras que las Unidades Taxonómicas Operacionales (UTOs), los diagramas de Venn, las estimaciones de riqueza de Chao, los índices de Simpson 1-D y de Shannon se realizaron con el software MOTHUR v 1.35.1.

Efecto probiótico de *Streptomyces* spp. en *Litopenaeus vannamei*. Nueve grupos de camarones se trataron con RL8 (*Streptomyces* sp. RL8); N7 (*Streptomyces* sp. N7); Strep (*Streptomyces* sp. RL8 y *Streptomyces* sp. N7); Lact (*Lactobacillus graminis*); Lact-Strep (*Lactobacillus graminis* + Strep); BMix (*Bacillus tequilensis* YC5-2, *Bacillus endophyticus* C2-2 y *Bacillus endophyticus* YC3-B); BMix-Strep; Mix (mezcla de todos los probióticos); y un grupo Control (no tratado). Después de 30 días tratamiento se determinaron parámetros de crecimiento [10], conteo de *Vibrio* y heterótrofos en agua y hepatopáncreas, conteo de hemocitos; seguido de reto con *V. parahemolyticus*, determinación de supervivencia y actividad SOD, y análisis estadístico a través de ANOVA. También se estudiaron los cambios histológicos asociados al uso de RL8 y N7 sobre el hepatopáncreas de *L. vannamei*, así como el efecto tóxico de concentraciones elevadas de las mismas en *Artemia Salina* y *L. vannamei*.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Aislamiento, caracterización y tamizaje primario. Se aislaron 873 cepas características de *Actinomycetes*, las cuales son mantenidas a -20 °C. La caracterización molecular del 10% de las mismas arrojó que éstas presentan un grado de similitud entre 98 -100% con diferentes géneros y especies de actinomicetos que incluye *Micromonospora* spp., *Nocardia* spp., *Nocardiosis* spp., y *Streptomyces* spp. El tamizaje primario mostró que 187 tuvieron actividad frente a *Staphylococcus aureus*, 130 frente a *Escherichia coli*, 36 frente a *Pseudomonas aeruginosa*, 173 frente a *Candida albicans* y 157 frente a *Micobacterium smegmatis*.

Aislamiento de metabolitos secundarios. Factumicina se aisló a partir de la cepa WAC5292 e identificó como pico único en HPLC, con UV-Vis máxima de 230 nm y 360 nm, masa de 778.4 y con asignaciones características de protones y carbonos. La ruta biosintética de factumicina comparte un alto grado de similitud con la de kirromicina. Sin embargo, posee un gen metiltransferasa adicional (FacMII), consistente con la necesidad de metilar el anillo piridona de factumicina. Pekiskomycin se purificó como un nuevo glicopéptido que posee *N,N*-dimetil-Ala y ácido glutámico en lugar de *N*-metil-Leu y asparagina en los residuos 1 y 3, respectivamente; así como tirosina en el residuo 2 (en lugar de β -hidroxi-Tyr) así como un grupo sulfato. Por tanto, el uso de la resistencia fenotípica, comprobación genotípica de ésta y secuenciación de regiones conservadas de la ruta biosintética de antibióticos conocidos es una excelente estrategia para descubrir nuevos antibióticos. Lunalipin A se purificó como nuevo compuesto con masa de 552.0690 y absorción UV a λ_{max} (log ϵ) 215, 257, 306, 332 y 385, con espectros RMN-¹H y -¹³C similares a la xantona hexacíclica CBS40 [11]. Lunalipin B es el derivado 16- de-oxígeno de Lunalipin A con una masa de 536.0739 y espectros UV y RMN similares a este último. Ambos compuestos exhibieron fuerte actividad contra bacterias grampositivas, y diferente actividad frente a bacterias gramnegativas y levaduras.

Selección *in vitro* de candidatos a probióticos. Cinco cepas de actinomicetos mostraron actividad frente a especies patógenas de *Vibrio*. De ellas, *Streptomyces* spp. V4, RL8 y N7 fueron no hemolíticas, capaces de degradar diferentes sustratos macromoleculares, de crecer a elevadas concentraciones de sal y pH>3 y mostraron características hidrofóbicas. Por tanto, estas tres cepas se seleccionaron para los estudios probióticos *in vivo*.

Efecto probiótico de *Streptomyces* spp. en *Crasostrea sikamea* y *Crasostrea corteziensis*. *Streptomyces* sp. RL8 incrementó significativamente el peso de ambas especies de ostiones, mientras que *Streptomyces* V4 y N7 incrementaron sólo el peso de *C. sikamea*. *Streptomyces* RL8 también aumentó significativamente la actividad de la enzima SOD en ambas especies de ostiones, mientras que *Streptomyces* N7 la aumentó solamente en *C. corteziensis*. El estudio metagenómico reveló que *Streptomyces* spp. N7 y RL8 mantienen la población de *Bacteriovorax*, una bacteria depredadora que invade a ciertas bacterias gramnegativas [12]; lo que implica que estas cepas de *Streptomyces* tendrían la capacidad de reducir diversos microorganismos patógenos mediante un efecto probiótico directo y un efecto indirecto al estimular la población de *Bacteriovorax*. Las cepas de *Streptomyces* N7 y RL8 fueron capaces de controlar a las especies de vibrios, estimular la diversidad de actinobacterias e inducir cambios significativos en la composición de la microbiota de *C. sikamea* con respecto a los Controles Inicial y Final, lo cual se demostró por el análisis de componentes principales.

Efecto probiótico de *Streptomyces* spp. solas o combinadas en el camarón *L. vannamei*. La combinación de *Streptomyces* spp. con *Bacillus* spp. (BMix-Strep) mejoró significativamente ($P<0.05$) los indicadores productivos en relación con los grupos controles. Los grupos tratados con N7, RL8 y su combinación (Strep) también mejoraron dichos indicadores de forma no significativa. Se logró una reducción significativa ($P<0.05$) de 4 unidades logarítmicas en la cuenta de *Vibrio* spp en hepatopáncreas de *L. vannamei*, en todos los tratamientos que contienen *Streptomyces* spp. (RL8, N7, Strep, Lact-Strep, BMix-Strep; exceptuando el grupo Mix); así como en el agua de cultivo de BMix-Strep. Una reducción de *Vibrios* de una unidad logarítmica en el agua se logró en los grupos RL8 y Mix. Los grupos N7, Strep y Mix no mostraron reducción significativa de heterótrofos en el hepatopáncreas; así como los tratamientos N7 y RL8 en el agua. Todos los grupos tratados con los probióticos mostraron mayor conteo de hemocitos que el control, con diferencias significativas para Strep, BMix y BMix-Strep. Mientras que RL8 aumentó la actividad SOD, con diferencias no significativas con respecto al control, N7 la disminuyó significativamente y Strep fue indiferente. Todos los demás tratamientos mostraron una actividad SOD significativamente mayor que el control. Todos los grupos tratados, excepto N7 y Strep, exhibieron tasas de supervivencia significativamente más altas que el control; con los grupos tratados con RL8 y BMix- Strep exhibiendo las tasas de supervivencia más altas del 95%. Los camarones tratados con *Streptomyces* RL8 y N7 mostraron un grado de atrofia y de túbulos necróticos significativamente menor que el control. La adición de concentraciones elevadas de estas cepas al agua (0,1%, 0,5%, 1%, 5% y 10% p/v) de *A. salina* y al alimento (1×10^8 , 1×10^9 y 1×10^{10} UFC g^{-1} de alimento) de *L. vannamei* no causó mortalidad alguna; lo cual indica que las mismas son completamente inocuas.

CONCLUSIONES

Se aislaron 873 cepas de actinomicetos, muchas de las cuales exhibieron actividad antimicrobiana. Se purificó un nuevo glicopéptido a través de una novedosa metodología basada en la resistencia a antibióticos, así como dos nuevas xantonas hexacíclicas con fuerte actividad antimicrobiana y se describió la ruta biosintética de factumicina, un antibiótico que actúa a través de un mecanismo novedoso. Se seleccionaron *in vitro* tres cepas de actinomicetos con potencialidades para ser usadas como agentes probióticos en la acuicultura. Estudios *in vivo* en ostiones demostraron que dos de éstas cepas poseen propiedades inmunomoduladoras, aumentan el peso y modulan la microflora a través del control de vibrios, mantenimiento de la especie depredadora *Bacteriovorax* e inducción de cambios significativos de la microbiota. También se demostró mejores indicadores productivos, reducción de la población de vibrios del agua y hepatopáncreas, efectos inmunomoduladores y mejores tasas de supervivencia de camarones tratados con *Streptomyces* RL8 y la combinación de *Streptomyces* y *Bacillus*, BMix-Strep. Las cepas de *Streptomyces* RL8 y N7 son inocuas y mejoran la integridad histológica del hepatopáncreas de los camarones. Por tanto, esta propuesta demuestra las potencialidades de encontrar nuevos antibióticos y agentes probióticos a partir de actinomicetos.

REFERENCIAS

1. Rodriguez-Rojas, A., et al., *Antibiotics and antibiotic resistance: a bitter fight against evolution*. Int J Med Microbiol, 2013. 303(6-7): p. 293-7.
2. Popowska, M. and A. Krawczyk-Balska, *Broad-host-range IncP-1 plasmids and their resistance potential*. Front Microbiol, 2013. 4: p. 44.
3. Zokaeifar, H., et al., *Administration of Bacillus subtilis strains in the rearing water enhances the water quality, growth performance, immune response, and resistance against Vibrio harveyi infection in juvenile white shrimp, Litopenaeus vannamei*. Fish Shellfish Immunol, 2014. 36(1): p. 68-74.
4. Gwynn, M.N., et al., *Challenges of antibacterial discovery revisited*. Ann N Y Acad Sci, 2010. 1213: p.5-19.
5. Jensen, P.R., et al., *Culturable marine actinomycete diversity from tropical Pacific Ocean sediments*. Environ Microbiol, 2005. 7(7): p. 1039-48.
6. Sweet, S.P., T.W. MacFarlane, and L.P. Samaranayake, *Determination of the cell surface hydrophobicity of oral bacteria using a modified hydrocarbon adherence method*. FEMS Microbiol Lett, 1987. 48(1-2): p. 159-163.
7. Harley, J.P. and L.M. Prescott, *Laboratory Exercises in Microbiology*. 5th ed. ed. 2002: The McGraw Hill Companies.
8. Luis-Villaseñor, I.E., et al., *Beneficial effects of four Bacillus strains on the larval cultivation of Litopenaeus vannamei*. Aquaculture, 2011. 321(1): p. 136-144.
9. Wang, Q., et al., *Naive Bayesian classifier for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy*. Appl Environ Microbiol, 2007. 73(16): p. 5261-7.
10. Venkat, H.K., N.P. Sahu, and K.K. Jain, *Effect of feeding Lactobacillus-based probiotics on the gut microflora, growth and survival of postlarvae of Macrobrachium rosenbergii (de Man)*. Aquaculture Research, 2004. 35(5): p. 501-507.
11. Fischer, C., et al., *Procedures for the production of new lysolipin derivatives*, G. Offen., Editor 2007: Germany.
12. Chen, H., et al., *Predatory Bacteriovorax communities ordered by various prey species*. PLoS One, 2012. 7(3): p. e34174.