



Universidad de
La Sabana

BIOPROSPECCIÓN EN ACTINOBACTERIAS CULTIVABLES DE LAS RIBERAS DEL RÍO ARAUCA (COLOMBIA)

Carolina Arango Rosero

Código 20142 5460

Tesis presentada como requisito final para optar al título de:
Doctor en Biociencias

Director

Luis Eduardo Díaz Barrera, Qco, DrSc

Co-director

Alejandro Acosta González, MBiol, PhD

Universidad de La Sabana

Facultad de Ingeniería, Doctorado en Biociencias

Chía, Colombia

2024

AGRADECIMIENTOS

A Dios que nos cuida, y a todas las personas que compartieron mis días en la Universidad La Sabana y quienes saben todo lo que hay detrás de estas hojas, mi agradecimiento.

Al Doctor Luis Eduardo Diaz y al Doctor Alejandro Acosta por su apoyo durante la realización de esta investigación.

Al Doctor Russell Kerr y a su grupo de investigación Nautilus en la University of Prince Edward Island en Canadá, quienes me acogieron durante mi estancia doctoral para la realización de los ensayos de dereplicación química.

Al Doctor Edison Tello por su colaboración en el análisis de datos de Resonancia Magnética Nuclear

A las Directivas del Doctorado en Biociencias de La Universidad de La Sabana por este esfuerzo, especialmente a la Doctora Luisa Villamil Y al Doctor Fabian Leonardo Moreno por su apoyo y comprensión. Al profe Luis quien siempre me apoyo en los buenos y malos momentos. Se que son circunstancias especiales en las cuales se acepta este documento pero que de alguna manera hacen reflejo de mi esfuerzo por ser parte de su institución.

A mis compañeras del Ágora y laboratorios de ingeniería de la Universidad: Natalia Pastrana, Natalia Conde, Lina, Estefanía, Yomaira, Adriana, Liliana e Ingrid. Las recuerdo y las quiero sinceramente. Mi agradecimiento a todos por los momentos vividos y su comprensión.

A mi familia agradezco infinitamente el apoyo y el sostén en los momentos difíciles. Fue de alguna manera un sacrificio para todos, pero lo logramos sobrellevar. Gracias Mami por escuchar mis presentaciones.

A mi esposo Chris, quien me ha apoyado ciegamente en mis decisiones con lo que respecta a la culminación de este documento. Gracias por estar a mi lado en mi momento más aciago.

Finalmente agradezco a la Universidad de La Sabana y Colciencias (Ministerio de Ciencia Tecnología e Investigación) por su apoyo en la financiación de esta investigación.

RESUMEN

Esta investigación tiene su enfoque principal en las actinobacterias extraídas a partir de sedimentos de las riberas del río Arauca en Colombia, como microorganismos productores de compuestos potencialmente bioactivos. Para el tratamiento de los sedimentos y aislamiento de actinobacterias, fueron utilizados cinco pretratamientos físico-químicos (Carbonato de Calcio-C, Fenol-F, Térmico-T, Microondas-M, Sonicación-U) y dos clases de medio de cultivo selectivos (agar de Ácido Húmico y agar-avena ISP3). Un total de 790 aislados de actinobacterias fueron obtenidos. Todos los aislados fueron incluidos en la colección biológica de microorganismos de la Universidad de La Sabana (ActinosUsab).

A partir de esta colección biológica se realizó una estrategia de dereplicación biológica por embudo, mediante ensayos antimicrobianos por confrontación directa. La totalidad de aislados de actinobacterias fueron llevados a ensayos de confrontación directa frente a 4 bacterias patógenas: *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*-MRSA, *Enterococcus faecium*-VRE y *Bacillus subtilis*. Los aislados con actividad antibacteriana positiva fueron luego llevados a ensayos de confrontación directa frente a 3 aislados clínicos de hongos dermatofitos: *Cladosporium cladosporioides*, *Cladosporium cladosporioides* y *Epicoccum nigrum*. En total, 78 aislados de actinobacterias (9.87%) del 790 total inicial fueron seleccionados mediante esta estrategia de dereplicación biológica, al presentar actividad antibacteriana y antifúngica. Estos aislados fueron analizados mediante secuenciación de 16S rRNA, confirmando su pertenencia a la familia Streptomycetaceae. Los 78 aislados seleccionados, fueron llamados “aislados bioactivos”. Se encontró que estos aislados en su mayoría provenían de cultivos con sedimentos pretratados con fenol (F), procesos de sonicación (U) y exposición a microondas (M) durante su proceso de aislamiento.

Paralelo a los ensayos de bioactividad antimicrobiana, se realizó una dereplicación taxonómica en la colección completa de los 790 aislados, mediante de MALDI-TOF MS, identificando 91 clados, cuatro de los cuales agruparon el 66.7% del total de aislados. Estos fueron denominados “clados mayoritarios” al albergar entre 48 a 345 aislados de actinobacterias. Los grupos restantes fueron llamados “clados minoritarios”, agrupando entre 1 a 31 aislados. Los “aislados bioactivos”, fueron localizados en 20 clados distintos y estos fueron llamados “clados bioactivos”. El 85% de estos Clados bioactivos eran clados minoritarios lo que permitió catalogar a estos aislados de actinobacterias como aislados bioactivos de baja abundancia en este tipo de muestras biológicas.

Los extractos crudos de los 78 aislados de actinobacteria bioactivos fueron utilizados en ensayos de actividad citotóxica frente a 5 líneas celulares: MDA-MB-231, A549, SiHa, PC-3 y Vero. De los 78 extractos evaluados, 31 presentaron mediana y alta citotoxicidad frente a las líneas tumorales evaluadas. Extractos crudos de estos aislados fueron llevados a análisis por UPLC-HRMS para obtención de los perfiles químicos y posterior acercamiento metabólico por MzMine2, PCA y *Antibase* 2017, como estrategia de dereplicación química.

La información acerca del tiempo de retención y m/z de cada uno de los iones detectados dentro de cada extracto fue analizada mediante el software MzMine 2 evidenciando un total de 478 agrupamientos según rt_m/z . Se distinguieron al menos 2 grupos: Un primer grupo o cluster relacionado con la producción de metabolitos de m/z entre 280-298 g/mol y un segundo cluster agrupando metabolitos con un m/z entre 628-650 g/mol y 1255-1293 g/mol. Los iones presentes en estos cluster fueron identificados mediante análisis de HRMS y Antibase 2017, encontrando metabolitos comúnmente extraídos de *Streptomyces*, conocidos como carbazomicina D, juglomycinina Z, deoxinibomicina y análogos de los mismos, cremimicina y actinomycininas.

Mediante PCA, se lograron identificar tres extractos con características de masa y tiempo de retención distintas a la mayoría de las muestras. Estos extractos pertenecían a los aislados de actinobacterias 290, 744 y 847. De acuerdo a los loading plots de estos tres aislados, se observaron 5 iones no agrupados los cuales fueron identificados mediante análisis de HRMS y Antibase 2017 como metabolitos comúnmente extraídos de *Streptomyces*, Sin embargo, un ión no logró ser identificado en AntiBase 2017, sugiriendo un potencial nuevo compuesto. Este ión se encontró en el aislado de actinobacteria RKCA-744, presentando un m/z de 1330 g/mol t rt de 3.3 min. El compuesto asociado a esta señal se denominó como CA-13. Una segunda señal presente en esta muestra presentó un m/z de 648 g/mol con rt de 4.2 min y fue asociado a la Alchevimicina A según datos de Antibase 2017.

El compuesto CA-13 fue llevado a análisis de elucidación estructural mediante Resonancia Magnética Nuclear mono y bidimensional, encontrando una estructura macrocíclica con ramificaciones y posible presencia de aminoácidos no comunes. Estas características son comunes en los péptidos no ribosomales

La relevancia de este hallazgo radica en la novedad del metabolito CA-13 ya que hasta la fecha no existe información disponible acerca de este posible nuevo compuesto y también en la novedad de reportar por primera vez la extracción del metabolito Alchevimicina A (compuesto CA-64) a partir de un aislado de actinobacteria asociado a hábitats acuáticos en nuestro país y cuyas características químicas y bioactivas aún se encuentran en proceso de estudio.

Los hallazgos obtenidos en este capítulo permiten corroborar la utilidad de la metodología establecida en esta investigación como vía para la obtención de productos naturales potencialmente novedosos y con actividad biológica relevante. Combinación de estrategias de aislamiento, estrategias de priorización mediante dereplicación biológica y química, y priorización de compuestos mayoritarios a partir de análisis de perfiles químicos en extractos bioactivos, fueron confirmados como pasos esenciales dentro de la búsqueda de nuevos productos naturales bioactivos a partir de microorganismos.

LISTA DE ABREVIATURAS

ATCC	American Type Culture Collection
A549	Línea celular extraída de tejido pulmonar carcinomatoso
ACN	acetonitrilo
CaCO ₃	Carbonato de calcio
CO ₂	Dioxido de Carbono
COSY	COrrrelation SpectroscopY
DMEM	medio Eagle modificado de Dulbecco
DMSO	Dimetil sulfoxido
ELSD	Evaporative Light Scattering Detector
FA	ácido fórmico
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Correlation
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i> - (Cromatografía Líquida de <i>Alta Resolución</i>)
HPLC-MS	Cromatografía Líquida de Alta Resolución acoplada a masas
HSQC	Heteronuclear Single Quantum Coherence
Hz	Hertz
ISP2	International <i>Sterptomyces</i> Project -2 media (caldo)
ISP3	International <i>Sterptomyces</i> Project -3 media (agar avena)
m/z	relación masa carga
MALDI TOF-MS	<i>Matrix-Assited Laser Desorption/Ionization and Time of Flight Mass Spectrometry</i> - (<i>Desorción/ionización láser asistida por matriz y Tiempo de Vuelo</i>)
MDA-MB-231	Línea celular extraída de adenocarcinoma de glándula mamaria
MRSA	Multi Resistant <i>Staphylococcus aureus</i>
MS	<i>Mass Spectrometry</i> – (Espectrometría de Masas)
NMR	<i>Nuclear Magnetic Resonance</i> -(Resonancia Magnética Nuclear)
NRPS	<i>Non Ribosomal Peptide Synthases</i> (Péptido No ribosomal Sintasa)
PC-3	Línea celular extraída de adenocarcinoma prostático
PCA	Análisis de Componentes Principales
PDA	Potato Dextrose Agar
PDA (UV-vis)	Detector de Fotodiodos
PKS	Policétido sintasas
rt	tiempo de retención
SFB	suero fetal bovino
SiHa	Línea celular extraída de carcinoma cervical

LISTA DE ABREVIATURAS

TIC	<i>Total Ion Current</i> - (Corriente Iónica Total)
UPLC	<i>Ultra Performance Liquid Chromatography</i> - (Cromatografía Líquida de Ultra Rendimiento)
UPLC-HRMS	Cromatografía Líquida de Ultra Rendimiento acoplada a Masas de Alta Resolución
UPLC-MS	Cromatografía Líquida de Ultra Rendimiento acoplada a masas
UV	Espectro Ultravioleta
Vero	Línea celular control extraída de epitelio de <i>Cercopithecus aethiops</i>
VRE	Vancomicine Resistant <i>Enterococcus faecium</i>

CONTENIDO

CAPITULO 1 - Bio-descubrimiento e importancia de productos naturales extraídos de Actinobacterias

1.1. INTRODUCCIÓN	1
1.1.1 Productos naturales y su importancia	1
1.1.2 Microorganismos como fuente de productos naturales bioactivos Actinobacterias	2
1.2. STREPTOMYCES	3
1.2.1 Ciclo de vida	4
1.2.2 Sistemas de dos componentes	5
1.2.3 Genes Reguladores de Respuesta	6
1.3. BIOSÍNTESIS DE METABOLITOS SECUNDARIOS	7
1.4. PROBLEMAS ASOCIADOS AL BIODESCUBRIMIENTO DE PRODUCTOS NATURALES	10
1.4.1 Exploración de nuevos hábitats	10
1.4.1.1 En el agua	13
1.4.2 Técnicas de aislamiento	15
1.4.2.1 Medios selectivos	15
1.4.2.2 Pretratamientos sobre la muestra biológica	15
1.4.2.3 Cámaras de difusión	16
1.4.3 Estrategias de dereplicación	17
1.5. ESTUDIOS DE AISLAMIENTO DE ACTINOBACTERIAS EN COLOMBIA	19
1.6. OBJETIVOS DE LA INVESTIGACIÓN	20
1.7. BIBLIOGRAFIA	22

CAPITULO 2 - Actinobacterias del río Arauca. Estrategias de aislamiento y screening biológico

2.1 INTRODUCCIÓN	29
2.1.1 Bio-diversidad por descubrir	29

2.1.2 Arauca	29
2.1.3 Río Arauca – aguas inexploradas	30
2.1.4 Accediendo a las riberas del río Arauca	32
2.1.5 Colección biológica de Actinobacterias asociadas a las riberas del río Arauca – Estrategia de trabajo	33
2.1.5.1 Aislamiento de actinobacterias mediante el uso de pretratamientos	33
2.1.5.2 Priorización de aislados biológicos – Estrategia del embudo biológico	36
2.1.5.3 MALDI TOF-MS – Acercamiento a la abundancia de aislados bioactivos de Actinobacterias	37
2.2. OBJETIVO PROPUESTO	38
2.3. MATERIALES Y MÉTODOS	39
2.3.1 Recolección de sedimentos de las riberas del río Arauca (Colombia).....	39
2.3.2 Pretratamientos físico-químicos, siembra y criopreservación	40
2.3.3 Dereplicación Biológica utilizando priorización por embudo – Ensayos antimicrobianos por confrontación directa	42
2.3.4 Identificación molecular – Amplificación por PCR y secuenciación 16s rRNA	44
2.3.5 MALDI TOF-MS.....	45
2.4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	45
2.4.1 Recolección de sedimentos de las riberas del río Arauca (Colombia) y pretratamientos físico-químicos	45
2.4.2 Dereplicación Biológica utilizando priorización por embudo - Ensayos antimicrobianos por confrontación directa	48
2.4.3 MALDI-TOF MS e identificación molecular por amplificación de 16S rRNA	56
2.5. CONCLUSIONES	65
2.6. BIBLIOGRAFIA.....	67

CAPITULO 3 - Dereplicación química en actinobacterias del río Arauca con actividad antimicrobiana y citotóxica - Uso de herramientas metabólicas

3.1 INTRODUCCIÓN	71
3.1.1 Dereplicación	72
3.1.2 Técnicas hífenadas	73
3.1.2.1 Cromatografía líquida de Alto Rendimiento (HPLC)	74
3.1.2.2 Cromatografía líquida de Ultra Alto Rendimiento (UHPLC).....	74

3.1.2.3 Técnicas espectroscópicas – Detectores PDA y MS	75
3.1.3 Acercamiento metabolómico – Relación entre perfiles químicos y PCA	77
3.2 OBJETIVO PROPUESTO	79
3.3 MATERIALES Y MÉTODOS.....	80
3.3.1 Fermentación a microescala de aislados de actinobacterias del río Arauca con potencial antimicrobiano	80
3.3.2 Extracción de fase orgánica sobre cultivos de actinobacterias a microescala	81
3.3.3 Segunda dereplicación biológica utilizando priorización por embudo - Ensayos de citotoxicidad	82
3.3.4 Dereplicación química y acercamiento metabolómico mediante UPLC-HRMS, MzMine 2 y PCA	83
3.3.4.1 Cromatografía Líquida de Ultra Alto Rendimiento acoplada a Masas de Alta Resolución (UPLC-HRMS)	83
3.3.4.2 MzMine y Análisis de Componentes Principales (PCA) enfocados a la dereplicación sobre perfiles cromatográficos	84
3.4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN	87
3.4.1 Segunda dereplicación biológica utilizando priorización por embudo - Ensayos de citotoxicidad	87
3.4.2 Dereplicación química y acercamiento metabolómico mediante UPLC-HRMS, MzMine 2 y PCA	90
3.4.2.1 Código de barras (barcode) - Visualización de la diversidad química	90
3.4.2.2 Análisis de Componentes Principales - PCA.....	94
3.5 CONCLUSIONES	99
3.6 BIBLIOGRAFIA	101

CAPITULO 4 - Aislamiento y caracterización de compuestos mayoritarios presentes en el aislado *Streptomyces* RKCA-744. Extracción y elucidación química de un péptido no ribosomal potencialmente nuevo

4.1 INTRODUCCIÓN	104
4.1.1 Policétidos	104
4.1.2 Péptidos No Ribosomales	106
4.2 OBJETIVO PROPUESTO	108
4.3 MATERIALES Y MÉTODOS	108

4.3.1 Fermentación a gran escala del aislado RKCA-744 y obtención de extracto crudo	108
4.3.2 Fraccionamiento del extracto crudo del aislado RKCA-744.....	109
4.3.3 Elucidación estructural de los iones mayoritarios presentes en el extracto crudo del aislado RKCA-744.	110
4.4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN	111
4.4.1 Fermentación a gran escala del aislado RKCA-744 y obtención de extracto crudo	111
4.4.2 Fraccionamiento del extracto crudo del aislado RKCA-744.....	112
4.4.3 Elucidación estructural de los iones mayoritarios presentes en el extracto crudo del aislado RKCA-744.	115
4.4.3.1 Compuesto CA-13. Fracción 1.....	115
4.4.3.2 Compuesto CA-64. Fracción 2.....	119
4.4.4 Potencial biológico de los iones mayoritarios presentes en el extracto crudo del aislado RKCA-744.	123
4.4.4.1 Compuesto CA-13. Fracción 1.....	124
4.4.4.2 Compuesto CA-64. Fracción 2.....	124
4.5 CONCLUSIONES	125
4.6 BIBLIOGRAFIA	128

CAPITULO 5 - Resultados principales y perspectivas

5.1 Sobre estrategias de aislamiento y screening biológico para el estudio de las actinobacterias del río Arauca	129
5.2 Sobre estrategias de dereplicación química y uso de herramientas metabolómicas en actinobacterias del río Arauca con actividad antimicrobiana y citotóxica.	130
5.3 Sobre el aislamiento y caracterización de compuestos mayoritarios presentes en el aislado <i>Streptomyces</i> RKCA-744. Extracción y elucidación química de un péptido no ribosomal potencial nuevo	131
5.4 Perspectivas	132

LISTA DE TABLAS

CAPITULO 1 - Bio-descubrimiento e importancia de productos naturales extraídos de Actinobacterias

Tabla 1. Algunos metabolitos secundarios bioactivos en *Streptomyces* sp.. 8

Tabla 2. Géneros de actinobacterias aislados de diferentes ambientes con biosíntesis de productos naturales bioactivos..... 12

CAPITULO 2 - Actinobacterias del río Arauca. Estrategias de aislamiento y screening biológico

Tabla 1. Valores de pH, porcentaje de materia orgánica, humedad relativa y concentración de Ca²⁺, K⁺, Mg²⁺ y Na⁺ presentes en las muestras de sedimentos colectadas en las riberas del río Arauca (Colombia), según punto de muestreo. 46

Tabla 2. Cantidad de aislados de actinobacterias a partir de muestras de sedimentos de riberas del río Arauca, según punto de muestreo y pretratamiento físico-químico utilizado. 48

Tabla 3. Resultados de pruebas de bioactividad antimicrobiana (antibacterial y antifúngica)..... 50

Tabla 4. Cantidad de aislados de actinobacterias con actividad antimicrobiana a partir de muestras de sedimentos de riberas del río Arauca. 53

Tabla 5. Clados de actinobacterias con actividad antimicrobiana detectados mediante MALDI-TOF MS..... 58

Tabla 6. Identificación molecular de los aislados de actinobacterias con actividad antimicrobiana..... 60

CAPITULO 3 - Dereplicación química en actinobacterias del río Arauca con actividad antimicrobiana y citotóxica - Uso de herramientas metabolómicas

Tabla 1. Líneas celulares de importancia clínica relevante utilizadas durante el ensayo de actividad citotóxica 82

Tabla 2. Aislados con potencial citotóxico positivo frente al menos una línea tumoral analizada (MDA, A549, SiHa, PC-3) y citotoxicidad negativa frente a la línea no tumoral Vero..... 89

Tabla 3. Resultados de screening biológico por actividad antimicrobiana y citotóxica de los aislados 290, 744 y 847 de actinobacterias del río Arauca detectados por PCA 98

CAPITULO 4 - Aislamiento y caracterización de compuestos mayoritarios presentes en el aislado *Streptomyces* RKCA-744. Extracción y elucidación química de un péptido no ribosomal potencialmente nuevo

Tabla 1. Datos de ¹³C y ¹H por Resonancia Magnética Nuclear para la fracción 1 (compuesto CA13 disuelto en MeOH-d₄, 600 MHz) 116

Tabla 2. Datos de HSQC, ¹³C y ¹H por Resonancia Magnética Nuclear para la fracción 2 (compuesto CA64) y Alchivemicina A 120

Tabla 3. Porcentaje de actividad antibacterial y citotóxica del extracto crudo de RKCA-744 y sus dos compuestos mayoritarios CA-13 y CA-64. 125

LISTA DE FIGURAS

CAPITULO 1 - Bio-descubrimiento e importancia de productos naturales extraídos de Actinobacterias

Figura 1. Modelo clásico del ciclo de vida de <i>Streptomyces</i>	5
Figura 2. Nombre, estructura química y tipo de metabolito secundario de algunos productos naturales bioactivos extraídos de <i>Streptomyces</i> sp.....	9

CAPITULO 2 - Actinobacterias del río Arauca. Estrategias de aislamiento y screening biológico

Figura 1. Mapa político colombiano, resaltando en verde la región de la Orinoquía Colombiana, departamentos asociados e hidrografía	31
Figura 2. Mapa de Colombia - Detalle de la ciudad de Arauca - Puntos de muestreo	39
Figura 3. Proceso de recolección de sedimento en las riberas del río Arauca	40
Figura 4. Ensayos antimicrobianos por enfrentamiento directo muestreo	44
Figura 5. Ejemplo de aislamiento secuencial y tinción Gram del aislado 407, proveniente de muestra de sedimento del río Arauca (Colombia).	47

CAPITULO 3 - Dereplicación química en actinobacterias del río Arauca con actividad antimicrobiana y citotóxica - Uso de herramientas metabolómicas

Figura 1. Barcoding y análisis de cluster de 31 extractos con actividad antimicrobiana y citotóxica, provenientes de aislados de actinobacterias de sedimentos del río Arauca.....	91
Figura 2. Metabolitos asociados a cluster 1.	92
Figura 3. Metabolitos asociados a cluster 2.	94
Figura 4. Score Plot y Loading Plot de componentes principales PC1 vs PC2 hasta PC4vsPC5.	96

CAPITULO 4 - Aislamiento y caracterización de compuestos mayoritarios presentes en el aislado *Streptomyces* RKCA-744. Extracción y elucidación química de un péptido no ribosomal potencialmente nuevo

Figura 1. Reacción de Claisen para formación de cadena base de poli-beta-ceto ester, en biosíntesis de policétidos.....	105
Figura 2. Esquemmatización del complejo modular presente en PKS tipo I.....	106
Figura 3. Esquemmatización de un péptido no ribosomal.....	107
Figura 4. Perfil químico del aislado de actinobacterias RKCA-744, obtenido por UPLC-HRMS acoplado a ELSD y PDA.....	112
Figura 5. Perfiles cromatográficos de las fracciones 6 y 10 del extracto crudo del aislado de actinobacterias RKCA-744.....	114
Figura 6. Esquemmatización del compuesto CA-13 presente en la fracción 1 del aislado RKCA-744.....	118
Figura 7. Esquemmatización de la Alchivemicina A presente en la fracción 2 del aislado RKCA-744.....	122

ANEXOS

Anexo 1. H^1 PROTON NMR <i>Compuesto CA-13</i>	135
Anexo 2. C^{13} CARBON NMR <i>Compuesto CA-13</i>	136
Anexo 3. COSY <i>Compuesto CA-13</i>	137
Anexo 4. HSQC <i>Compuesto CA-13</i>	138
Anexo 5. HMBC <i>Compuesto CA-13</i>	139
Anexo 6. Artículos publicados a la fecha.....	140

CAPITULO 1

Bio-descubrimiento e importancia de productos naturales extraídos de Actinobacterias

1.1. INTRODUCCIÓN

Desde inicios del siglo XX y a partir del descubrimiento de la penicilina y la estreptomina por Alexander Fleming y Selman Waksman (Huang & Lin 2017), hechos considerados por el autor como hitos dentro de la investigación en esta área, comenzó una carrera vertiginosa hacia la comprensión, estudio y aprovechamiento de los productos naturales a partir de microorganismos.

¿Pero qué son los productos naturales y cuál es su importancia?, ¿Por qué a partir de microorganismos?

1.1.1. Productos naturales y su importancia

Se entiende como productos naturales, aquellos metabolitos extraídos a partir de una fuente natural con capacidad de actuar como agentes terapéuticos. Aunque éstos han sido conocidos y utilizados desde tiempos antiguos como medicina tradicional (Dias 2012), su aplicabilidad ha llamado la atención en áreas de la ciencia como la biología, química y medicina, generando una continua exploración acerca de sus características, diversidad y acción (Huang & Lin 2017).

Los productos naturales son generalmente conocidos como metabolitos secundarios, entendiéndose éstos como aquellas moléculas producidas por un organismo debido a una acción externa relacionada frecuentemente con la adaptación a nuevos ambientes, posibles ataques de depredadores o en general a condiciones de estrés, confiriendo al organismo que los produce ventajas a nivel ecológico (Osbourn 2010). Son conocidos como “metabolitos no esenciales para el crecimiento, desarrollo o reproducción de un organismo” (Dias 2012), lo anterior con el fin de establecer una diferencia entre éstos y los metabolitos

primarios, que en su caso son moléculas relacionadas al metabolismo primario del organismo, fundamentales para la síntesis o degradación de carbohidratos, azúcares, ácidos grasos y aminoácidos y que son primordiales para el mantenimiento energético de un individuo (Dewick 2009).

1.1.2. Microorganismos como fuente de productos naturales bioactivos - Actinobacterias

Los microorganismos (principalmente procariotas) representan una fuente importante para la búsqueda y desarrollo de agentes potencialmente activos a nivel antibacterial, antifúngico, citotóxico, antiinflamatorio, o con capacidad de actuar como agentes biorremediadores y de actividad enzimática aprovechable a nivel industrial (Barka 2016; Bertrand et al., 2014; Demain 2014).

De estos microorganismos, las *Actinobacterias* representan una de las fuentes naturales con mayor capacidad de aprovechamiento biotecnológico, aportando a la comunidad aproximadamente un 45% de los compuestos bioactivos utilizados como agentes terapéuticos (Barka 2016; Bérdy 2005).

El phyla Actinobacteria, perteneciente al dominio Bacteria, cuenta con 6 clases, 22 órdenes, 53 familias y 252 géneros, (Ludwig et al., en Goodfellow 2012). En cuanto a sus características principales, se definen como bacterias Gram-positivas y de alto contenido de G+C con rangos entre el 42-74% dependiendo del género (Verma et al., 2013; Ventura et al., 2007). Su pared celular es una estructura compuesta de polisacáridos, ácido teicoico y ácido teicuronico los cuales están unidos químicamente a un peptidoglicano. Los peptidoglicanos se conforman de cadenas de glicano alternadas con N-acetil-d-glucosamina (NAG), N-acetil-d-ácido murámico (NAM) y ácido diaminopimélico (DAP) (Hotam et al., 2013). Pueden evidenciar diferentes características morfológicas que varían desde formas cocoides (ej. *Micrococcus*) o bacilares (ej. *Arthrobacter*) hasta formas de hifas fragmentadas (ej. *Nocardia*) o de micelios definidos (ej. *Streptomyces*) (Ventura et al., 2007).

Se encuentran asociadas a hábitats como el suelo y su diversidad es influenciada por la localización geográfica, temperatura, tipo de suelo, pH, contenido de materia orgánica, actividades agrícolas, aireación, disponibilidad de nutrientes, contenido de humedad y

vegetación (Arifuzzaman et al., 2010). También pueden encontrarse ampliamente distribuidas en otros hábitats como medios acuáticos, cuevas, desiertos y en simbiosis con plantas e incluso insectos, debido a las características propias de su ciclo biológico y de su morfología (Ramirez et al., 2006; Bull 2011; Goodfellow 2012, Chaudhary et al., 2013; Subramani & Aalbersberg 2013), siendo el género *Streptomyces* el más representativo, ya que a partir de éste se han llegado a producir compuestos terapéuticos de importancia clínica como la estreptomycin, tetraciclina, mitomicina, amfotericina B, entre otros (Bérdy 2005; Subramani & Aalbersberg 2013; Janardhan et al., 2014; Solecka et al., 2012).

1.2. STREPTOMYCES

El género *Streptomyces* presenta la mayor diversidad y abundancia dentro del grupo de las Actinobacterias debido a estrategias de adaptación a diferentes ambientes que le permiten responder rápidamente a condiciones adversas y a competir contra otros microorganismos (Mendes et al., 2007; Bentley et al., 2002; Chaudhary et al., 2013); entre éstas se encuentran:

- Presencia de un ciclo de vida conformado por hifas, las cuales colonizan eficientemente el hábitat donde se encuentren con la posterior capacidad de producir esporas en condiciones de estrés (*ej.* falta de nutrientes) y a la producción de metabolitos secundarios.
- Uso de Sistemas de Dos Componentes y Genes reguladores de Respuesta, los cuales al ser mecanismos sensores y transductores de señales ambientales y nutricionales, le permiten responder y adaptarse específicamente a determinadas condiciones de estrés.
- Producción de metabolitos secundarios tipo antibióticos a través de diferentes vías metabólicas, los cuales son utilizados como mecanismo de defensa frente a otros microorganismos presentes en un mismo hábitat.

1.2.1 Ciclo de vida

El inicio del ciclo (Figura 1) puede tomarse a partir del momento en que una espora encuentra condiciones favorables de nutrientes en el suelo y comienza una fase de germinación en donde uno o dos tubos germinales emergen para formar lo que se conoce como hifa (Flardh & Buttner 2009). Con la germinación de la espora se inicia la síntesis de ARN y proteínas y posteriormente la síntesis de ADN en el momento en que se generan tubos germinales (Hardisson et al., 1978). Los tubos germinales continúan su proceso de extensión hasta formar un micelio vegetativo por debajo del suelo con el fin de obtener los nutrientes que allí se encuentren. Las células subapicales pueden cambiar la polaridad, generando un nuevo punto de crecimiento que conducirá a la formación de nuevas ramificaciones (Flardh 2010). En el momento en que se detecte una falta de nutrientes u otro tipo de estrés, se inicia la producción de metabolitos secundarios y una nueva fase de diferenciación morfológica. En este caso, la hifa rompe la tensión superficial del suelo, escapa del micelio vegetativo y comienza a dirigirse a la parte aérea. Es en ese momento cuando la hifa inicia su división celular controlada formando largas cadenas de pre-esporas que en fases subsecuentes sintetizan pigmentos característicos y desarrollan paredes celulares gruesas e hidrofóbicas que les permiten sobrevivir a condiciones adversas del medio ambiente durante largos periodos de tiempo, evitando la humedad (Flardh & Buttner 2009). Este micelio esporulado puede observarse en forma ramificada o no, y con una conformación en espiral o en otros casos recta. Las esporas por su parte pueden ser esféricas, cilíndricas u ovoides (Hotam et al., 2013)

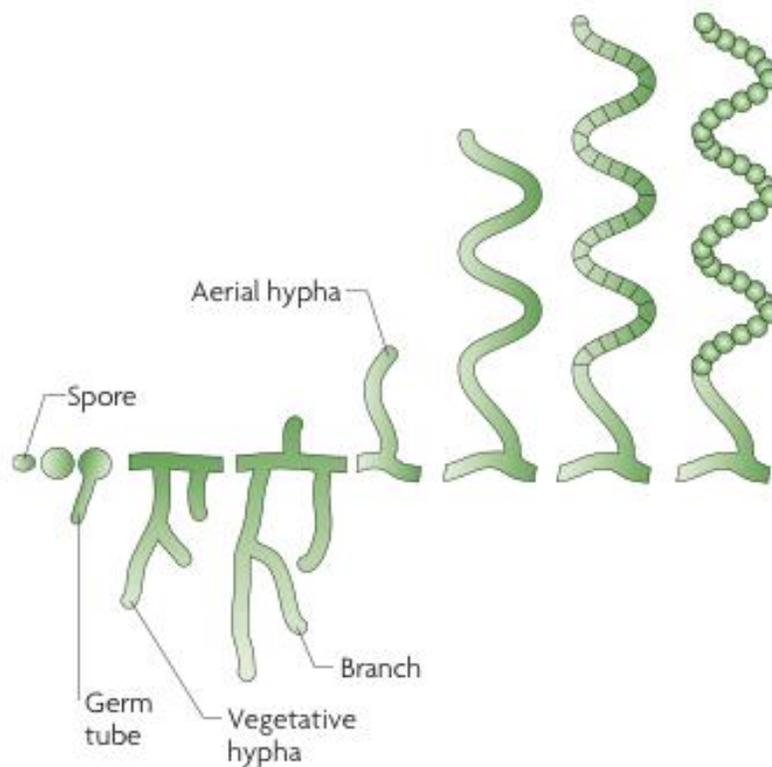


Figura 1.

Modelo

clásico del ciclo de vida de *Streptomyces*. Tomado de Flardh & Buttner 2009

1.2.2 Sistemas de dos componentes

Los sistemas de dos componentes controlan la expresión de determinados genes en según distintas condiciones ambientales y nutricionales (Mendes et al., 2007, Casino P et al., 2010).

El modelo básico de un sistema de dos componentes está conformado por una Histidin Kinasa (HK), molécula censora asociada a la membrana celular y un Regulador de la Respuesta (RR) de naturaleza protéica, que activa la respuesta bacteriana por medio de la alteración de la expresión de ciertos genes (Casino et al., 2010). Se considera que el rango de señales medioambientales al que las bacterias pueden responder está directamente relacionado con el número de HKs que contiene su genoma y de los RR que se encuentren asociados (Kim & Forst 2001). En *Streptomyces coelicolor* han sido identificados 85 Histidin

Kinasas (HK) y 79 Reguladores de Respuesta (RR), característica que le confiere ventaja competitiva al microorganismo dentro del microambiente en el que se encuentre (Bentley et al., 2002). Un ejemplo de TCS en *S. coelicolor* es el sistema de dos componentes phoR/phoP como respuesta a la escasez de fosfato inorgánico (Mendes et al., 2007). Cuando existen condiciones bajas de fosfato, la Histidin Kinasa - PhoR fosforila el Regulador de Respuesta - PhoP y éste se une a su vez a regiones promotoras para así activar la transcripción de genes para la síntesis de metabolitos secundarios, tipo macrólidos como la pimarcina utilizada como agente antifúngico (Mendes et al., 2007).

1.2.3 Genes Reguladores de Respuesta

A nivel molecular, cuando las bacterias se enfrentan a una situación de estrés pueden generar metabolitos secundarios como respuesta. Por ejemplo, si el estrés es por inanición, se genera un rápido descenso de la síntesis de ARN con el fin de detener la velocidad de crecimiento. Esto se produce en el momento en que una proteína asociada a los ribosomas, llamada RelA, cataliza la síntesis de la alarmona ppGpp (guanosa 5'-difosfato-3'-difosfato) que es la encargada de regular negativamente la síntesis de ARN (Berleman & Kirby 2007). De esta manera pueden ser activados otros mecanismos de respuesta a estrés como lo es la producción de metabolitos secundarios. Es así, como por ejemplo *S. lividans* cuando detecta condiciones de estrés, activa la molécula SAM (S- adenosil-L-metionina) la cual, por medio de un factor transcripcional actII-ORF4, incrementa la expresión de los genes o clusters que regulan la producción del antibiótico actinordina (Zhang et al., 2008; Kim et al., 2003). La actividad de los genes reguladores de respuesta se encuentra a su vez regulada por la presencia de proteínas tipo Factor Sigma. En el caso de *S. coelicolor* se conocen 65 factores Sigma dentro de su genoma, de los cuales 45 de ellos tienen una función extra-citoplasmática con la finalidad de responder ante un estímulo externo activando los genes involucrados en el crecimiento del micelio aéreo y en la respuesta a estrés (Bentley et al., 2002).

1.3. BIOSÍNTESIS DE METABOLITOS SECUNDARIOS

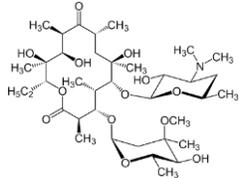
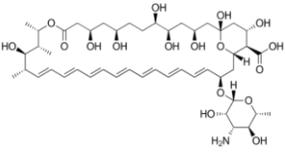
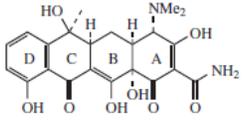
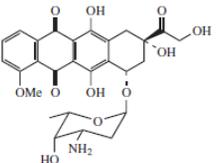
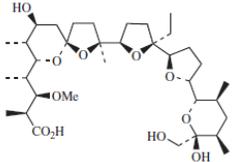
Para la generación de metabolitos secundarios es necesaria la utilización y combinación de diferentes “bloques de construcción” (Building Blocks) que pueden ser basados en aminoácidos, amoniácidos no protéicos o basados en productos del metabolismo primario, como el acetyl coenzima A (acetyl-CoA), el ácido shikímico, el ácido mevalónico y el metileritritol fosfato (Dewick 2009).

De esta manera, metabolitos secundarios tipo péptidos, péptidos modificados, péptidos no ribosomales, proteínas, poliaminas y alcaloides son conformados por medio de bloques de aminoácidos o aminoácidos no protéicos como la L-Ornitina, mientras que fenoles, poliquétidos, poliactenos, prostaglandinas, ácidos grasos, macrólidos y compuestos aromáticos tipo antraquinonas y tetraciclinas provienen de la ruta biosintética del acetato; ácidos fenólicos, lignanos, quinonas, ácido cinámico, cumarinas, flavonoides, poliquétidos aromáticos, derivados del ácido benzoico y alcaloides son generados por la vía del shikimato, y metabolitos tipo terpenoides y esteroides son originados a través de la vía del mevalonato y del metileritritol fosfato. Adicionalmente, es posible encontrar metabolitos secundarios sintetizados a partir de carbohidratos o de la combinación de los anteriores, haciendo que la variedad, diversidad estructural y potencial bioactivo de los mismos se incremente (Dewick 2009).

Las rutas biosintéticas más conocidas para la generación de metabolitos secundarios bioactivos en actinobacterias involucran como building blocks, unidades de acetato, péptidos, proteínas y otros derivados de aminoácidos y carbohidratos (Tabla 1) y dependiendo de la estructura química y de su blanco de acción, los metabolitos secundarios se clasifican en familias o tipos (Evangelista & Moreno 2007) (Figura 2)

Tabla 1. Algunos metabolitos secundarios bioactivos en *Streptomyces* sp. (Adaptado y modificado de Dewick)

NOMBRE	ORGANISMO PRODUCTOR	TIPO	RUTA BIOSINTÉTICA	ACCIÓN		
Lipstatina	<i>Streptomyces toxytricini</i>	Policétido	Aceta to	Inhibición de la lipasa pancreática		
Eritromicina A	<i>Saccharopolyspora erythraea</i>			Macrólido	Antibacterial	
Oleandomicina	<i>Streptomyces antibioticus</i>				Antibacterial	
Espiromicina I	<i>Streptomyces ambofaciens</i>				Antibacterial	
Tilosina	<i>Streptomyces fradiae</i>				Antibacterial	
Ascomicina	<i>Streptomyces hygroscopicus</i>				Inmunosupresor	
Tacrolimus	<i>Streptomyces tsukubaensis</i>				Inmunosupresor	
Rapamicina	<i>Streptomyces hygroscopicus</i>				Inmunosupresor	
Rifamicina	<i>Amycolatopsis mediterranei</i>				Antibacterial	
Avermectina	<i>Streptomyces avermectilis</i>				Antihelmítico, insecticida, acaricida	
Amfotericina B	<i>Streptomyces nodosus</i>				Macrólido polieno	Antifúngico
Nistatina A	<i>Streptomyces noursei</i>					Antifúngico
Tetraciclina	<i>Streptomyces aureofaciens</i>				Tetraciclina	Antibacterial
Clortetraciclina	<i>Streptomyces aurofaciens</i>					Antibacterial
Oxytetraciclina	<i>Streptomyces rimosus</i>					Antibacterial
Daunorubicina	<i>Streptomyces coeruleorubicus</i>				Antraciclina	Antitumoral
Doxorubicina	<i>Streptomyces peuceticus</i>	Antitumoral				
Monensina	<i>Streptomyces cinnamomensis</i>	Poliéter	Antibacterial			
Lasalocida	<i>Streptomyces lasaliensis</i>		Antibacterial			
Ácido gálico	<i>Microcystis aeruginosa</i>	Aminoácidos aromáticos y derivados del ácido benzoico	Shikimato	Componente de taninos		
Cloramfenicol	<i>Streptomyces venezuelae</i>			Antibacterial		
Capreomicina	<i>Streptomyces capreolus</i>	Péptido no ribosomal	Peptidos, proteínas y otros derivados de aminoácidos	Antibacterial		
Daptomicina	<i>Streptomyces roseosporus</i>			Antibacterial		
Vancomicina	<i>Amycolatopsis orientalis</i>			Antibacterial		
Bleomicina	<i>Streptomyces verticillus</i>			Antibacterial, antitumoral		
Streptogramina	<i>Streptomyces virginiae</i>			Antibacterial		
Virginiamicina	<i>Streptomyces virginiae</i>			Antibacterial		
Pristinamicina	<i>Streptomyces virginiae</i>			Antibacterial		
Cicloserina	<i>Streptomyces garyphalus; Streptomyces lavendulae</i>			Antibacterial		
Teicoplanina	<i>Actinoplanes teichomyceticus</i>			Antibacterial		
Dactinomomicina	<i>Streptomyces parvullus</i>			Antibacterial, Citotóxico		
Cefoxitina	<i>Streptomyces clavuligerus</i>			Carbapenemos y Cefalosporinas	Péptidos modificados	Antibacterial
Tienamicina	<i>Streptomyces cattleya</i>					Antibacterial
Ácido clavulánico	<i>Streptomyces clavuligerus</i>					Antibacterial
Ácido olvánico	<i>Streptomyces olivaceus</i>	Antibacterial				
Ácido carba pen-2-em-3-carboxílico	<i>Erwinia carotovora</i>	Aminoglicósidos	Carbohidratos	Antibacterial		
Deoxynojirimicina	<i>Streptomyces sp</i>			Antibacterial, antiviral, citotóxico		
Estreptomomicina	<i>Streptomyces griseus</i>			Antibacterial		
Gentamicina	<i>Micromonospora purpurea</i>			Antibacterial		
Kanamomicina	<i>Streptomyces kanamyceticus</i>			Antibacterial		
Neomicina	<i>Streptomyces fradiae</i>			Antibacterial		
Acarbosa	<i>Actinoplanes sp</i>			Retrasa la liberación de glucosa		
Lincomomicina	<i>Streptomyces lincolnensis</i>			Antibacterial		

METABOLITO SECUNDARIO		TIPO
Eritromicina		Policétido - Macrólido Anillo de lactona de 12 a 16 átomos de carbono que contiene dos o más azúcares
Amfotericina B		Policétido - Macrólido polieno Anillo de lactona que varía de 26 a 38 átomos de carbono con dobles enlaces conjugados
Tetraciclina		Policétido - Tetraciclina Cuatro anillos de 6 átomos en disposición lineal
Doxorubicina		Policétido - Antraciclina Cuatro anillos de 6 átomos en disposición lineal procedente de derivado de antraquinonas
Monensina		Poliéter Anillos de tetrahidrofurano junto a una cadena básica

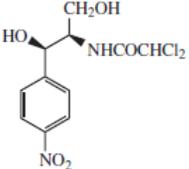
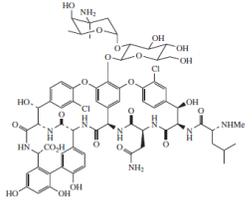
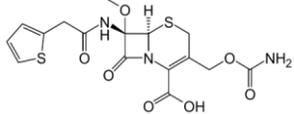
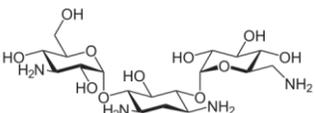
METABOLITO SECUNDARIO		TIPO
Cloramfenicol		Aminoácidos aromáticos y derivados del ácido benzoico Fenicol, derivado del ácido dicloroacético con un nitrobenzenceno
Vancomicina		Péptido no ribosomal Sintetizado por sintasas peptídicas no ribosomales independientes de ARN mensajero. Contienen aminoácidos no-proteinogénicos y modificaciones postranscripcionales
Cefoxitina		β lactámico - Cefalosporina Presencia de una amida cíclica de 4 lados
Kanamicina		Aminoglicósido Oligosacáridos conformados por aminoazúcares y un anillo de 6 miembros alicíclico con sustituyentes hidroxilo y amino

Figura 2. Nombre, estructura química y tipo de metabolito secundario de algunos productos naturales bioactivos extraídos de *Streptomyces* sp (Evangelista & Moreno 2007)

1.4. PROBLEMAS ASOCIADOS AL BIODESCUBRIMIENTO DE PRODUCTOS NATURALES

Aproximadamente más de 30.000 productos naturales bioactivos han sido extraídos a partir de actinobacterias desde el inicio del siglo XX (Carrano 2015), teniendo una época de oro en el entre 1960 y 1980. Sin embargo, a partir de la década de los 80's la extracción y detección de metabolitos bioactivos ya estudiados se hizo evidente, conocido como un fenómeno de “redescubrimiento”, el cual fue catalogado como una problemática a resolver en el área de la bioprospección en microorganismos (Taylor 2013; Baltz 2006).

La visualización de esta problemática y el deseo continuo de obtener nuevos agentes bioactivos a partir de microorganismos conllevó al planteamiento de nuevas metodologías de investigación que permitieran abrir caminos hacia el biodescubrimiento en esta fuente natural. Se ha observado que la exploración de nuevos hábitats distintos a lo comúnmente estudiado que en el caso de las actinobacterias es el suelo, el uso de técnicas de aislamiento adecuadas y el planteamiento de estrategias de dereplicación para el análisis de muestras biológicas (Gaudencio 2015; Subramani 2013; VanMiddlesworth 1998), pueden permitir no solo la detección y aislamiento de cepas de microorganismos de difícil crecimiento en condiciones *in vitro*, sino también la detección y extracción de metabolitos bioactivos aún no conocidos y de posible utilidad para el hombre.

1.4.1. Exploración de nuevos hábitats

Debido a las características propias de su ciclo biológico y de su morfología, las actinobacterias pueden establecerse y adecuarse en varios hábitats (Chaudhary HS et al., 2013; Subramani R & Aalbersberg W 2013). Generalmente se observa su crecimiento en suelos con condiciones de salinidad, temperatura y pH neutras, aunque el número y la variedad de actinomicetos presentes en cualquier muestra de suelo está influenciado por la localización geográfica, temperatura, el tipo de suelo, pH, contenido de materia orgánica, actividades agrícolas, aireación, disponibilidad de nutrientes, contenido de humedad y vegetación (Arifuzzaman et al., 2010). Conjuntamente se pueden aislar actinomicetos extremófilos (*Actinopyspora halophila*, *Streptimonospra salina*,

Catenulispora sp, Microcella sp) (Ramirez N et al., 2006; Bull AT. 2011; Goodfellow M. 2012) y pueden encontrarse ampliamente distribuidos en diferentes tipos de hábitats, encontrando géneros y especies distintas en diferentes tipos de suelo, medios acuáticos (marinos y salobres), cuevas, desiertos y en simbiosis con plantas e incluso insectos (Subramani R and Aalbersberg W 2013). Algunos de los géneros encontrados hasta el momento dependiendo del hábitat estudiado son los siguientes (Tabla 2):

Tabla 2. Géneros de actinobacterias aislados de diferentes ambientes con biosíntesis de productos naturales bioactivos. Se entiende como ambientes extremos: hábitats con condiciones altas o bajas de temperatura, sal, pH, radioactividad, presión atmosférica (Bull AT 2011). Océanos (Jensen PR et al., 2005; Subramani R & Aalbersberg W 2013). Lagos-Ríos (Zaitlin B & Watson S 2006; Jiang CL & Xu L. 1996); Suelos (El-Tarabilya KA & Sivasithamparam K. 2006). Cuevas (Tiwari K 2014; Lee 2006; Jurado 2005; Groth 1999; Nakaew 2009). Plantas (Inahashi 2011; Tiwari 2014); Insectos (Madden 2013, Poulsen 2011)

AMBIENTES EXTREMOS	OCEÁNOS	RIOS-LAGOS	SUELO	CUEVAS	PLANTAS	INSECTOS
<i>Actinopolyspora</i>	<i>Actinoalloteichus</i>	<i>Actinomadura</i>	<i>Actinomadura</i>	<i>Actinocorallia</i>	<i>Actinophytocola</i>	<i>Actinoplanes</i>
<i>Amycolatopsis</i>	<i>Actinomadura</i>	<i>Actinomyces</i>	<i>Actinoplanes</i>	<i>Agromyces</i>	<i>Phytohabitans</i>	<i>Micromonospora</i>
<i>Citricoccus</i>	<i>Amycolatopsis</i>	<i>Actinoplanes</i>	<i>Ampullariella</i>	<i>Amycolatopsis</i>	<i>Streptomyces</i>	<i>Streptomyces</i>
<i>Halomonas</i>	<i>Corynebacterium</i>	<i>Kitasatospora</i>	<i>Microbispora</i>	<i>Beutenbergia</i>	<i>Streptosporangium</i>	
<i>Isoptericola</i>	<i>Dermacoccus</i>	<i>Microbispora</i>	<i>Micropolyspora</i>	<i>Catellatospora</i>		
<i>Jiangella</i>	<i>Dietzia</i>	<i>Micromonospora</i>	<i>Microtetraspora</i>	<i>Knoellia</i>		
<i>Jonesia</i>	<i>Gordona</i>	<i>Micropolyspora</i>	<i>Nocardia</i>	<i>Nocardia</i>		
<i>Kocuria</i>	<i>Kitasatospora</i>	<i>Microtetraspora</i>	<i>Nocardiopsis</i>	<i>Nonomuraea</i>		
<i>Kribbella</i>	<i>Kocuria</i>	<i>Nocardia</i>	<i>Streptomyces</i>	<i>Saccharothrix</i>		
<i>Liabella</i>	<i>Marinospora</i>	<i>Nocardiopsis</i>	<i>Streptosporangium</i>	<i>Spirillospora</i>		
<i>Marinococcus</i>	<i>Micromonospora</i>	<i>Promicromonospora</i>	<i>Thermoactinomyces</i>	<i>Streptomyces</i>		
<i>Massilia</i>	<i>Nocardia</i>	<i>Rhodococcus</i>	<i>Thermomonospora</i>			
<i>Microbacterium</i>	<i>Rhodococcus</i>	<i>Saccharomonospora</i>				
<i>Myceligenans</i>	<i>Rhodococcus</i>	<i>Saccharopolyspora</i>				
<i>Naxibacter</i>	<i>Saccharomonospora</i>	<i>Streptomyces</i>				
<i>Nesterenkonia</i>	<i>Salinibacterium</i>	<i>Streptosporangium</i>				
<i>Nocardia</i>	<i>Salinospora</i>	<i>Thermoactinomycetes</i>				
<i>Nocardiopsis</i>	<i>Streptomyces</i>	<i>Thermomonospora</i>				
<i>Prauserella</i>	<i>Tsukamurella</i>	<i>Thermopolyspora</i>				
<i>Rhodococcus</i>	<i>Verrucosispora</i>					
<i>Saccharomonospora</i>	<i>Williamsia</i>					
<i>Saccharopolyspora</i>						
<i>Sphingomonas</i>						
<i>Streptomonospora</i>						
<i>Streptomyces</i>						
<i>Thermobifida</i>						
<i>Virgibacillus</i>						

Aunque el estudio bioprospectivo de las actinobacterias tiene su base en el aislamiento de estos microorganismos a partir del suelo, encontrar géneros de este grupo asociados a hábitats tan distintos como los mencionados anteriormente, abre grandes oportunidades para sugerir que posibles nuevos productos naturales pueden llegar a ser detectados y extraídos a partir de los microorganismos que allí se encuentren.

Se entiende como ambiente inusual, aquellas zonas poco exploradas por el hombre y con grandes vacíos de conocimiento. Los ambientes extremos, hábitats acuáticos y relaciones simbióticas con otros seres vivos, son considerados generalmente como hábitats inusuales para el estudio de actinobacterias, y estos cobran especial importancia ya que en ellos se supone una diversidad biológica diferente y distintas condiciones y productos metabólicos como resultado de un proceso adaptativo ante condiciones ambientales diferentes (Tanner K 2017).

Este aspecto, confiere a las actinobacterias, un gran potencial de estudio, generando expectativas acerca de la identificación de los ejemplares que habitan en diferentes zonas y cómo este hecho puede asociarse con la presencia de nuevos metabolitos secundarios, importantes para estudios bioprospectivos.

1.4.1.1 En el agua...

Para el estudio de actinobacterias en ambientes acuáticos, se debe tener en cuenta la relación existente entre los cuerpos de agua y los suelos circundantes. Tom Cross (1981) plantea que la mayoría de los aislamientos de actinobacterias encontrados en cuerpos de agua, generalmente provienen de lixiviados provenientes de terrenos circundantes, ya sea campos de ganadería, materia orgánica cercana o sedimentos de las riberas aledañas. Algunos de los géneros de actinobacterias que mayormente se encuentran en este tipo de muestras son: *Thermoactinomyces* sp, *Rhodococcus coprophilus*, *Micromonospora* sp, *Streptomyces* sp, *Actinoplanes* sp y aunque estas especies se encuentran también en el suelo, la característica común es el poseer esporas con la capacidad de resistir condiciones ambientales adversas, mediante la generación de endosporas o manteniendo largos periodos de dormancia (Cross 1981). Entre los anteriores, los géneros mayoritarios son en su orden *Micromonospora* sp y *Streptomyces* sp, encontrándose el primero asociado a aguas profundas y el segundo aguas

superficiales o de riveras (Cross 1981). Otros géneros encontrados incluyen ejemplares de *Actinomadura* sp, *Mycobacterium* sp, *Arthrobacter* sp, *Corynebacterium* sp y *Nocardia* sp (Anandan 2016). Específicamente en el océano, se han logrado aislar actinobacterias del género *Dietzia*, *Rhodococcus*, *Streptomyces*, *Salinispora*, *Marinophilus*, *Salinibacterium* y *Verrucosispora* (Anandan 2016). Aunque también se comparte la teoría de lexiviamiento de las esporas de este tipo de actinobacterias a partir de un origen terrestre (Cross 1981), la característica principal de estas es su capacidad de adaptación a ambientes extremos como altas salinidades y presiones y cambios de temperatura, características propias de ambientes oceánicos (fondo marino, hidrotermas, abismos, sistema digestivo de vertebrados a fondo marino) (Kurtböke en Wink et al., 2017; Anandan 2016). La capacidad de adaptación a este tipo de ambientes y su probable disposición a generar metabolitos bioactivos no conocidos a partir de aislados microbianos del suelo, ha generado particular interés en el estudio bioprospectivo de las actinobacterias de origen marino, llevando a descubrimiento de compuestos nuevos de uso terapéutico como la Salinosporamida A, extraída de *Salinispora* sp y la Abisomicina de *Verrucosispora* sp (Manivasagan, P 2014). Sin embargo, es poco lo que se conoce acerca del potencial bioprospectivo de las actinobacterias de ríos o lagos, teniendo algunos reportes aislados en Asia y África en donde cepas de *Micromonospora*, *Micromonospora*, *Actinopolyspora*, *Sachharopolyspora* y *Actinosynemma* aisladas de los ríos Nilo, Nambul y Tyume, mostraron potencial antibacteriano frente a diferentes cepas de bacterias Gram positivas y Gram negativas como *Staphylococcus aureus*, *Micrococcus luteus*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, así como también potencial antifúngico frente a cepas de *Candida albicans* y *Aspergillus niger* (Ningthoujam 2009, 2011; Atta 2009; Rifaat 2003). Más recientemente Mallowney y colaboradores en 2015 lograron extraer una diazaquinomicina capaz de inhibir el crecimiento de una cepa multirresistente de *Micobacterium tuberculosis* H_{37RV} a partir de un aislado de *Micromonospora* sp encontrado en uno de los Grandes Lagos de Michigan (USA), lo cual ha generado un creciente interés acerca de este tipo de microorganismos.

1.4.2 Técnicas de aislamiento

Aunque las actinobacterias pueden ser aisladas de ambientes con diferentes grados de temperatura, acidez y salinidad (dependiendo del hábitat a estudio), en general a estos microorganismos se les considera como mesofílicos y de fácil manejo en condiciones *in vitro*, manteniendo temperaturas de crecimiento entre los 25-35°C, rangos de pH entre 5.0-9.0 y porcentajes de salinidad entre el 3 y 32% (Mohammadipanah F & Dehghani M en Wink et al., 2017). Para su aislamiento a partir de diferentes muestras biológicas, se han desarrollado diferentes metodologías, como por ejemplo el uso de medios ricos en nutrientes, uso de pretratamientos físico-químicos entre otros:

1.4.2.1 Medios selectivos

Las actinobacterias tienen la facilidad de crecer y mantenerse utilizando diferentes fuentes de carbono y nitrógeno como monosacáridos, disacáridos (glucosa, glicerol, maltosa), polisacáridos (almidón), amonio y urea, debido a la producción de enzimas hidrolíticas como celulasas, proteasas, aminopeptidasas, metaloproteasas, α -amilasas, α -glucanasas y quitinasas (Mohammadipanah & Dehghani en Wink et al., 2017, Genilloud en Wink et al., 2017). Teniendo en cuenta lo anterior, compuestos como el extracto de malta, extracto de levadura y la avena, son comúnmente utilizados para la fabricación de medios que favorezcan un incremento en el crecimiento de la población y facilidad de manutención (Mohammadipanah & Dehghani en Wink et al., 2017, Genilloud en Wink et al., 2017). Diferentes tipos de medios pueden crearse según las características propias de las actinobacterias que se desean aislar y dependiendo de la combinación de fuentes de carbono y nitrógeno incluidas (Jiang et al., 2013; Tiwari y Gupta 2012). Estos medios son descritos ampliamente en el *International Streptomyces Project-ISP* (Shirling & Gottlieb 1966), en los trabajos de Hayakawa y colaboradores (1987-2004) y en el capítulo de libro "*Isolation and Cultivation Methods of Actinobacteria*" (Jiang 2016).

1.4.2.2 Pretratamientos sobre la muestra biológica

Debido a que el ciclo de vida de estos microorganismos comienza con la implantación de una espora en un sustrato rico en nutrientes, en la mayoría de los casos las muestras biológicas deben

ser manipuladas con el fin de incrementar la probabilidad de que estas esporas puedan ser liberadas al medio (Sahu 2017). La manipulación de la muestra biológica, previa a la siembra de la misma, se realiza mediante el uso de pretratamientos, que en su mayoría utilizan elementos físicos y/o químicos para la obtención de esporas de actinobacterias. En principio, el uso de estos pretratamientos estaba enfocado a la esterilización del material biológico, con el fin único de eliminar microorganismos no deseados (Wang 2013). Sin embargo, algunos microorganismos con resistencia a estos pretratamientos pueden permanecer en la muestra, facilitando su aislamiento. Las características propias de la pared celular de las actinobacterias permiten que estos microorganismos no solo persistan ante el uso de diferentes pretratamientos físico-químicos (Subramani & Aalbersberg 2013), sino que también es probable que estos métodos promuevan la activación de esporas en estado latente (Li et al., 2002). Algunos pretratamientos físico-químicos utilizados son: carbonato de calcio (CaCO_3), solventes como el fenol, agentes antimicrobianos, secado por aire caliente, ondas electromagnéticas, radiación ultravioleta o combinaciones de las anteriores (Natsume et al., 1989; Otaguro et al., 2001; Hayakawa et al., 1991; Hayakawa et al., 2004; Bredholt et al., 2008; Subramani & Aalbersberg 2013; Khanna et al., 2011; Tiwari & Gupta 2012; Niyomvong et al., 2012; Qiu et al., 2008; Wang et al., 2013; Mishra et al., 2013; Komarova et al., 2008; Betts & Williams 1999; Naveena et al., 2012)

1.4.2.3 Cámaras de difusión

A pesar de las anteriores estrategias, la mayoría de los microorganismos permanece poco estudiada posiblemente a la dificultad de éstos a adecuarse a condiciones *invitro* (Genilloud 2017). Una metodología reciente para el aislamiento de actinobacterias de difícil observación, es el uso de cámaras de difusión con medios nutritivos en su interior, las cuales son sumergidas o enterradas en el sitio de muestreo para mantener las condiciones naturales propias de los microorganismos que allí se encuentren (Bollmann 2007). Los medios que se encuentran al interior de estos dispositivos deben ser inoculados previamente con muestra biológica del sitio de muestreo, solidificados y separados del ambiente circundante por membranas permeables con poros de $0.03 \mu\text{m}$ de diámetro, permitiendo el paso de moléculas asociadas al hábitat y que pueden influir en el crecimiento y manutención de los microorganismos que allí se encuentren. Las colonias recolectadas, son inoculadas a nuevas cámaras de difusión para repetir el proceso y

finalmente éstas son llevadas a cajas de Petri en condiciones *in vitro* para su estudio (Bollmann 2007). Sin embargo, este proceso requiere de un tiempo considerable para el aislamiento y purificación de colonias. El *IChip* o Chip de aislamiento, permitió acelerar la metodología, agrupando en una sola lámina, cientos de cámaras de difusión, cada una inoculada con un microorganismo dependiendo del grado de dilución de la muestra biológica utilizada (Nichols 2010). Una variación a esta metodología, utilizando medio estéril sin inocular y membranas con poros de 0.2 μm , permite el paso de actinobacterias a la cámara de difusión, cuando ésta es sumergida en el sitio de estudio. De esta manera se han logrado aislar géneros poco estudiados como *Dactylosporangium*, *Catellatospora*, *Catenulispora*, *Lentzea* y *Streptacidiphilus* (Lewis K. 2010).

1.4.3 Estrategias de dereplicación

Son aproximadamente 31000 los productos naturales extraídos a partir de microorganismos y de ellos más de 20000 presentan alguna actividad biológica relevante. Un 45% - 48% de estos productos provienen de las actinobacterias (Berdy 2005; Carrano 2015), hecho que marca un importante punto de inicio para el biodescubrimiento de nuevos compuestos. Sin embargo, durante los últimos 15 años se ha registrado un creciente desinterés en la industria farmacéutica frente a los posibles avances que se pueden encontrar en esta área, no solo a causa del re-descubrimiento de productos naturales conocidos, sino también al esfuerzo económico y de tiempo necesario durante el proceso de biodescubrimiento (Carrano 2015). En actinobacterias, algunos de los compuestos bioactivos con mayor tasa de re-descubrimiento son: Norcardamina, Actinomicina D – C2, Geldamicina, Oligomicina, Estreptomycin, Aureotina, Cloramfenicol (Blatz 2007, Genilloud 2011, Carrano 2015). Sin embargo, la necesidad de nuevos compuestos bioactivos es imperativa en la industria farmacéutica como mecanismo para contrarrestar enfermedades de difícil manejo o en casos en que los compuestos ya conocidos no tengan efecto sobre el bienestar de los pacientes (Guadencio 2015). Actualmente, las estrategias de dereplicación son utilizadas para minimizar el esfuerzo en costo y tiempo dentro de los procesos de biodescubrimiento (Wink et al., en Wink et al., 2017, Yang 2013), detectando y dejando de lado metabolitos ya estudiados en las primeras fases de los procesos de análisis de muestras (Ito 2014). Las herramientas utilizadas en estos procesos se basan en las características taxonómicas

de las muestras, su bioactividad y los perfiles químicos de las mismas (Ito 2014, Forner 2013, VanMiddlesworth 1998).

Ito, en el 2014, describe los pasos necesarios para llevar a cabo una estrategia de dereplicación conducente al biodescubrimiento de productos naturales bioactivos a partir de microorganismos:

1. Las primeras fases involucran la detección y selección de las cepas a analizar, en especial cuando se trabajan grandes colecciones biológicas. En este caso, las características biológicas de los ejemplares deben ser tomadas como base para una primera selección, enfocándose únicamente en rasgos taxonómicos y/o genéticos (Forner 2013). También es posible realizar una segunda selección de microorganismos según actividades biológicas, si el enfoque final no solo es la extracción de productos naturales nuevos sino también que estos tengan bioactividades asociadas (Dias 2012).
2. En la segunda fase del protocolo de dereplicación, se deben establecer procesos para el cultivo masivo de microorganismos, extracción de metabolitos secundarios y los equipos necesarios para el análisis de perfiles químicos de los extractos. La realización de cultivos masivos a microescala permite la fermentación de grandes colecciones biológicas de microorganismos, utilizando una o varias fuentes de carbono y nitrógeno, o combinaciones de éstas, con el fin de fomentar la expresión y síntesis de diferentes tipos de metabolitos secundarios. Estos pueden realizarse en volúmenes de 750 μ L a 10 mL, ya sea en placas de 96 pozos o en tubos de cultivo, permitiendo un manejo eficiente del espacio y equipos (Genilloud 2011, Forner 2013). La extracción de los metabolitos secundarios se realiza mediante la utilización de uno o varios solventes orgánicos, dependiendo de la polaridad de los mismos (Cannell 1999), y su identificación depende del uso de equipos que permitan la observación de las características físicas de los mismos como por ejemplo: (High Performance Liquid Chromatography acoplada a masas (HPLC-MS), Ultra-High Pressure Liquid Chromatography acoplada a masas (UHPLC-MS), Nuclear Magnetic Resonance (NMR), MALDI TOF-MS. Señales idénticas en diferentes extractos pueden ser detectadas de acuerdo a la información de los perfiles cromatográficos: tiempos de retención (rt), espectros de masa (MS), perfil UV y espectros de resonancia

magnética nuclear (NMR) (Wink et al en Wink et al., 2017), Yang 2013) y estas pueden ser relacionadas a las características físicas de determinadas moléculas.

3. Para la identificación de los compuestos relacionados a los picos detectados, existen bases de datos de productos naturales conocidas como: *Dictionary of Natural Products* (DNP) con 30.000 compuestos, *AntiBase* con 43000 compuestos extraídos de microorganismos, *The Marine Natural Products Database* (MarinLit) y *SciFinder* (Wink et al en Wink et al., 2017, Dias 2012).
4. Picos no identificados mediante la búsqueda en bases de datos, son sugeridos como potenciales nuevos compuestos o posibles nuevos productos naturales. En este caso se debe realizar un nuevo cultivo y extracción de la cepa que contiene la señal a mayores volúmenes, purificación del compuesto y elucidación estructural.

1.5 ESTUDIOS DE AISLAMIENTO DE ACTINOBACTERIAS EN COLOMBIA

En nuestro país, los estudios de aislamiento de actinobacterias se han llevado a cabo a partir de muestras de suelo (Cardona et al., 2009), principalmente en investigaciones enfocadas a su capacidad de biorremediación (Rueda C et al., 2009) y como promotores de crecimiento en plantas (Otero 2011; Franco 2008). Poco se conoce acerca del potencial bioactivo de aislados de otros ambientes, en especial de fuentes acuáticas, las cuales pueden contener información aún no conocida acerca de la diversidad de *Actinobacterias* presentes y su potencial bioactivo. Uno de los sistemas hidrográficos de mayor amplitud en el país, es el presente en la Orinoquía Colombiana el cual comprende un 30.4% del territorio nacional, abarcando departamentos como Arauca, Casanare, Guanía, Guaviare, Meta, Vichada, Cundinamarca, Santander, Norte de Santander y Vaupés (ODDR 2013). Aunque se han descrito numerosos reportes acerca de su biodiversidad en cuanto a mamíferos, aves, peces, reptiles y vegetación, la investigación en microorganismos es aún incipiente requiriendo un mayor esfuerzo en esta área (Pastrana 2016, Correa et al., 2005).

1.6 OBJETIVOS DE LA INVESTIGACIÓN

Bajo el anterior escenario, la finalidad de este proyecto es determinar el potencial bioactivo de Actinobacterias cultivables, aisladas de la ribera del Río Arauca, mediante la conjunción de diferentes estrategias de aislamiento que permitan encontrar especies de Actinobacterias adaptadas a este hábitat acuático y que sean potencialmente productoras de metabolitos secundarios de importancia farmacéutica.

Las estrategias planteadas se encuentran descritas a manera de cuatro capítulos, los cuales describen las diferentes metodologías biológicas y químicas utilizadas para lograr identificar un producto natural bioactivo y sugerido como nuevo compuesto, proveniente de un aislado de actinobacterias extraído a partir de sedimentos de las riberas del río Arauca (Colombia).

En el capítulo 1, se realiza una profundización acerca de la importancia del estudio de microorganismos como fuente natural de compuesto bioactivos, enfocando el análisis al género *Streptomyces*, género con mayor número de publicaciones a nivel mundial en esta área. Se acerca al lector a la problemática en el biodescubrimiento de productos naturales bioactivos a partir de microorganismos y se desglosan diferentes metodologías para el aislamiento y extracción de posibles nuevos compuestos con actividad biológica.

Las estrategias para el aislamiento de actinobacterias colectadas a partir de sedimentos de las riberas del río Arauca (Colombia), conformación del banco de actinobacterias de la Universidad de La Sabana (ActinosUsab), dereplicación biológica mediante priorización de aislados bioactivos por selección de actividad biológica y aproximación acerca de la abundancia de aislados bioactivos de actinobacterias, son explicadas en el Capítulo 2.

Dereplicación química a través de estudios metabolómicos sobre extractos bioactivos en actinobacterias son explicados en el Capítulo 3. Los resultados de las estrategias de dereplicación biológica y químicas utilizadas en el capítulo 2 y 3 permiten el aislamiento de un posible nuevo compuesto extraído a partir de uno de los aislados de actinobacterias del banco de microorganismos ActinosUsab. La elucidación estructural del compuesto es descrita en el Capítulo 4. Se describe su bioactividad a nivel antimicrobiano y citotóxico y la importancia de este

en estudios colombianos a cerca del bio-descubrimiento de compuestos naturales bioactivos a partir de microorganismos y su impacto en la industria farmacéutica.

Este trabajo concluye en el capítulo 5, exponiendo la utilidad de las metodologías empleadas, los resultados obtenidos y las perspectivas generadas alrededor de los mismos, como punto de inicio hacia el incremento de estudios sobre la microbiota asociada a hábitats acuáticos de la Orinoquía Colombiana, contribuyendo a la búsqueda de nuevos metabolitos que ayuden a sopesar la creciente tasa de resistencia antimicrobiana que se vive en la actualidad (Trenozhnikova et al., 2012) y a ampliar el repertorio de compuestos candidatos para el tratamiento de enfermedades tumorales y procesos inflamatorios (Jiao et al., 2013).

1.7 BIBLIOGRAFIA

1. Anandan R, Dharumadurai D & Manogaran GP. (2016). An Introduction to Actinobacteria. *In: Actinobacteria - Basics and Biotechnological Applications*. Dhanasekaran D y Jiang Y. Intech Ed. 2016. Chapter 1.
2. Arifuzzaman M, Khatun MR, Rahman H. (2010). Isolation and screening of actinomycetes from Sundarbans soil for antibacterial activity. *Afr. J. Biotechnol.*, 9: 4615-4619.
3. Atta HM, Dabour M & Desoukey SG. (2009). Sparsomycin Antibiotic Production by *Streptomyces* sp. AZ-NIOFD1: Taxonomy, Fermentation, Purification and Biological Activities. *American-Eurasian J. Agric. & Environ. Sci.*, 5 (3): 368-377.
4. Baltz RH. (2006). Marcel Faber Roundtable: Is our antibiotic pipeline unproductive because of starvation, constipation or lack of inspiration?. *J Ind Microbiol Biotechnol.* 33: 507-513
5. Baltz RH. (2007). Antimicrobials from Actinomycetes: Back to the Future. *Microbe*. Volume 2, Number 3
6. Barka EA, Vatsa P, Sanchez L, Gaveau-Vaillant N, Jacquard C, Klenk HP, Clément C, Ouhdouch Y, van Wezeld GP. (2016). Taxonomy, Physiology, and Natural Products of Actinobacteria. *Microbiol Mol Biol Rev.* 80:1-43.
7. Bentley SD, Chater KF, Cerdeño AM, Challis GL, Thomson NR, James KD, Harris DE, Quail MA, Kieser H, Harper D, Bateman A, Brown S, Chandra G, Chen CW, Collins M, Cronin A, Fraser A, Goble A, Hidalgo J, Hornsby T, Howarth S, Huang CH, Kieser T, Larke L, Murphy L, Oliver K, O'Neil S, Rabbinowitsch E, Rajandream MA, Rutherford K, Rutter S, Seeger K, Saunders D, Sharp S, Squares R, Squares S, Taylor K, Warren T, Wietzorrek A, Woodward J, Barrell BG, Parkhill J, Hopwood DA. (2002). Complete genome sequence of the model actinomycete *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Nature*. Vol 417.
8. Bérdy J. (2005). Bioactive Microbial Metabolites - A Personal View. *J. Antibiot.* 58(1): 1-26
9. Berleman JE & Kirby JR. (2007). Multicellular Development in *Myxococcus xanthus* Is Stimulated by Predator-Prey Interactions. *Journal of Bacteriology*. Vol 189. No 15. p5675-5682
10. Bertrand S, Bohni N, Schnee S, Schumpp O, Gindro K, Wolfender JL. (2014). Metabolite induction via microorganism co-culture: A potential way to enhance chemical diversity for drug discovery. *Biotechnology Advances* 32. 1180-1204
11. Betts GD & Williams A. (1999). Ultrasonic standing waves: Inactivation of foodborne microorganisms using power ultrasound. *Encyclopedia of Food Microbiology*, Volume 3. p 659-664
12. Bollmann A, Lewis K & Epstein S. (2007). Incubation of Environmental Samples in a Diffusion Chamber Increases the Diversity of Recovered Isolates. *Applied and Environmental Microbiology*. p. 6386-6390, Vol. 73, No. 20
13. Bredholt H, Fjærvik E, Johnsen G & Zotchev SB. (2008). Actinomycetes from Sediments in the Trondheim Fjord, Norway: Diversity and Biological Activity. *Mar. Drugs*, 6(1), 12-24

14. Bull AT. (2011). Actinobacteria of the Extremobiosphere. In: Horikoshi, Koki and Antranikian, Garabed and Bull, Alan T. and Robb, Frank T. and Stetter, Karl O., eds. *Extremophiles Handbook*. Springer, pp. 1203-1240. ISBN 978-4-431-53897-4.
15. Cannell RJP. (1999). *Natural Products Isolation*. Humana Press Ed. New Jersey
16. Cardona G, Peña C, Ruiz M. (2009). Comunidades de hongos actinobacterias en tres tipos de vegetación de la Amazonía colombiana: abundancia, morfotipos y el gen 16s ADNr. *Rev Biol Trop*. 57(4):1119-1139
17. Carrano L & Marinelli F. (2015). The relevance of chemical dereplication in microbial natural product screening. *Journal of Applied Bioanalysis*. p. 55-67
18. Casino P, Rubio V, Marina A. (2010). The mechanism of signal transduction by two-component systems. *Current Opinion in Structural Biology*. 20:763–771
19. Chaudhary HS, Yadav J, Shrivastava AR, Singh S, Singh AK, Gopalan N. (2013). Antibacterial activity of actinomycetes isolated from different soil samples of Sheopur (A city of central India). *J. Adv. Pharm. Tech. Res. Vol 4(2)*.
20. Correa, HD, Ruiz, SL, Arévalo, LM. (2005). Plan de acción en biodiversidad de la cuenca del Orinoco – Colombia / 2005 - 2015 – Propuesta Técnica. Bogotá D.C.: Corporinoquia, Cormacarena, I.A.v.H, Unitrópico, Fundación Omacha, Fundación Horizonte Verde, Universidad Javeriana, Unillanos, WWF - Colombia, GTZ – Colombia. 273 p.
21. Cross T. (1981). Aquatic actinomycetes: A critical survey of the occurrence, growth and role of actinomycetes in aquatic habitats. *Journal of Applied Bacteriology*. 50: 391-423
22. Demain AL. (2014). Importance of microbial natural products and the need to revitalize their discovery. *J Ind Microbiol Biotechnol* 41:185–201
23. Dewick PM. (2009). *Medicinal Natural Products: A Biosynthetic Approach*, 3rd Edition. John Wiley & Sons, Ltd.
24. Dias DA, Urban S, Roessner UA. (2012). Historical Overview of Natural Products in Drug Discovery. *Metabolites*. 2, 303-336.
25. El-Tarabilya KA & Sivasithamparam K. (2006). Non-streptomycete actinomycetes as biocontrol agents of soil-borne fungal plant pathogens and as plant growth promoters. *Soil Biology & Biochemistry* 38 pp1505–1520
26. Evangelista Z & Moreno A. (2007). Metabolitos secundarios de importancia farmacéutica producidos por actinobacterias. *BioTecnología*, Vol. 11 No. 3
27. Flärdh K. (2010). Cell polarity and the control of apical growth in *Streptomyces*. *Current Opinion in Microbiology*. 13:758–765
28. Flärdh K & Buttner MJ. (2009). *Streptomyces* morphogenetics: dissecting differentiation in a filamentous bacterium. *Nature*. Vol 7
29. Forner D, Berrué F, Correa H, Duncan K, Kerr R. Chemical dereplication of marine actinomycetes by liquid chromatography–high resolution mass spectrometry profiling and statistical analysis. *Anal Chim Acta*, (2013); 805: 70–79
30. Franco M. (2008). Evaluación de caracteres PGRP en actinobacterias e interacciones de estas rizobacterias con hongos formadores de micorrizas. Tesis Doctoral. Universidad de

- Granada Gaudencio SP & Pereira F. (2015). Dereplication: racing to speed up the natural products discovery process. *Nat Prod Rep.* 32(6):779-810
31. Genilloud O, González I, Salazar O, Martín J, Tormo JR, Vicente F. (2011). Current approaches to exploit actinomycetes as a source of novel natural products. *J Ind Microbiol Biotechnol.* 38:375–389
 32. Genilloud O. (2017). Actinomycetes: still a source of novel antibiotics. *Nat. Prod. Rep.* 34, 1203.
 33. Genilloud O. (2017). Physiology of Actinobacteria. *In: Biology and Biotechnology of Actinobacteria.* Wink J, Mohammadipanah F, Hamedi J. Springer Ed. Switzerland. 2017. Chapter 7.
 34. Goodfellow M. (2012). Phylum XXVI. Actinobacteria phyl. nov. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology: Volume 5: The Actinobacteria,* Springer NY
 35. Groth I, Schumann P, Schuetze B, Augsten K, Kramer I & Stackebrandt E. (1999). *Beutenbergia cavernae* gen. nov. sp. an L-lysine-containing actinomycete isolated from a cave. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 49, 1733–1740.
 36. Hardisson C, Manzanal MB, Salas JA & Suarez JE. (1978). Fine structure, physiology and biochemistry of arthrospore germination in *Streptomyces antibioticus*. *J Gen Microbiol* 105: 203-214
 37. Hayakawa M & Nonomura H. (1987). Humic Acid-Vitamin Agar, a New Medium for the Selective Isolation of Soil Actinomycetes. *J Ferment Technol.* Vol 65. No.5, 501-509.
 38. Hayakawa M, Sadakata T, Kajiura T, Nonomura H. (1991). New Methods for the Highly Selective Isolation of *Micromonospora* and *Microbispora* from Soil. *Journal of Fermentation and Bioengineering.* Vol. 72 No. 5, 320-326
 39. Hayakawa M, Yoshida Y, Limura Y. (2004). Selective isolation of bioactive soil actinomycetes belonging to the *Streptomyces violaceusniger* phenotypic cluster. *Journal of Applied Microbiology,* 96, 973–981
 40. Hotam SC, Bhavana S, Anju RS, Saurabh S. (2013). Diversity and Versatility of Actinomycetes and its Role in Antibiotic Production. *Journal of Applied Pharmaceutical Science* Vol. 3 (8 Suppl 1), pp. S83-S94
 41. Huang T, Lin S. (2017). Microbial Natural Products: A Promising Source for Drug Discovery. *J Appl Microbiol Biochem.* Vol. 1 No. 2:5
 42. Inahashi Y, Matsumoto A, Danbara H, Omura S & Takahashi Y. (2010). *Phytohabitans suffuscus* gen. nov., sp. nov., a novel actinomycete of the family Micromonosporaceae isolated from a plant root. *Int J Syst Evol Microbiol* 60:2652–2658
 43. Ito, T & Masubuchi, M. (2014). Dereplication of microbial extracts and related analytical technologies. *The Journal of Antibiotics.* 67.; 353–360
 44. Janardhan A, Kumar AP, Viswanath B, Saigopal DVR, Narasimha G. (2014). Production of Bioactive Compounds by Actinomycetes and Their Antioxidant Properties. *Biotech Res International* Vol 2014
 45. Jiang CL & Xu L. (1996). Diversity of Aquatic Actinomycetes in Lakes of the Middle Plateau, Yunnan, China. *Applied and Environmental Microbiology.* p. 249–253

46. Jiang Y, Li Q, Chen X y Jiang C. (2016). Isolation and Cultivation Methods of Actinobacteria. *In: Actinobacteria - Basics and Biotechnological Applications*. Dhanasekaran D y Jiang Y. Intech Ed. 2016. Chapter 2.
47. Jiao W, Zhang F, Zhao X, Hu J, Suh JW. (2013). A Novel Alkaloid from Marine-Derived Actinomycete *Streptomyces xinghaiensis* with Broad-Spectrum Antibacterial and Cytotoxic Activities. *PLOS ONE*. vol 8(10)
48. Jurado V, Groth I, Gonzalez JM, Laiz L & Saiz-Jimenez C. (2005). *Agromyces subbeticus* sp. nov., isolated from a cave in southern Spain. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 55, 1897–1901.
49. Khanna M, Solanki R & Lal R. (2011). Selective isolation of rare actinomycetes producing novel antimicrobial compounds. *International Journal of advanced Biotechnology and Research*. Vol 2, Issue 3, pp 357-375
50. Kim DJ, Huh JH, Yang YY, Kang CM, Lee IH, Hyun CG et al.,. (2003). Accumulation of S-adenosyl-L-methionine enhances production of actinorhodin but inhibits sporulation in *Streptomyces lividans* TK23. *J Bacteriol* 185: 592-600.
51. Komarova AS, Likhacheva AA & Zvyagintsev DG. (2008). Influence of Microwave Radiation on Soil Bacteria. *Moscow University Soil Science Bulletin*, Vol. 63, No. 4, pp. 190–195
52. Kurtböke DI. (2017). Ecology and Habitat Distribution of Actinobacteria. *In: Biology and Biotechnology of Actinobacteria*. Wink J, Mohammadipanah F, Hamedi J. Springer Ed. Switzerland. 2017. Chapter 6.
53. Lee B. (2003). Selman A. Waksman, PhD (1888-1973): Pioneer in Development of Antibiotics and Nobel Laureate. *Seminars in Pediatric Infectious Diseases*, Vol 14, No 1: pp 60-63
54. Lewis K. (2010). Challenges and Opportunities in Antibiotic Discovery. *In: Antibiotic Resistance: Implications for Global Health and Novel Intervention Strategies: Workshop Summary*. Choffnes ER, Relman DA y Mack A. National Academies Press. 2010. Appendix A – A11.
55. Li YV, Terekhova LP & Gapochka MG. (2002). Isolation of actinomycetes from soil using extremely high frequency radiation. *Microbiology*, Vol. 71, No. 1, 2002, pp. 105–108.
56. Madden A, Grassetti A, Soriano JAN, Starks PT. (2013). Actinomycetes with Antimicrobial Activity Isolated from Paper Wasp (Hymenoptera: Vespidae: Polistinae) Nests. *Environmental Entomology*, Volume 42, Issue 4, Pages 703–710.
57. Manivasagan P, Venkatesan J, Sivakumar K, Kim SK. (2014). Pharmaceutically active secondary metabolites of marine actinobacteria. *Microbiol Res*; 169, 262–278
58. Mendes MV, Tunca S, Antón N, Recio E, Sola-Landa A, Aparicio JF & Martín JF. (2007). The two-component phoR-phoP system of *Streptomyces natalensis*: Inactivation or deletion of phoP reduces the negative phosphate regulation of pimarin biosynthesis. *Metab Eng* 9: 217-227.
59. Mishra T, Kushwah P, Dholiya K, Kothari V. (2013). Effect of Low Power Microwave Radiation on Microorganisms and other Life Forms. *Advances in Microwave and Wireless Technologies*. 4-11

60. Mohammadipanah F & Dehghani M. (2017). Classification and Taxonomy of Actinobacteria. *In: Biology and Biotechnology of Actinobacteria*. Wink J, Mohammadipanah F, Hamedi J. Springer Ed. Switzerland. 2017. Chapter 4.
61. Mullaney MW, Hwang CH, Newsome AG, Wei X, Tanouye U, Wan B, Carlson S, Barranis NJ, Ainmhire EO, Chen WL, Krishnamoorthy K, White J, Blair R, Lee H, Burdette JE, Rathod PK, Parish T, Cho S, Franzblau SG & Murphy BT. (2015). Diaza-anthracene Antibiotics from a Freshwater-Derived Actinomycete with Selective Antibacterial Activity toward *Mycobacterium tuberculosis*. *ACS Infect Dis*; 4:168–174
62. Nakaew N, Pathom-aree W & Lumyong S. (2009). Generic Diversity of Rare Actinomycetes from Thai Cave Soils and Their Possible Use as New Bioactive Compounds. *Actinomycetologica*. 23:21–26
63. Natsume M, Yasui K, Marumo S. (1989). Calcium ion regulates aerial micellium formation in actinomycetes. *The Journal of antibiotics*. Vol XLII No. 3
64. Naveena B, Sakthiselvan P, Elaiyaraju P, Partha N. (2012). Ultrasound induced production of thrombinase by marine actinomycetes: Kinetic and optimization studies. *Biochemical Engineering Journal* 61, 34–42
65. Ningthoujam DS, Sanasam S y Nimaichan S. (2011). Studies on Bioactive Actinomycetes in a Niche Biotope, Nambul River in Manipur, India. *J Microbial Biochem Technol*, 2011; S6: 1-6
66. Ningthoujam DS, Sanasam S & Nimaichan S. Screening of Actinomycete Isolates from Niche Habitats in Manipur for Antibiotic Activity. (2009). *Am J Biochem Biotechnol*; 5: 221-225
67. Niyomvong N, Pathom-aree W, Thamchaipenet A, Duangmal K. (2012). Actinomycetes from Tropical Limestone Caves. *Chiang Mai J. Sci.* 39(3): 373-388
68. ODDR-Observatorio de Procesos de Desarme, Desmoviliación y Reintegración. (2013). Caracterización Región de La Orinoquía. Universidad Nacional de Colombia. Sede Bogotá.
69. Osbourn A. (2010). Secondary metabolic gene clusters: evolutionary toolkits for chemical innovation. *Trends in Genetics* 26. 449–457
70. Otero V. (2011). Aislamiento, Selección e Identificación de Actinobacterias, Bacterias Fotosintéticas No Sulfurosas y Bacterias Ácido Lácticas con Potencial Biofertilizante, a Partir de Suelos Asociados al Cultivo de Plátano en la Costa Atlántica Colombiana. Tesis de Maestría. Universidad Nacional de Colombia
71. Otaguro M, Hayakawa M, Yamazaki T, Iimura Y. (2001). An integrated method for the enrichment and selective isolation of *Actinokineospora* spp. in soil and plant litter. *Journal of Applied Microbiology*. 91, 118-130
72. Pastrana-Camacho N, Suárez Z, Acosta-González A, Arango C, Haltli B, Correa H, Kerr R, Duque C, Díaz LE. (2016). Bioprospecting for culturable Actinobacteria with antimicrobial properties isolated from Rivers from the Colombian Orinoquia. *Trop J Pharm Res*; 15: 1259-1265

73. Poulsen M, Oh DC, Clardy J, Currie CR. (2011). Chemical Analyses of Wasp-Associated *Streptomyces* Bacteria Reveal a Prolific Potential for Natural Products Discovery. PLoS ONE 6(2): e16763.
74. Qiu D, Ruan J, Huang Y. (2008). Selective Isolation and Rapid Identification of Members of the Genus *Micromonospora*. Applied and Environmental Microbiology. Vol 74, No. 17. p. 5593–5597
75. Ramirez N, Serrano JA, Sandoval H. (2006). Microorganismos extremófilos. Actinobacterias halófilos en México. Rev Mex Ciencias Farmacéuticas. Vol 37. No. 3
76. Rifaat HM. (2003). The biodiversity of Actinomycetes in the River Nile exhibiting antifungal activity. Journal of Mediterranean Ecology. Vol 4. No. 3-4: 5-7.
77. Rueda C, Aikawa M, Prada L, Franco M, Martinez M, Padilla G. (2009). Evaluación de la presencia del gen mer A implicado en la detoxificación de mercurio a partir de actinobacterias nativos del humedal de La Conejera. Revista Colombiana de Biotecnología. 11(2): 105-113
78. Sahu B & Roymon MG. (2017). Review on current techniques in isolation and characterization of *Streptomyces* from soil. Indian J.Sci.Res. 13 (2): 226-232.
79. Shirling EB & Gottlieb D. (1966). Methods for characterization of *Streptomyces* species. International Journal of Systematic Bacteriology. Vol 16, No.3, pp. 313-340
80. Solecka J, Zajko J, Postek J, Rajnisz A. (2012). Biologically active secondary metabolites from Actinomycetes. Cent Eur J Biol. 7(3). 373-390
81. Subramani R & Aalbersberg W. (2013). Culturable rare Actinomycetes: diversity, isolation and marine natural product discovery. Appl Microbiol Biotechnol 97:9291–9321
82. Tanner K, Vilanova C & Porcar M. (2017). Bioprospecting challenges in unusual environments. Microbial Biotechnology, 10, 671–673
83. Taylor PW. (2013). Alternative natural sources for a new generation of antibacterial agents. International Journal of Antimicrobial Agents 42. 195–201
84. Tiwari K & Gupta RK. (2014). Bioactive Metabolites from Rare Actinomycetes. Studies in Natural Products Chemistry, Cap 14. Vol. 41. P 419-512
85. Trenzchnikova LP, Khasenova AK, Balgimbaeva AS, Fedorova GB, Katrukha GS, Tokareva NL, Kwa BH & Azizan A. (2012). Characterization of the Antibiotic Compound No. 70 Produced by *Streptomyces* sp. IMV-70. The Scientific World Journal. Volume 2012, Article ID 594231, 8 pages
86. VanMiddlesworth, F & Cannell, RJC. (1998). Dereplication and Partial Identification of Natural Products. In: Methods in Biotechnology-Natural Products Isolation. Cannell RJP. Glaxo Wellcome Research and Development. UK. Humana Press. Cap 10
87. Ventura M, Canchaya C, Tauch A, Chandra G, Fitzgerald GF, Chater KF, Sinderen D. (2007). Genomics of Actinobacteria: Tracing the Evolutionary History of an Ancient Phylum. Microb Mol Biol Rev, p. 495–548. Vol. 71, No. 3
88. Verma M, Lal D, Kaur J, Saxena A, Kaur J, Anand S, La R. (2013). Phylogenetic analyses of phylum Actinobacteria based on whole genome sequences. Research in Microbiology 164, 718-728

89. Wang DS, Xue Q H, Zhu WJ, Zhao J, Duan JL, Shen GH. Microwave Irradiation is a Useful Tool for Improving Isolation of Actinomycetes from Soil. (2013). *Microbiology*; 82: 102–110
90. Wink J, Mohammadipanah F, Hamedi J. (2017). *Biology and Biotechnology of Actinobacteria*. Springer Ed. Switzerland.
91. Wink J, Mohammadipanah F, Panahi HKS. (2017). Practical Aspects of Working with Actinobacteria. *In: Biology and Biotechnology of Actinobacteria*. Wink J, Mohammadipanah F, Hamedi J. 2017. Springer Ed. Switzerland. Chapter 11.
92. Yang JY, Sanchez LM, Rath CM, Liu XT, Boudreau PD, Bruns N, Glukhov E, Wodtke A, de Felicio R, Fenner A, et al., (2013). Molecular Networking as a Dereplication Strategy. *J. Nat. Prod*, 76, 1686–1699.
93. Zaitlin B & Watson S. (2006). Actinomycetes in relation to taste and odour in drinking water: Myths, tenets and truths. *Water Research*. 40 1741–1753
94. Zhang Q, Zhu BQ, Hu HF. (2008). Activated Antibiotic Production by Inducing Resistance to Capreomycin in *Streptomyces lividans* and *Streptomyces coelicolor*. *Chinese Journal of Natural Medicines*. 6 (1): 0057-0062

CAPITULO 2

Actinobacterias del río Arauca. Estrategias de aislamiento y screening biológico

“None of these definitions accommodates adequately that interesting hominid, the aquatic microbiologist, who neither lives nor grows in water but does occasionally venture on or near water to take samples before hurrying back to the comforts of his laboratory.” Tom Cross. 1981

2.1. INTRODUCCIÓN

2.1.1 Bio-diversidad por descubrir

De acuerdo al documento “Informe Colombia Viva”, realizado por la *World Wide Foundation* (WWF-Colombia 2017), Colombia es catalogado como un país megadiverso. La mayor parte de este informe se basa en datos obtenidos de diferentes productos científicos acerca del estudio de la fauna y flora del país, y genera grandes perspectivas acerca de un posible aumento en el estudio continuo y aprovechamiento de los recursos, teniendo en cuenta que en la actualidad, especialmente luego de la finalización del conflicto armado interno a través de los acuerdos de paz logrados en la Habana en el año 2016, existe una mayor facilidad de ingresar a hábitats poco estudiados en el país y con un potencial ecológico aún no conocido (WWF-Colombia 2017). Sin embargo, en estos documentos no se encuentra información acerca del recurso microbiológico presente ni su potencial como fuente natural para el bio-descubrimiento de productos naturales, lo que plantea un interrogante a resolver a partir, por ejemplo, con el uso de estrategias para el bio-descubrimiento de productos naturales a partir de ambientes poco estudiados.

2.1.2 Arauca

A lo largo del conflicto armado colombiano, Arauca fue uno de los departamentos con mayor incursión armada y, en consecuencia, uno de los departamentos con menor facilidad de acceso para estudios de carácter biológico. Algunos de los datos científicos que se tienen con relación a

este tema, se relacionan con inspecciones y análisis geográficos, ecológicos y de sistemática de flora y fauna circundante. Geográficamente, el departamento se encuentra incluido dentro del sistema de la Orinoquía colombiana (Fig. 1) y compuesto por la Cordillera Oriental, el Piedemonte Llanero y la Llanura Aluvial, con elevaciones del terreno desde los 5.380 m en la Sierra Nevada del Cocuy y 500 metros en el piedemonte llanero. Se evidencia vegetación de sabana, de bosque ecuatorial y llanuras aluviales de desborde con suelos de tendencia a la acidez y baja fertilidad, favoreciendo la ganadería extensiva. Hidrogeográficamente, este departamento se encuentra delimitado al norte por el río Arauca y al oriente por el río Orinoco, ríos de gran caudal que actúan también como frontera natural con Venezuela (FUPAD 2013).

2.1.3 Río Arauca – aguas inexploradas

El sistema hidrogeográfico de la Orinoquía colombiana comprende un 30.4% del territorio nacional y se compone de ríos de gran envergadura como el Arauca, Orinoco, Meta y Guaviare (ODDR 2013) (Fig. 1). La deforestación, actividades agrícolas, petroleras y derrames accidentales de petróleo son materia de seguimiento en este sistema a pesar de no contar con los monitoreos adecuados por parte de una red nacional de vigilancia ambiental. Los registros biológicos, se encuentran relacionados al avistamiento de delfines de río y a características propias del ecosistema y paisajes. Sin embargo, la calidad del agua y su microbiota asociada aún son tema de estudio (WWF-Colombia 2016), convirtiéndolo en un hábitat poco estudiado, con características ambientales únicas que pueden repercutir favorablemente en el biodescubrimiento de productos naturales a partir de microorganismos asociados.

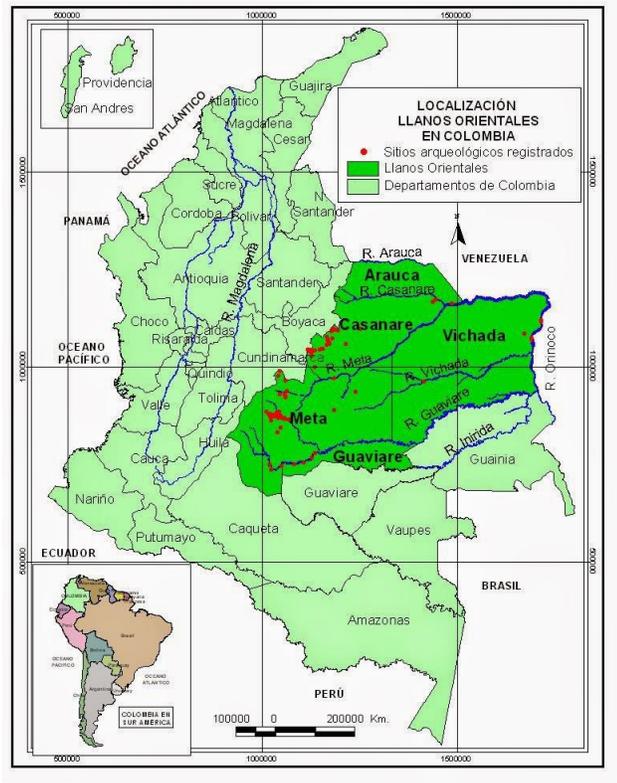


Figura 1. Mapa político colombiano, resaltando en verde la región de la Orinoquía Colombiana, departamentos asociados e hidrografía (Fuente: http://culturallaneracol.blogspot.com.co/2014/08/ubicacion-de-los-llanos-orientales_13.html)

Los estudios microbiológicos en ambientes de agua dulce, en específico dentro de los ríos asociados a esta región geográfica son escasos, encontrándose un reporte reciente de potencial bioprospectivo de actinobacterias aisladas del río Guaviare, realizado por Pastrana y colaboradores (Pastrana et al 2016), donde se describen dos cepas de *Streptomyces* sp con actividad antibacterial y antifúngica relevante frente a cepas patógenas de *Escherichia coli* ATCC 23724, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Acinetobacter baumannii* ATCC 19606, *Bacillus subtilis* ATCC 21556, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603, *Chromobacterium violaceum* ATCC 31532, *Fusarium* sp. H24, *Trichoderma harzianum* H5 and *Colletotrichum gloeosporioides* (Pastrana et al 2016). Es probable que el conflicto armado presente en la región haya sido la causa principal del poco avance en este tipo de estudios. Sin embargo, también es importante tener en cuenta que las condiciones biológicas y geográficas propias de la región e incluso las características del caudal

de algunos de estos ríos, proporcionan un grado de dificultad superior al momento de realizar una estrategia de muestreo. En este caso, las posibles vías de acceso y características físicas del río a estudio deben ser tenidas en cuenta para plantear una estrategia de muestreo, que permita obtener el material biológico de una manera rápida y efectiva, sin disminuir la viabilidad de la muestra hasta el momento en que la misma pueda ser procesada en condiciones de laboratorio.

De los ríos mencionados anteriormente, el río Arauca, aunque se caracteriza por tener un fuerte caudal, también se caracteriza por poseer la mayor facilidad de acceso. Este río se encuentra circundando la capital del departamento de Arauca, lo que facilita su acceso vía aérea o vehicular; adicionalmente la zona aledaña a la capital se compone de paisaje tipo llanura, facilitando el acceso a diferentes puntos del río a lo largo de la rivera. Estos hechos, hacen del río Arauca un punto de inicio para estudios potenciales asociados al bio-descubrimiento de productos naturales a partir de microorganismos.

2.1.4 Accediendo a las riberas del río Arauca

Entendiendo al río Arauca como un interesante punto de inicio para la investigación bioprospectiva en microorganismos, al ser éste un hábitat poco explorado, con características geográficas y ambientales puntuales y enfocándose en el objetivo de aislar actinobacterias asociadas a este hábitat que permitan obtener posibles nuevos compuestos con aplicabilidad a la industria farmacéutica, se debe plantear una estrategia metodológica que permita la adquisición de material biológico con miras a la adquisición de productos naturales nuevos, minimizando la actual problemática en la investigación biosprospectiva que se asocia al re-descubrimiento de compuestos.

Como se había mencionado en el capítulo anterior (1.4.1 y 1.4.2), existen diferentes estrategias que permiten un aislamiento “selectivo” de los microorganismos que se desean estudiar, como por ejemplo el uso de medios especiales o pretratamientos físico-químicos sobre una muestra y el uso de estrategias de dereplicación biológica y química que permiten la detección de un

material microbiológico de interés, dependiendo de las características taxonómicas y/o de bioactividad de los microorganismos obtenidos y del análisis de los perfiles químicos propios de estos aislados a partir de la utilización de equipos especializados como por ejemplo: (HPLC-MS) (ver cap. 3), (UHPLC-MS) (ver cap. 3), (NMR) (ver cap. 3), MALDI TOF-MS (Wink 2017 en WinkBook, Yang 2013).

2.1.5 Colección biológica de Actinobacterias asociadas a las riberas del río Arauca – Estrategia de trabajo

2.1.5.1 Aislamiento de actinobacterias mediante el uso de pretratamientos

El trabajar con una muestra biológica, independiente de su localización o extracción, implica tener en cuenta que pueden llegar a ser innumerables los microorganismos que se encuentren asociados a la misma. Algunas de las estrategias existentes para la esterilización de material biológico que buscan eliminar o disminuir microorganismos no deseados dentro de una investigación específica, involucran el uso de pretratamientos físico-químicos (Wang 2013). Sin embargo, algunos microorganismos con resistencia a estos pretratamientos pueden permanecer en la muestra, característica que ha sido aprovechable como una metodología costo-efectiva para el aislamiento selectivo de determinados microorganismos.

Las actinobacterias, al producir esporas latentes y altamente resistentes como estrategia reproductiva (Subramani y Aalbersberg 2013), pueden permanecer resistentes a estos pretratamientos y de hecho pueden incluso utilizarlos como mecanismo para su propia activación celular, conllevando a una detección facilitada de las mismas luego de posteriores procesos de siembra (Sahu 2017, Li et al 2002). Algunos pretratamientos físico-químicos utilizados y que se describen a continuación son: carbonato de calcio (CaCO_3 , solventes como el fenol, agentes antimicrobianos, secado por aire caliente, ondas electromagnéticas, radiación ultravioleta o combinaciones de las anteriores.

Pretratamiento con Carbonato de Calcio (CaCO₃). Esta técnica se basa en la acción del cambio de pH en la muestra biológica producido por la adición del Carbonato de Calcio. Los iones de calcio estimulan la formación del micelio aéreo en varias especies y elimina bacterias y hongos sensibles al compuesto (Natsume et al 1989; Otoguro et al 2001).

Pretratamiento con fenol: Consiste en la adición de fenol a la muestra biológica a partir de la cual serán extraídas las Actinobacterias. Un tiempo prolongado de contacto (30 minutos) entre el fenol y la muestra biológica permite reducir la abundancia de microorganismos no deseados y de los géneros más abundantes de Actinobacterias como por ejemplo *Streptomyces*. De esta manera se permite la detección de Actinobacterias de difícil aislamiento durante la fase de siembra en medio selectivo. La viabilidad de las cepas de Actinobacterias raras frente a este solvente, es atribuida a una característica de resistencia frente al fenol, presente únicamente en las esporas de estos individuos, lo cual es considerado como una ventaja importante frente a otros géneros (Hayakawa et al 1991; Hayakawa et al 2004; Bredholt et al 2008; Subramani y Aalbersberg 2013).

Pretratamiento térmico: Este pretratamiento utiliza la resistencia física de las esporas de las Actinobacterias frente a eventos de altas temperaturas. Un calentamiento de la muestra puede incrementar la proporción de Actinobacterias resistentes y disminuir la proporción de las Actinobacterias más abundantes y de rápido crecimiento que bajo condiciones de cultivo sin pretratamiento, dificultarían la observación de Actinobacterias de crecimiento lento. Adicionalmente reduce significativamente el crecimiento de otras bacterias o microorganismos no deseados. Generalmente se utilizan temperaturas aproximadas entre los 70, 100 y 120 °C. (Subramani y Aalbersberg 2013, Khanna et al 2011; Tiwari y Gupta 2012; Niyomvong et al 2012).

Pretratamiento con microondas: Este método se basa en el uso de ondas de alta frecuencia para la esterilización de muestras de suelo (Qiu et al 2008; Wang et al 2013). Las microondas (MW) se caracterizan por ser radiaciones no-ionizantes y hacer parte del espectro electromagnético con frecuencias entre los 300 MHz a los 300 GHz, y una correspondiente longitud de onda de 1 mm a 1 m (Mishra et al 2013). A nivel biológico, la irradiación con

microondas puede alterar la tasa de reacciones enzimáticas a causa del aumento de energía alcanzada a través de un efecto térmico. En este caso, cuando un material biológico entra en contacto con una onda electromagnética como MW, las moléculas polares que se encuentran en la célula (agua, DNA, proteínas) responden a un campo electromagnético rotando y esta rotación genera un roce con las moléculas vecinas que produce vibración lo cual es traducido como un efecto térmico (Mishra et al 2013). En microbiología, las microondas han sido utilizadas para la eliminación de microorganismos indeseables, en el caso en que la pared celular de éstos sea sensible a la onda y se genere un daño celular. Sin embargo, algunos microorganismos pueden ser resistentes a la aplicación de las microondas y de hecho este tratamiento físico puede aumentar su población al incrementar su tasa enzimática. Estas observaciones dependen de la duración y la intensidad de la exposición a la onda (Mishra et al 2013, Komarova et al 2008). Adicionalmente, se ha observado que la irradiación con microondas ha contribuido a la germinación de esporas de Actinobacterias raras que generalmente no son observables bajo condiciones sin pretratamiento (Wang et al 2013).

Pretratamiento con ultrasonido: Este método ha sido investigado en la industria alimenticia como una herramienta potencial para eliminar microorganismos no deseados (Betts y Williams 1999). La finalidad del ultrasonido es la fabricación de burbujas a partir de ondas con una frecuencia determinada y cuyo colapso o vibración conllevarán a un desencadenamiento de energía. Por ejemplo, un ultrasonido de baja intensidad utiliza frecuencias entre los 2 MHz a 20 MHz con un poder energético de 0.1 a 1 Wcm⁻². Por otro lado, un ultrasonido de mayor intensidad utiliza frecuencias menores entre 20 KHz a 100 KHz pero puede producir una mayor energía, del orden de 10 a 1000 Wcm⁻². De esta manera, un ultrasonido de baja frecuencia puede tener la energía suficiente para romper enlaces a nivel molecular en una célula. En los microorganismos, el uso de la ultrasonicación genera inactivación celular por medio de cavitación y calentamiento localizado, por lo cual se ha empleado como método de eliminación. Se utiliza la cavitación producida cuando las ondas de ultrasonido pasan a través del medio generando burbujas, las cuales, al tocar y rozar la pared celular de los microorganismos, generan una presión que permite el rompimiento de su pared celular. Por otro lado, si las burbujas creadas por las

ondas de ultrasonido son mayores en tamaño, se pueden generar presiones mayores (hasta 100 MPa) y su colapso puede producir temperaturas hasta de 5000 Kelvin, lo que conllevaría a denaturación de enzimas y proteínas en el microorganismo que se encuentre cercano (Betts y Williams 1999). Sin embargo, modificaciones a esta técnica también han sido utilizadas para la generación de biomasa en microorganismos; esto es debido a la generación de microondas de ultrasonido que, al rozar al microorganismo, mejoran la penetrabilidad de la pared, lo que permite una entrada de nutrientes mucho mayor, crecimiento celular y por lo tanto aumento de biomasa (Naveena et al 2012). En el aislamiento de actinobacterias, esta técnica ha sido utilizada para reducir la población de hongos y otros microorganismos no deseados lo que promueve el aislamiento de actinobacterias de difícil observación (Subramani y Aalbersberg 2013).

2.1.5.2 Priorización de aislados biológicos – Estrategia del embudo biológico

Debido a que las Actinobacterias es un grupo de microorganismos de gran abundancia en distintos tipos de ambientes y en consecuencia a su resistencia frente a distintos tipos de pretratamientos físico-químicos, la probabilidad de obtener una cantidad considerable de estos aislados es alta. Es común encontrar reportes con estudios basados en colecciones biológicas de 200~1000 aislados de actinobacterias según el lugar de origen, por lo que dependiendo del tipo de estudio a seguir, es necesario establecer una metodología de dereplicación que involucre no solo el conocimiento biológico de este grupo a partir de pruebas de identificación taxonómica o morfológica, si no también que incluya resultados acerca de sus características bioactivas, en especial si lo que se busca es encontrar cepas que puedan ser posteriormente utilizadas como productoras de nuevos compuestos con una actividades biológicas específicas.

El screening biológico mediante pruebas de bioactividad, puede ser equiparable a una estrategia de dereplicación biológica, convirtiéndolo en una metodología efectiva para el manejo inicial de grandes colecciones de microorganismos en estudios para el biodescubrimiento de productos naturales (Yang 2013). Los métodos de confrontación directa utilizados en pruebas antimicrobianas, son metodologías sencillas y económicas para detectar aislados microbianos con capacidad antibacterial y/o antifúngica a partir de grandes colecciones biológicas (Velho-Pereira

2011), por lo que generalmente son incluidos en las primeras fases de los protocolos de dereplicación (Yang 2013; Ito 2014) disminuyendo la cantidad de individuos y enfocando el estudio solo en los ejemplares con una actividad biológica asociada. Esta metodología de trabajo también es conocida como estrategia de embudo o priorización por embudo (Genilloud et al 2011), en donde los microorganismos son seleccionados para posteriores análisis ya sea biológicos y/o químicos, solo si presentan bioactividades específicas, disminuyendo considerablemente el número de muestras a analizar, mientras se acortan los procesos y costos de trabajo.

2.1.5.3 MALDI TOF-MS – Acercamiento a la abundancia de aislados bioactivos de Actinobacterias

Matrix-assited laser desorption/ionization mass spectrometry MALDI TOF-MS, es un equipo especializado empleado en la obtención de espectros de masas de los compuestos protéicos y/o peptídicos más abundantes en células o microorganismos. Usa la información de estos espectros como la “huella digital” de organismos pertenecientes a una misma especie (Stets MI t al 2013), permitiendo la agrupación de microorganismos con características o “huellas digitales” similares a manera de clados, información que puede ser utilizada como una estrategia de dereplicación en grandes colecciones biológicas.

Para la obtención del material protéico y/o peptídico, se utiliza una mezcla de solventes (combinaciones de agua, etanol, metanol, acetonitrilo y un ácido fuerte, como el ácido trifluoroacético) y una mezcla orgánica conocida como “matriz”, la cual se encuentra conformada por compuestos orgánicos, ácidos de bajo peso molecular y compuestos aromáticos, tales como derivados de ácido benzoico o cinámico. Los microorganismos que se deseen analizar son depositados sobre una placa portamuestras de acero y sobre éstos se agrega la mezcla de solventes y matriz. Esta mezcla tiene como función penetrar la pared celular de los microorganismos que se deseen analizar, permitiendo accesibilidad a las proteínas intracelulares presentes. La evaporación subsiguiente de los solventes permite la cristalización de la matriz, dejando las proteínas y otros compuestos celulares presentes incorporados en la estructura de

los cristales de la matriz, en un proceso llamado "co-cristalización". Esta etapa de co-cristalización, es esencial para la preservación de la integridad de las moléculas (Welker M and Moore ERB 2011). Finalizada la co-cristalización, la mezcla es irradiada e ionizada mediante 240 pulsos láser continuos de N₂ en seis regiones de la muestra. La exposición de la muestra a este laser permite que las moléculas orgánicas aromáticas de la matriz absorban energía en sus dobles enlaces, generando una sublimación del analito, produciendo una fase gaseosa. Posteriormente, los iones obtenidos ingresan a un tubo de vacío con longitud de 1-4 metros para comenzar su migración hasta un detector de iones, a través de un campo eléctrico homogéneo. El tiempo que tardan los iones en recorrer el tubo es proporcional a su relación masa/carga (m/z), de allí que iones con menor m/z tarden menos tiempo en recorrer el tubo de vacío hasta el detector (Loucif L et al 2014). Esta migración de iones también conocida como *tiempo de vuelo* (TOF), corresponde al tiempo que los iones necesitan para alcanzar un detector en el extremo del tubo y permite la separación de los iones en función de su peso molecular. El resultado se presenta en forma de un espectro de masas característico para cada especie, donde proteínas ribosomales, intracelulares y de membrana son las encargadas de conformar esta huella peptídica (Loucif L et al 2014, Lartigue MF. 2013). Como máximo, 50 proteínas (incluyendo variantes y fragmentos) pueden ser identificadas en la mayoría de las muestras microbianas, con un rango de masa entre 3.000 a 20.000 Da (Welker M and Moore ERB 2011; Demirev PA et al 1999; Croxatto A et al 2012). Estos datos son comparados con otros microorganismos como método de identificación taxonómica o para realizar análisis exploratorios en grandes colecciones biológicas mediante el agrupamiento por perfiles de similitud (Muñoz R et al 2011).

2.2 OBJETIVO PROPUESTO

El objetivo de este capítulo es la presentación y análisis de resultados de una estrategia de aislamiento y dereplicación biológica por medio de una priorización por embudo antibacterial y antifúngico que permitan detectar aislados de actinobacterias con potencial actividad antimicrobiana, a partir de una muestra de sedimentos de la ribera del río Arauca (Colombia) y

en paralelo realizar un acercamiento acerca de la abundancia de estos aislados biológicos bioactivos mediante dereplicación química por MALDI-TOF MS.

2.3 MATERIALES Y MÉTODOS

2.3.1 Recolección de sedimentos de las riberas del río Arauca (Colombia)

Se establecieron 2 zonas de muestreo dentro de las riberas del río Arauca dependientes de la ubicación del asentamiento humano principal, es decir de la ciudad de Arauca (Fig 2). La zona 1 de muestreo se ubicó dentro del sector Guafitas, 6 kilómetros al occidente de la ciudad de Arauca. La zona 2 de muestreo se ubicó en el sector de La Lorena, 17 kilómetros al oriente de la ciudad (Fig. 2).

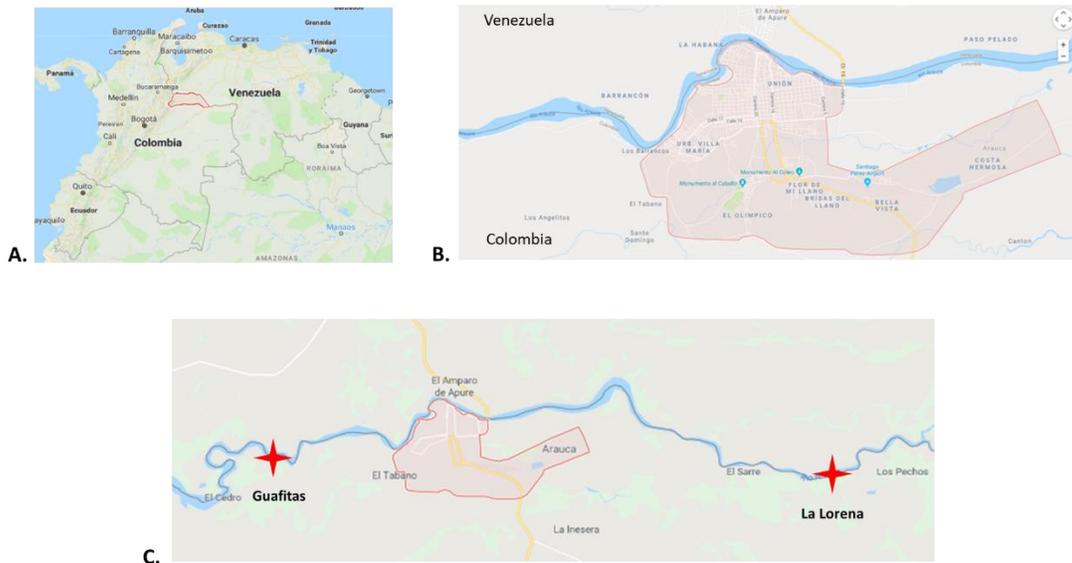


Figura 2. A. Mapa de Colombia, en rojo el departamento de Arauca. B. Detalle de la ciudad de Arauca sombreada en color rojo. C. Puntos de muestreo: zona Guafitas y zona La Lorena (FuenteGoogle:<https://www.google.ca/maps/place/Arauca/@7.0761716,70.7562216,14z/data=!3m1!4b1!4m5!3m4!1s0x8e6feba26e713e59:0x30f39aef177791a2!8m2!3d7.076172!4d-70.710457>)

De acuerdo a la Resolución No. 1043/2015 del Ministerio de Ambiente y Desarrollo sostenible de la República de Colombia (Contrato Marco de Acceso a Recursos Genéticos y Productos derivados para el programa de investigación en Biociencias – Universidad de La Sabana. Res. 1043 29/04/2015), dos puntos de muestreo fueron elegidos para la toma de muestras, teniendo un total de 2 muestras colectadas para cada zona. Las coordenadas de los puntos de muestreo en la zona 1 (Guafitas) fueron: 7°04'21.5"N 70°49'38.7"W y 7°04'22.4"N 70°49'49.7"W. Las coordenadas de los puntos de muestreo de la zona 2 (La Lorena) fueron: 7°03'51.9"N 70°36'35.3"W y 7°03'55.4"N 70°36'39.3"W.

Para la recolección de muestras de las riberas de río se utilizó un tubo de metacrilato de 25 cm de largo y 5 cm de diámetro, el cual fue sumergido con ayuda de un mazo para luego ser extraído con la muestra de sedimento (Fig. 3). La totalidad muestras fueron transportadas en menos de 24h al Laboratorio de Bioprospección de la Universidad de La Sabana, preservando una réplica del material colectado bajo refrigeración (Leiva et al 2004; El-sayed 2012).

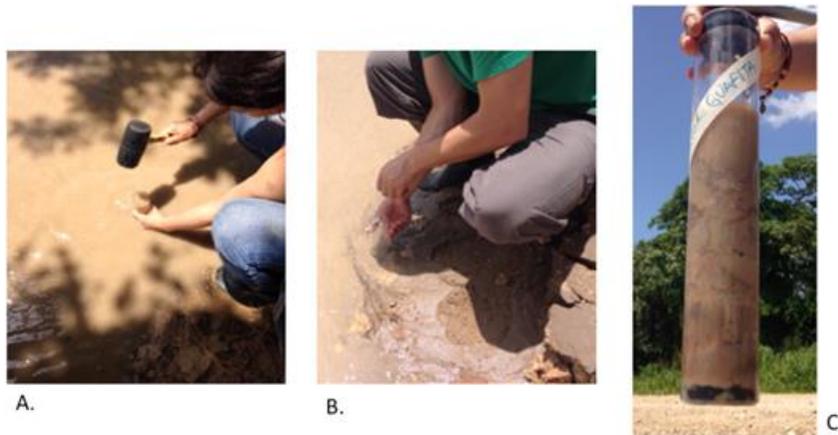


Figura 3. Proceso de recolección de sedimento en las riberas del río Arauca. A. Inmersión del tubo de metacrilato; B. Extracción del tubo; C. Sedimento obtenido.

2.3.2 Pretratamientos físico-químicos, siembra y criopreservación

Pretratamiento con Carbonato de Calcio (C): El protocolo realizado fue tomado de Otoguro y colaboradores (2001) con modificaciones: 5 ml de solución salina estéril al 0.85 M fueron

agregados a un tubo estéril con los 5 gramos de muestra de sedimento y mezclados con 0.5 gramos de Carbonato de calcio en polvo con la ayuda de un vórtex. La mezcla resultante se mantuvo a temperatura ambiente por espacio de 1 hora.

Pretratamiento con Fenol (F): Se siguió el protocolo descrito por Hayakawa (2004) con modificaciones: 5g de las muestras colectadas fueron llevados a un tubo estéril con buffer fosfato (5 mM a pH 7) y fenol a una concentración final de 1.5% (p/v). La solución se mezcló en vórtex y se mantuvo a 30°C por 30 minutos.

Pretratamiento térmico (T): Se realizó el protocolo descrito por Niyomvong (2012) con modificaciones: 5 ml de solución salina estéril al 0.85 M fueron agregados a un tubo estéril con los 5 gramos de muestra de sedimento. La suspensión de la muestra fue agitada en vórtex y llevada a un horno a 120°C por 1 hora.

Pretratamiento con microondas (M):
Se siguió el protocolo descrito por Wang DS (2013) con modificaciones. 5 ml de solución salina estéril al 0.85 M fueron agregados a un tubo estéril con los 5 gramos de muestra de sedimento. La mezcla fue agitada en vórtex y luego colocada en un tubo de centrifuga de vidrio. Los tubos con cada una de las muestras fueron colocados en un vaso precipitado de 1000 mL con 900 mL de agua para reducir un sobrecalentamiento. El vaso de precipitados con los tubos es llevado al microondas de 2450 MHz e irradiado a una potencia de 100 W por 45 segundos.

Pretratamiento con sonicación (U): Se llevó a cabo el protocolo establecido por Qiu D (2008) con modificaciones. 5 ml de solución salina estéril al 0.85 M fueron agregados a un tubo estéril con los 5 gramos de muestra de sedimento. La mezcla fue agitada en vórtex y luego colocada en un tubo de centrifuga de vidrio. Los tubos con cada una de las muestras fueron colocados en el sonicador a 30 °C y el con 10% de poder por espacio de 2 minutos.

Muestra sin pretratamiento – Siembra directa (S): 5 ml de solución salina estéril al 0.85 M fueron agregados a un tubo estéril con los 5 gramos de muestra de sedimento y fue llevada a posterior agitación en vórtex.

La totalidad de las muestras, por punto de muestreo y pretratamiento, fueron llevadas a diluciones seriadas (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} y 10^{-6}). Posteriormente, 100 μ l de cada dilución

fueron sembrados masivamente y por duplicado en agar de Ácido Húmico con vitaminas (Zhang J 2011; Jiang Y et al. 2013) y en agar-avena ISP3 (Atlas RM 2010), con 50 mg/L de ácido nalidíxico y 100 mg de ciclohexamida. Todo el material sembrado fue llevado a incubación a 30°C por 7 días. El aislamiento de actinobacterias se realizó de acuerdo a las características básicas de las colonias de estos microorganismos, entre ellas su morfología delgada, plana, radial y posiblemente esporulada. Para esto y con ayuda de un asa estéril, colonias de microorganismos con las características antes mencionadas, fueron detectadas e inoculadas en ISP3 nuevo y llevadas a incubar a 30°C por 7 días. Pases sucesivos de estas colonias fueron necesarios hasta llegar a cultivos axénicos, los cuales fueron codificados numéricamente, manteniendo en base de datos la información acerca de su procedencia (Punto de muestreo, pretratamiento físico-químico sobre la muestra y dilución). Se realizó tinción de Gram para el total de ejemplares. Los aislados obtenidos fueron criopreservados en solución de glicerol al 40% y añadidos a la colección biológica de microorganismos de la Universidad de La Sabana (ActinosUsab).

2.3.3 Dereplicación Biológica utilizando priorización por embudo – Ensayos antimicrobianos por confrontación directa

Prueba antibacterial: Siguiendo el protocolo descrito por Undabarrena y colaboradores (2016), cada una de las cepas de Actinobacterias aisladas fue inoculada sobre una cuarta parte de una caja de petri con medio Muller-Hinton (MH) y fue llevada a incubación a 30°C por 7 días hasta observar crecimiento. En condiciones de asepsia se realizan líneas de siembra perpendiculares con 4 bacterias patógenas: *Klebsiella pneumoniae* (ATCC® 700603™), *Staphylococcus aureus*-MRSA (ATCC® BAA-44™), *Enterococcus faecium*-VRE (ATCC® 700221™) y *Bacillus subtilis* (ATCC® 21556™) (Fig. 4A). La caja es nuevamente llevada a incubar a 37°C por 24 h. Finalmente se observa el estado de inhibición de crecimiento de las bacterias sembradas frente a la cepa de Actinobacteria escogida. Rifampicina, vancomicina, ciprofloxacina and ácido nalidixico (50mg/mL)(Sigma-Aldrich®) fueron usados como controles. Zonas de inhibición de más de 2 cm, de 1-2 cm y de 0-1 cm, fueron consideradas como hits positivos con actividad antibacterial alta, media y baja, respectivamente (Pastrana et al 2016). Los aislados de

actinobacterias que generaron inhibición de al menos una de las cepas de bacterias patógenas fueron llevados a posteriores ensayos de actividad antifúngica, como primer paso en la priorización por embudo.

Prueba antifúngica: Para este ensayo fueron utilizados 3 aislados clínicos de hongos dermatofitos: *Cladosporium cladosporioides* (colonia 1 - C1), *Cladosporium cladosporioides* (colonia 2 - C2) y *Epicoccum nigrum* (colonia 3 - C3). Para cada uno de los hongos se realizó una suspensión de esporas a partir de cultivos de 7 días en Potato Dextrose Agar (PDA) a 25°C. Las colonias fueron cubiertas con 5 ml de solución salina estéril al 0.85% y la superficie fue raspada con ayuda de un asa estéril. La concentración de las esporas de cada uno de los hongos en la solución obtenida fue cuantificada en cámara de Neubauer y ajustada a una concentración final de $0.5\text{--}2.0 \times 10^5$ esporas mL⁻¹ (Barros ME et al 2006). Cada inóculo fue agregado a microplacas de 12 pozos con 3 mL de PDA. Una vez solidificado el agar PDA con el inóculo del hongo, un plug de 3 mm de diámetro proveniente de las actinobacterias con actividad antibacterial previamente establecida, fue colocado sobre cada pozo (Fig. 4B). El montaje de las microplacas fue incubado a 25°C por 7 días, utilizando como control positivo Clorhidrato de Terbanifina 1% y Nitrato de Isoconazol 1%. Luego del periodo de incubación, cada pozo de las microplacas fue observado, registrando la medida del halo de inhibición producido por el plug de la actinobacteria frente al PDA con el inóculo del hongo. Halos de inhibición mayores a 6 mm, entre 2-6 mm y de 0-2 mm, fueron considerados como hits positivos con actividad antifúngica alta, media y baja, respectivamente (Pastrana et al 2016). Aquellos aislados con actividad antifúngica detectada frente al menos una de las colonias de hongos analizadas, fueron llevados a posteriores análisis de identificación molecular finalizando la estrategia de priorización por embudo biológico.

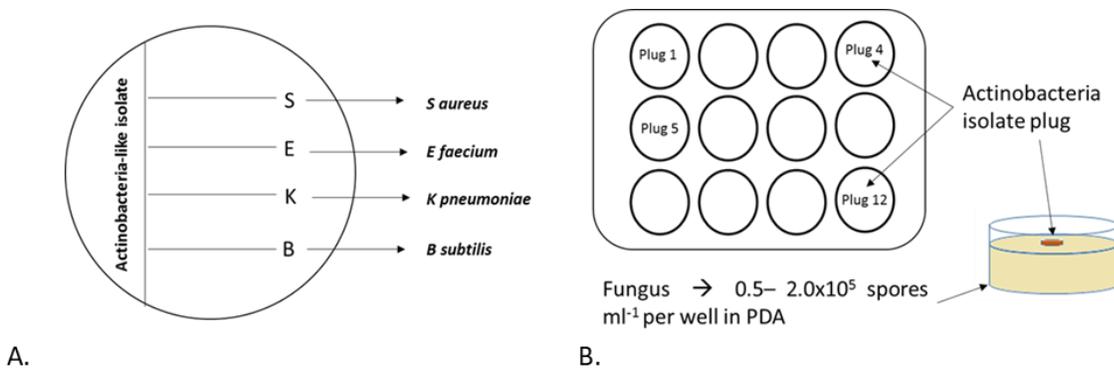


Figura 4. Ensayos antimicrobianos por enfrentamiento directo – esquema de trabajo. A. Ensayo antibacterial; B. Ensayo antifúngico

2.3.4 Identificación molecular – Amplificación por PCR y secuenciación 16s rRNA

Únicamente los aislados de actinobacterias con actividad antibacterial y antifúngica detectada a través del proceso de dereplicación biológica (priorización por embudo) fueron procesados para identificación molecular, siguiendo protocolos descritos por Forner y colaboradores (2013), con modificaciones. Las cepas fueron cultivadas en medio ISP2 (Atlas 2010) a 30°C en continua agitación (250 rpm) por espacio de 8 días para posterior extracción manual de ADN (Pastrana N et al 2016). Para el análisis de 16S rRNA se utilizaron los primers 27F (5' AGT TTG ATC CTG GCT CAG 3') y 1492R (5' ACG GCT ACC TTG TTA CGA CTT 3') para la identificación de la subunidad ribosomal 16S, en un termociclador Icyler (BIORAD) con las siguientes condiciones de ciclo: denaturalización inicial a 95°C por 3 minutos, 35 ciclos de 95°C por 45 segundos, 54°C por 1 minuto, 72°C por 1 minuto, seguidos de una extensión final a 72°C por 5 minutos. La amplificación es confirmada mediante una electroforesis en gel de agarosa al 1.5% con SYBR Green y marcador de peso molecular Cat Mwlon 300 (Invitrogen). Las secuencias fueron ensambladas utilizando el software Chromas y BioEdit Sequence Alignment Editor (2013) versión 7.2.5 y comparadas con SILVA Living Tree Project database. El árbol filogenético fue construido con ARB 5.5.

2.3.5 MALDI TOF-MS

Para la obtención de los perfiles protéicos de todos los aislados de actinobacterias incluidos en la colección biológica, inóculos de cada cepa a partir de criovial fueron sembrados en agar-avena ISP3 y llevados a incubación por un periodo de 48h a 30°C. Después del periodo de incubación, un inóculo de cada cultivo puro fue depositado en un pozo de una placa de metal para análisis (Bruker Daltonics) y sobre éste fue colocado 1µL de matrix (solución saturada 2.5 mg/ml de ácido α-ciano-4-hidroxicinámico -HCCA en 50% acetonitrilo, 2,5% ácido triuoro-acético y 47,5% de agua grado HPLC). La mezcla se deja secar a temperatura ambiente para permitir la co-cristalización. Los espectros para cada aislado fueron obtenidos con 240 disparos del láser en seis regiones distintas dentro del mismo pozo mediante un espectómetro Microflex LT MALDI-TOF MS (Bruker Daltonics) y analizados utilizando el software MALDI Biotyper RTC 3.0 (Bruker Daltonics). El estándar BTS (Bacterial Test Standar) proveniente de *Escherichia coli* DH5 péptido alfa fue utilizado como instrumento de calibración. La totalidad de los espectros fueron analizados en un rango de 2,000 a 20,000 Da y luego fue comparado con la base de datos BDAL (espectros de masas) proporcionada por Bruker. La totalidad de los perfiles protéicos fueron utilizados para realizar un dendograma por correlación mediante el software Biotyper RTC 3.0 (Bruker Daltonics).

2.4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

2.4.1 Recolección de sedimentos de las riberas del río Arauca (Colombia) y pretratamientos físico-químicos

Se colectaron aproximadamente 500 g de sedimento en cada uno de los puntos de muestreo (P1 - P2 en sector Guafitas y P3 - P4 en sector la Lorena). Los análisis de materia orgánica presente, pH y micronutrientes sobre las muestras colectadas mostraron tendencia a la acidez, baja cantidad de materia orgánica y micronutrientes (Tabla 1), características típicas de los sedimentos de río en la región (USDA 1998).

Tabla 1. Valores de pH, porcentaje de materia orgánica, humedad relativa y concentración de Ca^{2+} , K^+ , Mg^{2+} y Na^+ presentes en las muestras de sedimentos colectadas en las riberas del río Arauca (Colombia), según punto de muestreo.

Punto de muestreo	pH	(%) Materia orgánica	Ca^{2+} (meq/100g)	K^+ (meq/100g)	Mg^{2+} (meq/100g)	Na^+ (meq/100g)	(%) Humedad relativa
P1	4,8	0,63	1,4	0,14	1,07	0,09	19,65
P2	4,2	0,58	3,6	0,09	0,96	0,04	23,49
P3	4,4	1,2	3,2	0,29	1,44	0,02	30,41
P4	4,9	1,27	4,2	0,09	2,88	0,04	21,97

Con el fin de disminuir o incluso eliminar microorganismos no deseados dentro de la muestra biológica y activar la viabilidad de esporas de actinobacterias en estado latente, cinco pretratamientos físico-químicos fueron seleccionados de acuerdo a la literatura para el manejo de la muestra de sedimentos antes de realizar posteriores procesos de siembra y aislamiento de actinobacterias: Uso de carbonato de calcio (CaCO_3), fenol (F), calor (T), microondas (M) y sonicación (U), acompañados de una siembra de la muestra sin manipulación la cual fue utilizada a manera de control. Finalizado el proceso de aislamiento secuencial de actinobacterias, 790 ejemplares fueron codificados numéricamente en orden ascendente, conservando la información acerca de su procedencia en base de datos como punto de muestreo y tipo de pretratamiento utilizado sobre la muestra original. Todos los aislados mostraron tinción Gram + e hifas con ramificaciones en forma de bastón o espiral (Fig. 5).

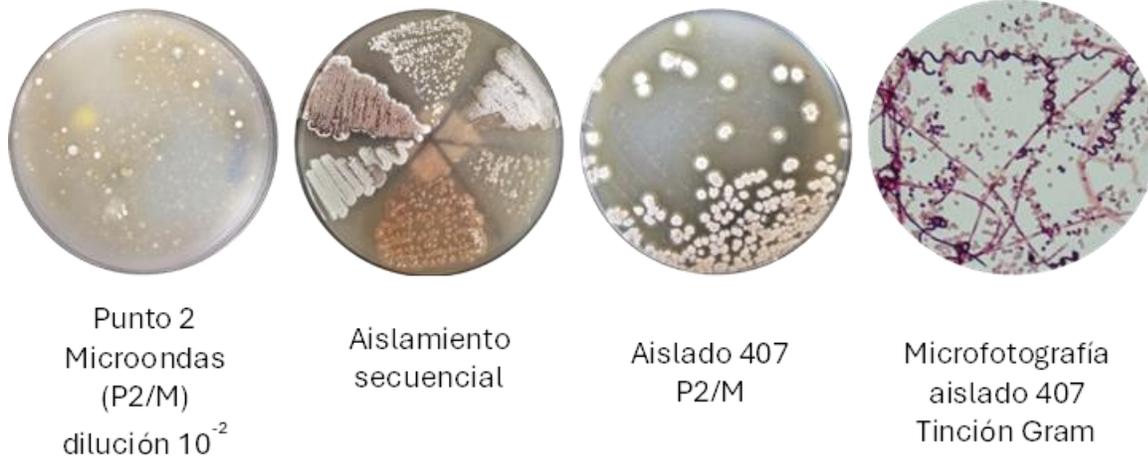


Figura 5. Ejemplo de aislamiento secuencial y tinción Gram del aislado 407, proveniente de muestra de sedimento del río Arauca (Colombia). Punto de colecta No. 2, sector Guafitas, pretratamiento utilizado Microondas. Tinción Gram +.

Los puntos de muestreo 1 y 2 localizados en el sector Guafitas, proporcionaron el mayor porcentaje de aislados (57%). En cuanto a los pretratamientos, el mayor número de aislados se obtuvo haciendo uso del microondas (20.9%) y fenol (20%), seguido del uso de carbonato de calcio (18.2%) y sonicación (18.1%), mientras que solo un 2.6% de los aislados de actinobacterias presentes fueron obtenidos a través del pretratamiento térmico (T), lo que indica presencia de microorganismos con baja resistencia a temperaturas superiores a los 100°C en la muestra analizada (Bull 2011) (Tabla 2).

Tabla 2. Cantidad de aislados de actinobacterias a partir de muestras de sedimentos de riberas del río Arauca, según punto de muestreo y pretratamiento físico-químico utilizado. S (Sin tratamiento); C (Carbonato de calcio); F (Fenol); M (Microondas); U (Sonicación) y T (Calor).

Pretratamiento	Puntos de muestreo				Total de aislados
	Punto 1	Punto 2	Punto 3	Punto 4	
S	35	55	22	47	159
C	34	34	36	40	144
F	51	46	32	29	158
M	47	57	24	37	165
U	43	41	26	33	143
T	4	3	3	11	21
Total de aislados	214	236	143	197	790

2.4.2. Dereplicación Biológica utilizando priorización por embudo - Ensayos antimicrobianos por confrontación directa

La totalidad de los aislados de actinobacterias obtenidos (790 aislados) fueron llevados a ensayos de confrontación directa frente a cuatro bacterias patógenas como primer paso en la priorización por embudo y frente a tres aislados clínicos de hongos patógenos como paso final en la estrategia de dereplicación biológica planteada.

Los microorganismos patógenos a evaluar fueron: *Klebsiella pneumoniae* (ATCC® 700603™), *Staphylococcus aureus*-MRSA (ATCC® BAA-44™), *Enterococcus faecium*-VRE (ATCC® 700221™), *Bacillus subtilis* (ATCC® 21556™), *Cladosporium cladosporioides* (Colonia 1 – C1; Colonia 2 – C2) y *Epicoccum nigrum* (Colonia 3 – C3).

Para detectar los aislados de actinobacterias con capacidad antibacterial frente a las cepas patógenas evaluadas, zonas de inhibición de más de 2 cm, de 1-2 cm y de 0-1 cm, fueron

consideradas como hits positivos con actividad antibacterial alta, media y baja, respectivamente (Pastrana et al 2016). Los aislados de actinobacterias que generaron inhibición (alta, media o baja) en al menos una de las cepas de bacterias patógenas evaluadas fueron llevados a posteriores ensayos de actividad antifúngica. En este caso y para detectar aislados de actinobacterias con capacidad antifúngica positiva, halos de inhibición mayores a 6 mm, entre 2-6 mm y de 0-2 mm, fueron considerados como hits positivos con actividad antifúngica alta, media y baja, respectivamente (Pastrana et al 2016).

En total, 78 aislados de actinobacterias (9.87%) del total inicial en la colección biológica (790 aislados), fueron seleccionados mediante la estrategia de dereplicación biológica mediante priorización por embudo, al presentar actividad antibacterial y antifúngica frente a las cepas patógenas evaluadas (Tabla 3). De este grupo, 42 aislados (53.84%) inhibieron el crecimiento de *Staphylococcus aureus* - MRSA, 21 (26.92%) inhibieron el crecimiento de *Enterococcus faecium* - VRE, 19 (24.35%) inhibieron el crecimiento de *Klebsiella pneumoniae* y 73 aislados (93.6%) inhibieron el crecimiento de *Bacillus subtilis*. Con respect a la actividad antifúngica, 63 (80.76%) aislados inhibieron el crecimiento de *Cladosporium cladosporioides* (C1), 64 aislados (82.05%) inhibieron el crecimiento de *Cladosporium cladosporioides* (C2) y 77 (97.46%) inhibieron el crecimiento de *Epicoccum nigrum* (C3).

Tabla 3. Resultados de las pruebas de bioactividad antimicrobiana (antibacterial y antifúngica). Bioactividad antibacterial alta con zona de inhibición mayor a 2 cm (+++); media con zona de inhibición entre 1-2 cm (++); baja con zona de inhibición menor a 1 mm (+); No bioactividad o zona de inhibición no observada (-). Bioactividad antifúngica alta con diámetro de halo de inhibición mayor a 6 mm (+++); media con diámetro de halo de inhibición entre 2-6 mm (++); baja con diámetro de halo de inhibición menor a 2 mm (+); No bioactividad o halo de inhibición no observado (-).

AISLADO #	MRSA	VRE	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Cladosporium cladosporioides</i> C1	<i>Cladosporium cladosporioides</i> C2	<i>Epicoccum nigrum</i> C3
5	+++	+	-	++	++	++	++
67	++	-	++	++	-	-	++
93	+	-	-	++	++	+++	+++
104	-	-	+	-	-	-	++
112	-	-	+	+	++	++	++
126	+++	+++	-	+++	++	++	+++
135	+	-	++	+	-	-	+
138	+	-	+++	++	-	-	++
140	-	-	-	+	-	-	+
145	+++	+++	+	+++	-	-	+++
152	+	+	-	++	+++	+++	+++
160	++	-	-	+++	++	++	++
197	-	-	-	++	+++	+++	+++
201	+	-	+++	+++	++	++	+++
208	+	+	+	++	++	++	++
213	-	-	-	+	-	-	+
220	-	-	-	++	-	-	++
243	++	-	-	-	-	++	++
246	+	-	++	+	-	-	++
247	-	+	-	++	++	++	++
276	+++	++	-	+++	++	++	+++
288	-	+	-	++	++	++	++
290	++	++	-	+	++	++	+++
292	+	+	-	++	+++	+++	+++
297	-	-	+	-	+	-	++
326	++	++	-	++	++	++	+++

Tabla 3 - continuación. Resultados de las pruebas de bioactividad antimicrobiana (antibacterial y antifúngica).

AISLADO #	MRSA	VRE	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Cladosporium cladosporioides</i> C1	<i>Cladosporium cladosporioides</i> C2	<i>Epicoccum nigrum</i> C3
330	-	-	-	++	+	+	++
335	-	+	-	-	++	++	++
356	-	-	-	++	-	-	++
365	+	-	-	+	+++	+++	+++
376	-	++	+	+	+++	++	+++
377	-	-	++	+++	++	++	++
381	++	-	-	++	-	++	++
382	-	-	-	+	-	-	+
388	-	-	-	+	++	++	+++
397	-	-	-	++	++	-	++
439	+	-	-	++	+++	+++	++
443	-	-	-	++	+++	++	+++
444	+	-	-	+	++	++	++
445	++	-	-	++	+++	++	+++
448	+	-	-	+	+++	+++	+++
479	-	-	-	+	+++	+++	+++
481	-	-	+	++	++	++	-
515	++	-	-	++	++	++	+
516	-	+	-	+	+++	+++	+++
530	-	-	-	+	+++	+++	+++
531	++	+	-	+	++	++	++
559	+	-	-	++	++	++	++
568	-	-	-	+	++	++	+++
571	+++	-	-	++	+++	+++	+++
572	+++	-	-	++	+++	++	+++
575	-	-	++	+++	++	++	++
612	+	-	-	+	+++	+++	++
616	+++	+	-	+++	++	++	++
619	+++	-	-	+++	+++	+++	+++
626	++	-	+	++	++	++	++
627	+++	+	-	++	+	+	++
636	-	+	-	+	++	+++	+++
652	++	-	-	++	+	+	++

Tabla 3 - continuación. Resultados de las pruebas de bioactividad antimicrobiana (antibacterial y antifúngica).

AISLADO #	MRSA	VRE	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Cladosporium cladosporioides</i> C1	<i>Cladosporium cladosporioides</i> C2	<i>Epicoccum nigrum</i> C3
659	-	-	-	+	+++	++	+++
660	++	-	-	++	+	+	++
663	+	-	-	+++	++	++	++
689	+	-	-	++	+++	++	+++
691	++	+	-	++	-	-	++
694	++	++	-	++	-	+++	+++
723	-	-	-	+	++	++	++
736	++	+	-	++	+++	+++	+++
744	++	-	-	++	++	++	++
745	-	-	-	++	++	++	++
766	-	-	-	++	+	+	++
775	-	-	-	+	+++	+++	++
790	+	-	+	+	+++	+++	++
805	-	-	++	-	++	++	++
809	-	-	++	++	++	++	++
837	-	-	-	+	++	++	+++
840	-	-	+	+	++	++	++
847	-	-	-	+	++	++	+++
864	-	-	-	+	+++	++	+++

Los 78 aislados seleccionados luego del proceso de dereplicación biológica utilizado, fueron llamados “aislados bioactivos”. De acuerdo a los datos de procedencia de cada uno de estos aislados, se encontró que en su mayoría provenían de cultivos con sedimentos pretratados con fenol (F), procesos de sonicación (U) y exposición a microondas (M) durante el proceso de aislamiento de actinobacterias (Tabla 4).

Tabla 4. Cantidad de aislados de actinobacterias con actividad antimicrobiana a partir de muestras de sedimentos de riberas del río Arauca, según punto de muestreo y pretratamiento físico-químico utilizado. S (Sin tratamiento); C (Carbonato de calcio); F (Fenol); M (Microondas); U (Sonicación) y T (Calor). El número en cada columna compara el total de aislados de actinobacterias obtenidos versus el total de aislados con actividad antimicrobiana encontrados luego del proceso de dereplicación biológica utilizado.

Pretratamiento	Puntos de muestreo				Total de aislados
	Punto 1	Punto 2	Punto 3	Punto 4	
S	35/5	55/0	22/0	47/4	159/9
C	34/6	34/2	36/1	40/4	144/13
F	51/12	46/1	32/4	29/3	158/20
M	47/11	57/3	24/0	37/3	165/17
U	43/10	41/3	26/1	33/4	143/18
T	4/0	3/0	3/0	11/1	21/1
Total de aislados	214/44	236/9	143/6	197/19	790/78

Estos tres pretratamientos físico-químicos han sido usados anteriormente como herramienta para el aislamiento de estos microorganismos debido a su capacidad de inhibir el crecimiento de otras bacterias y hongos no deseados sin producir un daño letal a las actinobacterias (Istianto 2012) y adicionalmente también han sido utilizados como métodos eficientes para aislar actinobacterias con diferentes características metabólicas y posible producción de nuevos productos naturales (Wang 2013, Hayakawa 2004). En el caso del fenol, este solvente puede ocasionar daños en la membrana celular y generar eflujo, denaturación de proteínas citoplasmáticas y acidez intracelular (Istianto Y 2012); por otro lado, las burbujas formadas por procesos de cavitación durante pretratamientos por sonicación, pueden generar la presión suficiente para romper enlaces a nivel molecular, denaturar enzimas y proteínas (Betts y Williams 1999) y finalmente ondas no ionizantes como las microondas pueden generar procesos de fricción entre moléculas polares como el agua, DNA y proteínas, generando vibración y daño celular

(Mishra et al 2013). Es posible que la resistencia de estos aislados de actinobacterias frente a los anteriores procesos físico-químicos, se asocie a una característica particular presente en estos microorganismos, como por ejemplo la presencia de esporas resistentes y la producción de metabolitos secundarios ante condiciones de estrés, haciéndolos capaces de producir diferentes respuestas ante condiciones adversas en el medio (Mendes et al 2007; Bentley et al 2002; Chaudhary et al 2013).

Por otro lado, el pretratamiento con CaCO_3 no mostró resultados relevantes en cuanto a la cantidad de aislados bioactivos obtenidos, en comparación con otros pretratamientos. De hecho, este pretratamiento generó resultados similares a los obtenidos a partir de las muestras sin pretratamiento (Tabla 4). Esto puede ser explicado a razón de los cambios de pH en las muestras de sedimentos al momento de usar CaCO_3 . En primer lugar, los suelos de Arauca se caracterizan por presentar una acidez entre 4.0 – 5.0 (Molano J 1968), dato que fue confirmado en las muestras acá analizadas (Tabla 1). De acuerdo a estos rangos de pH, los microorganismos que allí se pueden encontrar pueden clasificarse como organismos acidófilos o acidotolerantes. Ambos grupos tienen un límite inferior de pH para viabilidad de 3.5, con un valor de pH de 5.5 para crecimiento óptimo de microorganismos. Su diferencia radica en el valor del límite máximo de pH para ser viables, en donde las actinobacterias verdaderamente acidofílicas, no pueden crecer con valores de pH mayores a 6.5, mientras que las acidotolerantes pueden encontrarse en medios con valores de pH hasta de 7.5 (Poomthongdee N et al. 2014; Zakalyukina YV et al. 2002). Por lo tanto, al permitir un incremento del valor del pH en muestras de sedimento de río moderadamente ácidas mediante el uso de carbonato de calcio, se estaría favoreciendo el aislamiento de actinobacterias acidotolerantes típicas de sedimentos de río con pH ácido que podrían ser similares, en cuanto a su potencial bioactivo, a aquellas obtenidas mediante el pretratamiento de siembra directa (sin pretratamiento).

Aunque se ha descrito que el uso de altas temperaturas (120°C) por tiempos prolongados sobre muestras biológicas favorece el aislamiento de diferentes géneros de actinobacterias con esporas resistentes a la desecación (Kumar RR and Vasantba JJ. 2016), en el caso acá descrito no fue

posible obtener un número alto de aislados (Tabla 2), lo que afectó considerablemente la posibilidad de obtener una mayor cantidad de aislados con potencial bioactivo antimicrobiano (Tabla 4). A diferencia de los otros pretratamientos realizados, en donde se lograron detectar al menos 9 aislados con potencial bioactivo antimicrobiano, el pretratamiento haciendo uso de altas temperaturas solo logró la obtención de un único aislado. Una posible explicación a esta diferencia, puede ser el efecto conjunto de la acidez de la muestra biológica en relación con la alta temperatura utilizada durante el pretratamiento. En el caso de las bacterias acidófilas y acidotolerantes, la captación de H^+ del medio circundante depende de la fluidez de la membrana, manteniendo una homeostasis de H^+ . Esta fluidez de membrana puede afectarse por cambios en las condiciones de temperatura del medio. De esta manera, la fluidez puede decaer a bajas temperaturas dificultando la captación H^+ o puede verse afectada por altas temperaturas provocando una alta permeabilidad de membrana generando en un incremento en la captación de H^+ , lo que al final se traduce en una acidificación letal del citoplasma celular (Leal GZ et al 2015). Es posible que este último efecto haya ocurrido durante el protocolo de pretratamiento térmico, ocasionando una drástica disminución en la población de actinobacterias dentro de las muestras analizadas y por lo tanto influyendo también en la posibilidad de detectar un mayor número de aislados con potencial bioactivo.

En relación a los puntos de muestreo y cantidad de aislados bioactivos encontrados, se observó que a partir del punto 1 se obtuvo la mayor cantidad de aislados de actinobacterias con potencial antimicrobiano (44 aislados) seguido del punto 4 (19), mientras que a partir de los puntos de muestreo 2 y 3, solo se obtuvieron 9 y 6 aislados bioactivos de actinobacterias, respectivamente (Tabla 4). Los puntos de muestreo en general comparten similares condiciones fisicoquímicas en cuanto a su acidez y bajo contenido de materia orgánica y micronutrientes (Ca^{2+} , K^+ , Mg^{2+} y Na^+) (Tabla 1). Sin embargo, se encontraron diferencias en cuanto a la humedad relativa, siendo los puntos 1 y 4 los sitios de muestreo con menor humedad relativa a comparación de los puntos 2 y 3 (Tabla 1). Si se tiene en cuenta que el contenido de humedad en el suelo reduce el estado de aireación del mismo ya que se disminuye la captación de O_2 al ser éste poco soluble en agua (Ramos y Zúñiga 2008), las muestras de sedimentos de los puntos 2 y 3 podrían considerarse

como muestras con baja oxigenación, en comparación con los sedimentos de los puntos 1 y 4, indicando que sedimentos de ríos tropicales con bajo contenido de humedad relativa favorecen el aislamiento de cepas de actinobacterias con potencial antimicrobiano.

2.4.3. MALDI-TOF MS e identificación molecular por amplificación de 16S rRNA

Paralelo a los ensayos de bioactividad antimicrobiana y a manera de análisis exploratorio en grandes colecciones biológicas de microorganismos, se realizó una dereplicación taxonómica en la colección completa de los 790 aislados de actinobacterias obtenidos, haciendo uso de MALDI-TOF MS y análisis de datos mediante software MALDI-TOF Biotyper 3.1.

En este caso, se llevó a cabo un agrupamiento por similitud según los perfiles protéicos de los ejemplares analizados. Para la generación del dendograma, una distancia para el punto de corte fue establecida de acuerdo a registros bibliográficos previos. Puntos de corte entre 150 a 850 han sido utilizados para la diferenciación de especies entre un mismo género (Matsumura Y et al 2014; Verroken A et al 2010), indicando que esta distancia puede variar significativamente al momento de realizar análisis para identificación de especies (Davies J and Davies D. 2010). Por esta razón no es posible establecer un punto exacto de corte para generación de dendogramas por similitud de perfiles protéicos, especialmente cuando la información taxonómica de los microorganismos a analizar es escasa o en muchos casos desconocida (Davies et al 2010; Natsume M et al 1989). Sin embargo, cuando se trabaja con grandes colecciones biológicas de microorganismos, es generalmente aceptable establecer puntos de corte mayores a 500 (Stets MI et al 2013), con el fin de identificar rápidamente aislados únicos o diferenciar grupos de microorganismos abundantes en la muestra biológica a analizar (Davies et al 2010). Para la colección de actinobacterias obtenida en este estudio, se realizó un dendograma con punto de corte de 700, logrando identificar 91 agrupamientos entre los cuales cuatro agruparon el 66.7% del total de aislados. Estos cuatro agrupamientos fueron denominados “clados mayoritarios” y fueron identificados como clado No. 90, con 345 aislados de actinobacterias, clado No. 89 con 86 cepas,

clado No. 87 y clado No. 91 con 48 individuos cada uno. Otros clados en el dendograma agruparon un promedio de 1 a 31 aislados y fueron llamados “clados minoritarios”.

Los 78 aislados de actinobacterias o “aislados bioactivos” que fueron seleccionados mediante la estrategia de priorización por embudo, fueron localizados en 20 clados distintos. Estos clados fueron catalogados como “clados bioactivos” siendo el 85% de éstos, clados minoritarios (Tabla 5).

Tabla 5. Clados de actinobacterias con actividad antimicrobiana detectados mediante MALDI-TOF MS y análisis de dendograma con cutoff de 700. Se muestra el porcentaje de los aislados bioactivos encontrados en cada uno de los clados. Los clados No. 89, 90 y 91 son clados mayoritarios.

CLADO	Total aislados actinobacterias	Aislados bioactivos encontrados	% aislados bioactivos
9	5	4	80
20	31	1	3,2
22	1	1	100
42	1	1	100
43	2	2	100
50	1	1	100
54	3	2	66,7
55	7	4	57,1
57	6	6	100
58	5	1	20
59	19	9	42,1
60	27	21	77,7
61	1	1	100
68	4	1	25
75	11	1	9,1
78	4	3	75
79	4	1	25
89	86	2	2,3
90	345	13	3,7
91	48	3	6,3
TOTAL	790	78	9,87

La localización de los aislados bioactivos dentro del grupo de clados minoritarios, sugiere que éstos pueden ser catalogados como cepas de actinobacterias poco abundantes en la muestra biológica analizada y con perfiles protéicos que pueden estar asociados a la producción de metabolitos antimicrobianos frente a las cepas patógenas acá evaluadas. Teniendo en cuenta que

la mayoría de estos aislados bioactivos y de baja abundancia provenían de muestras biológicas pretratadas con fenol, procesos de sonicación y exposición a microondas (Tabla 4), se puede sugerir que la estrategia de aislamiento y dereplicación de microorganismos planteada en este estudio, facilita la detección de actinobacterias con capacidad de producción de metabolitos bioactivos antimicrobianos frente a por lo menos una bacteria y un hongo patógeno de *Staphylococcus aureus* - MRSA, *Enterococcus faecium* - VRE, *Klebsiella pneumoniae*, *Bacillus subtilis* *Cladosporium cladosporioides* y *Epicoccum nigrum*.

Debido a que la agrupación de microorganismos en MALDI TOF-MS se basa en un análisis de similitud de la huella peptídica entre cada individuo, es posible pensar que estos microorganismos compartan también proximidad filogenética. Por esta razón, el total de los aislados bioactivos obtenidos fue llevado a secuenciación de 16S rRNA para identificación molecular, teniendo como resultado que la totalidad de aislados pertenecían a la familia Streptomycetaceae (Tabla 6).

Tabla 6. Identificación molecular de los aislados de actinobacteria con actividad antimicrobiana detectados mediante la estrategia de priorización por túnel. La clasificación de cada aislado se realizó por secuenciación de 16S rRNA y clasificación por base de datos SILVA Living Tree Project. Se muestra el punto de recolección y pretratamiento físicoquímico utilizado para la obtención de cada aislado; U: Sonicación; C: CaCO₃; M: Microonda; F: Fenol; T: Térmico; S: Siembra directa

Clado	Cantidad de aislados de actinobacterias	Cantidad de aislados bioactivos	Código del aislado bioactivo	Pretratamiento utilizado en la muestra	Punto de recolección de muestra	Identificación (98,7%)
9	5	4	439	U	P1	<i>Streptomyces hiroshimensis</i>
			559	C	P4	<i>Streptomyces lacticiproducens</i>
			736	C	P4	<i>Streptomyces hiroshimensis</i>
			775	M	P4	<i>Streptomyces hiroshimensis</i>
20	31	1	636	M	P2	<i>Nonomuraea candida</i>
22	1	1	388	M	P2	<i>Streptomyces werraensis</i>
42	1	1	694	U	P4	<i>Streptomyces</i> sp.
43	2	2	276	S	P4	<i>Streptomyces griseofuscus</i>
			290	C	P1	<i>Streptomyces albospinus</i>
50	1	1	444	U	P1	<i>Streptomyces lunalinnaresii</i>
54	3	2	652	M	P4	<i>Streptomyces</i> sp.
			515	S	P4	<i>Streptomyces sioyaensis</i>
55	5	4	376	M	P1	<i>Streptomyces luteireticuli</i>
			445	U	P1	<i>Streptomyces</i> sp.
			571	F	P1	<i>Streptomyces luteireticuli</i>
			572	F	P1	<i>Streptomyces luteireticuli</i>

Tabla 6 - continuación. Identificación molecular de los aislados bioactivos a nivel antimicrobiano detectados mediante la estrategia de priorización por túnel.

Clado	Cantidad de aislados de actinobacterias	Cantidad de aislados bioactivos	Código del aislado bioactivo	Pretratamiento utilizado en la muestra	Punto de recolección de muestra	Identificación (98,7%)
57	6	6	288	C	P1	<i>Streptomyces sparsogenes</i>
			377	M	P1	<i>Streptomyces cinnamoneus</i>
			481	S	P1	<i>Streptomyces griseoaurantiacus</i>
			575	F	P1	<i>Streptomyces cinnamoneus</i>
			809	F	P1	<i>Streptomyces cinnamoneus</i>
			840	F	P1	<i>Streptomyces cinnamoneus</i>
58	5	1	104	C	P4	<i>Streptomyces albolongus</i>
59	19	9	247	S	P1	<i>Streptomyces</i> sp.
			397	M	P2	<i>Streptomyces morookaense</i>
			568	F	P1	<i>Streptomyces morookaense</i>
			612	M	P1	<i>Streptomyces luteosporus</i>
			689	U	P4	<i>Streptomyces pseudoechinosporus</i>
			745	F	P1	<i>Streptomyces morookaense</i>
			766	M	P1	<i>Streptomyces orinoci</i>
			837	C	P1	<i>Streptomyces lacticiproducens</i>
			864	T	P4	<i>Streptomyces lacticiproducens</i>

Tabla 6 - continuación. Identificación molecular de los aislados bioactivos a nivel antimicrobiano detectados mediante la estrategia de priorización por túnel.

Clado	Cantidad de aislados de actinobacterias	Cantidad de aislados bioactivos	Código del aislado bioactivo	Pretratamiento utilizado en la muestra	Punto de recolección de muestra	Identificación (98,7%)
60	29	21	5	S	P1	<i>Streptomyces lunalinnaresii</i>
			135	F	P3	<i>Streptomyces aureocirculatus</i>
			138	F	P3	<i>Streptomyces puniceus</i>
			160	M	P1	<i>Streptomyces mobaraensis</i>
			197	M	P4	<i>Streptomyces misionensis</i>
			201	U	P1	<i>Streptomyces lunalinnaresii</i>
			208	U	P1	<i>Streptomyces kasugaensis</i>
			326	F	P1	<i>Streptomyces mashuensis</i>
			381	M	P1	<i>Streptomyces ramulosus</i>
			448	U	P2	<i>Streptomyces albulus</i>
			479	S	P1	<i>Streptomyces mashuensis</i>
			516	S	P4	<i>Streptomyces</i> sp.
			531	C	P1	<i>Streptomyces hirosimensis</i>
			616	M	P1	<i>Streptomyces yunnanensis</i>
			619	M	P1	<i>Streptomyces yunnanensis</i>
			626	M	P1	<i>Streptomyces lunalinnaresii</i>
			627	M	P1	<i>Streptomyces lydicus</i>
			659	U	P1	<i>Streptomyces yunnanensis</i>
			660	U	P1	<i>Streptomyces mobaraensis</i>
			723	C	P1	<i>Streptomyces albospinus</i>
847	U	P2	<i>Streptomyces albospinus</i>			

Tabla 6 - continuación. Identificación molecular de los aislados bioactivos a nivel antimicrobiano detectados mediante la estrategia de priorización por túnel

Clado	Cantidad de aislados de actinobacterias	Cantidad de aislados bioactivos	Código del aislado bioactivo	Pretratamiento utilizado en la muestra	Punto de recolección de muestra	Identificación (98,7%)
61	1	1	213	U	P1	<i>Streptomyces lanatus</i>
68	4	1	530	S	P4	<i>Streptomyces noursei</i>
75	11	1	243	U	P4	<i>Streptomyces sparsogenes</i>
78	4	3	365	F	P4	<i>Streptomyces lydicus</i>
			744	F	P1	<i>Streptomyces hygroscopicus</i>
			790	U	P3	<i>Streptomyces iranensis</i>
79	4	1	805	C	P3	<i>Streptomyces sioyaensis</i>
89	86	2	330	F	P1	<i>Streptomyces puniscabei</i>
			356	F	P4	<i>Streptomyces corchorusii</i>
90	345	13	67	C	P2	<i>Streptomyces puniscabei</i>
			93	C	P4	<i>Streptomyces griseofuscus</i>
			112	F	P1	<i>Streptomyces lacticiproducens</i>
			126	F	P2	<i>Streptomyces padanus</i>
			152	F	P4	<i>Streptomyces albospinus</i>
			220	U	P2	<i>Streptomyces phaeoluteigriseus</i>
			292	C	P1	<i>Streptomyces murinus</i>
			297	C	P2	<i>Streptomyces lanatus</i>
			335	F	P1	<i>Streptomyces kebangsaanensis</i>
			382	M	P1	<i>Streptomyces puniscabei</i>
			443	U	P1	<i>Streptomyces griseofuscus</i>
			663	U	P1	<i>Streptomyces cinnamoneus</i>
691	U	P4	<i>Streptomyces sp.</i>			

Tabla 6 – continuación. Identificación molecular de los aislados bioactivos a nivel antimicrobiano detectados mediante la estrategia de priorización por túnel.

Clado	Cantidad de aislados de actinobacterias	Cantidad de aislados bioactivos	Código del aislado bioactivo	Pretratamiento utilizado en la muestra	Punto de recolección de muestra	Identificación (98,7%)
91	48	3	140	F	P3	<i>Streptomyces misionensis</i>
			145	F	P3	<i>Streptomyces parvulus</i>
			246	S	P1	<i>Streptomyces graminisoli</i>

Reportes previos acerca del uso de MALDI TOF-MS como herramienta para clasificación de especies (Loucif 2014, Singhal 2015) refieren que sus resultados son equiparables a los obtenidos mediante identificación por 16S rRNA. Es decir, la clasificación taxonómica generada según la base de datos por huella peptídica en MALDI TOF-MS es comparable con los resultados obtenidos a través de secuenciación molecular. Para la clasificación taxonómica en MALDI TOF-MS, es necesario que el equipo cuente con una base de datos lo suficientemente robusta en cuanto a la información de los perfiles protéicos de varias especies de microorganismos. Existen dos casas comerciales que actualmente lideran en el mercado y proporcionan esta información: Bruker Daltonics, (Bremen, Germany) a través del software y base de datos MALDI Biotyper y bioMérieux, (Marcy l'Etoile, France) mediante el software y base de datos Vitek MS (Angeletti S 2016). Generalmente estas dos bases de datos contienen información acerca de microorganismos que son comúnmente detectados en el ámbito clínico, es decir, para la identificación de cepas patógenas de una manera rápida y de bajo costo (Angeletti S 2016). Sin embargo, la información acerca de la huella peptídica de otro tipo de microorganismos no patógenos o provenientes de muestras ambientales es escasa, generando que la mayoría de aislados microbiológicos de

muestras ambientales poco estudiadas deban ser identificados mediante otras herramientas moleculares como el 16S rRNA.

En el caso de este estudio y a pesar de que la totalidad de los aislados fueron analizados por MALDI TOF-MS a partir de iguales condiciones de crecimiento (nutrientes, temperatura y tiempo), no se logró identificación taxonómica a nivel de género y especie con la base de datos utilizada (Maldi Biotyper), lo que puede indicar que la muestra biológica acá analizada es poco conocida utilizando este software.

Al momento de trasladar la información de identificación molecular por 16S rRNA a cada uno de los aislados bioactivos dentro de un mismo clado, se lograron detectar resultados similares entre algunos ejemplares. Por ejemplo, en el clado No. 9 compuesto por 4 aislados bioactivos, se presentaron 3 ejemplares con igual identificación molecular. Caso similar ocurrió al interior de los clados adicionales. Es probable que este resultado se genere como efecto del proceso de aislamiento, ya que posibles réplicas de una misma especie pudieron ser cultivadas. Los análisis de proximidad filogenética dentro de los clados bioactivos fueron realizados usando la base de datos ARB, evidenciando un porcentaje de similitud entre el 98-99% entre cada uno de los aislados agrupados.

2.5. CONCLUSIONES

Aunque sigue siendo preocupante la baja tasa en el descubrimiento de productos naturales bioactivos a partir de microorganismos, debido al efecto continuo de “redescubrimiento” de metabolitos bioactivos, el uso de diferentes estrategias para evitar este problema ha generado una combinación de metodologías a nivel biológico y químico que permiten acercarse al biodescubrimiento de potenciales agentes antimicrobianos. En el estudio propuesto, tres estrategias fueron realizadas: 1. Recolección de muestras biológicas en ambientes poco estudiados como es el caso de sedimentos de ríos tropicales en Colombia; 2. Uso de pretratamientos físico-químicos sobre la muestra biológica colectada con el fin de favorecer el

crecimiento y la observación de actinobacterias de difícil aislamiento; 3. Uso de estrategias de dereplicación biológica a manera de priorización por embudo con el fin de detectar aislados potencialmente bioactivos a nivel antimicrobiano.

Esta metodología combinada permitió detectar aislados de actinobacterias bioactivos que se encontraban en baja abundancia dentro de la muestra biológica, dato que fue observado mediante el análisis de similitud por perfiles protéicos mediante MALDI TOF-MS. Los aislados obtenidos se identificaron como diferentes cepas de *Streptomyces* con actividad antimicrobiana frente a bacterias y hongos patógenos: *Staphylococcus aureus*-MRSA resistente a la meticilina, *Enterococcus faecium*-VRE resistente a la vancomicina, extended-spectrum β -lactamase *Klebsiella pneumoniae*, *Cladosporium cladosporioides* y *Epicoccum nigrum*.

Estos resultados permiten establecer que ambientes poco estudiados como por ejemplo los sedimentos de ríos tropicales de la Orinoquía colombiana son un valioso recurso biológico para enfocar estudios a favor del biodescubrimiento de productos naturales en microorganismos. Adicionalmente, el uso de pretratamientos físico-químicos sobre este tipo de muestras biológicas, en específico el uso de solventes como el fenol, procesos de sonicación y exposición a ondas no ionizantes como las microondas, favorecen el aislamiento de diferentes especies de actinobacterias con bioactividad antimicrobiana y que se caracterizan por ser de baja abundancia en este tipo de muestras biológicas. Y finalmente, una estrategia de dereplicación biológica hacia una bioactividad particular, permite la detección y priorización de cepas con una actividad biológica asociada, las cuales pueden ser analizadas a mayor profundidad como posibles productoras de metabolitos bioactivos potencialmente nuevos.

A la fecha, este es primer reporte acerca del potencial bioactivo de las actinobacterias asociadas a los sedimentos del río Arauca en Colombia, lo que abre una puerta al biodescubrimiento en los ríos de la Orinoquía Colombiana.

2.6 BIBLIOGRAFIA

1. Angeletti, Silvia, Matrix Assisted Laser Desorption Time of Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS) in Clinical Microbiology, *Journal of Microbiological Methods* (2016), doi:10.1016/j.mimet.2016.09.00
2. Atlas RM. 2010. *Handbook of Microbiological Media*. Fourth Edition. ASM Press. Washington D.C.
3. Barros ME, Santos DA and Hamdam JS. In vitro methods for antifungal susceptibility testing of *Trichophyton* spp. *Mycol Res*, 2006; 110: 1355-1360
4. Bentley SD, Chater K. F., Cerdeño 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.-A., 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. 2002. Complete genome sequence of the model actinomycete *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Nature*. Vol 417.
5. Betts GD y Williams A. 1999. Ultrasonic standing waves: Inactivation of foodborne microorganisms using power ultrasound. *Encyclopedia of Food Microbiology*, Volume 3. p 659-664
6. Bredholt H, Fjærvik E, Johnsen G and Zotchev SB. 2008. Actinomycetes from Sediments in the Trondheim Fjord, Norway: Diversity and Biological Activity. *Mar. Drugs*, 6(1), 12–24
7. Bull AT. 2011. Actinobacteria of the Extremobiosphere. In Horikoshi, Koki and Antranikian, Garabed and Bull, AT and Robb, FT and Stetter, KO, (eds), *Extremophiles Handbook* Springer, Japan: pp 1203-1240
8. Bull AT. 2011. Actinobacteria of the Extremobiosphere. In: Horikoshi, Koki and Antranikian, Garabed and Bull, Alan T. and Robb, Frank T. and Stetter, Karl O., eds. *Extremophiles Handbook*. Springer, pp. 1203-1240. ISBN 978-4-431-53897-4.
9. Chaudhary HS, Yadav J, Shrivastava AR, Singh S, Singh AK, Gopalan N. 2013. Antibacterial activity of actinomycetes isolated from different soil samples of Sheopur (A city of central India). *J. Adv. Pharm. Tech. Res.* Vol 4(2).
10. Croxatto A, Prod`hom G, Greub G. 2012. Applications of MALDI-TOF mass spectrometry in clinical diagnostic microbiology. *FEMS Microbiol Rev.* 36: 380-407
11. Davies J and Davies D. 2010. Origins and Evolution of Antibiotic Resistance. *Microbiology and Molecular Biology Reviews.* p. 417–433
12. Demirev PA, Ho P, Ryzhov V, Fenselau C. 1999. Microorganism identification by mass spectrometry and protein database searches. *Anal Chem.* 71: 2732-2738
13. El-sayed MH. Di-(2-ethylhexyl) Phthalate, a Major Bioactive Metabolite with Antimicrobial and Cytotoxic Activity Isolated from the Culture Filtrate of Newly Isolated Soil *Streptomyces* (*Streptomyces mirabilis* Strain NSQu-25). *World Appl Sci J*, 2012; 20: 1202-1212
14. Forner D, Berrué F, Correa H, Duncan K, Kerr R. Chemical dereplication of marine actinomycetes by liquid chromatography–high resolution mass spectrometry profiling and

- statistical analysis. *Anal Chim Acta*, 2013; 805: 70–79. *Frontiers in Microbiology*. Vol 6. Article 791.
15. FUPAD. 2013. Documento diagnóstico del Departamento de Arauca. Ministerio del Trabajo. República de Colombia. Opciones Gráficas Editores Ltda
 16. Genilloud O, González I, Salazar O, Martín J, Tormo JR, Vicente F. 2011. Current approaches to exploit actinomycetes as a source of novel natural products. *J Ind Microbiol Biotechnol*. 38:375–389
 17. Hayakawa M, Sadakata T, Kajiura T, Nonomura H. 1991. New Methods for the Highly Selective Isolation of Micromonospora and Microbispora from Soil. *Journal of Fermentation and Bioengineering*. Vol. 72 No. 5, 320-326
 18. Hayakawa M, Yoshida Y, Limura Y. 2004. Selective isolation of bioactive soil actinomycetes belonging to the *Streptomyces violaceusniger* phenotypic cluster. *Journal of Applied Microbiology*, 96, 973–981
 19. Istianto Y, Koesoemowidodo RSA, Saputra H, Watanabe Y, Pranamuda H and Marwoto B. Application of Phenol Pretreatment for the Isolation of Rare Actinomycetes from Indonesian Soil. *Microbiol Indones*, 2012; Vol 6: No 1, p 42-47
 20. Ito, T and Masubuchi, M. 2014. Dereplication of microbial extracts and related analytical technologies. *The Journal of Antibiotics*. 67.; 353–360
 21. Jiang Y, Chen X, Lou K, Mao P. Cultivable soil actinomycete communities in some areas of western China. *Acad J Biotechnol*, 2013; 1: 001-013
 22. Khanna M, Solanki R and Lal R. 2011. Selective isolation of rare actinomycetes producing novel antimicrobial compounds. *International Journal of advanced Biotechnology and Research*. Vol 2, Issue 3, pp 357-375
 23. Komarova AS, Likhacheva AA y Zvyagintsev DG. 2008. Influence of Microwave Radiation on Soil Bacteria. *Moscow University Soil Science Bulletin*, Vol. 63, No. 4, pp. 190–195
 24. Kumar RR and Vasantba JJ. 2016. Isolation of Actinomycetes: A Complete Approach. *Int.J.Curr.Microbiol.App.Sci* (2016) 5(5): 606-618
 25. Lartigue MF. 2013. Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry for bacterial strain characterization. *Infection, Genetics and Evolution* 13:230–235
 26. Leal GZ, Ferreira D and Vermelho AB. 2015. Marine Extremophiles: A Source of Hydrolases for Biotechnological Applications. *Mar. Drugs*, 13, 1925-196
 27. Leiva S, Yáñez M and Zaror L. Actividad Antimicrobiana de actinomycetes aislados desde ambientes acuáticos del sur de Chile. *Rev Med Chile*, 2004; 132: 151-159
 28. Li YV, Terekhova LP y Gapochka MG. 2002. Isolation of actinomycetes from soil using extremely high frequency radiation. *Microbiology*, Vol. 71, No. 1, 2002, pp. 105–108.
 29. Loucif L, Bendjama E, Gacemi-Kiraneb D, Rolain JM. 2014. Rapid identification of *Streptomyces* isolates by MALDI-TOF MS. *Microbiological Research* 169: 940–947
 30. Matsumura Y, Yamamoto M, Nagao M, Tanaka M, Machida K, Ito Y, Takakura S, Ichiyama S. Detection of Extended-Spectrum- β -Lactamase-Producing *Escherichia coli* ST131 and ST405 Clonal Groups by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight Mass Spectrometry *Journal of Clinical Microbiology*, 2014; Volume 52: Number 4, p 1034–1040
 31. Mendes, M. V., Tunca, S., Antón, N., Recio, E., Sola-Landa, A., Aparicio, J. F. y Martín, J. F. 2007. The two-component *phoR-phoP* system of *Streptomyces natalensis*: Inactivation or

- deletion of *phoP* reduces the negative phosphate regulation of pimaricin biosynthesis. *Metab Eng* 9: 217-227.
32. Mishra T, Kushwah P, Dholiya K, Kothari V. 2013. Effect of Low Power Microwave Radiation on Microorganisms and other Life Forms. *Advances in Microwave and Wireless Technologies*. 4-11
 33. Molano J. 1968. Los Territorios Nacionales – Arauca. *Boletín de la Sociedad Geográfica de Colombia*. No. 97. Vol 26; Leyva P et al. 2000. Diagnóstico ambiental y lineamientos para un uso sostenible del área de Caño Limón. Instituto de Hidrología, Meteorología y Estudios Ambientales-IDEAM. Colombia
 34. Muñoz R, López A, Urdiain M, Moore ERB, Rosselló R. Evaluation of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight whole cell profiles for assessing the cultivable diversity of aerobic and moderately halophilic prokaryotes thriving in solar saltern sediments *Syst Appl Microbiol*, 2011; 34: 69–75
 35. Natsume M, Yasui K, Marumo S. 1989. Calcium ion regulates aerial micellium formation in actinomycetes. *The Journal of antibiotics*. Vol XLII No. 3
 36. Naveena B, Sakthiselvan P, Elaiyaraju P, Partha N. 2012. Ultrasound induced production of thrombinase by marine actinomycetes: Kinetic and optimization studies. *Biochemical Engineering Journal* 61, 34–42
 37. Niyomvong N, Pathom-aree W, Thamchaipenet A, Duangmal K. 2012. Actinomycetes from Tropical Limestone Caves. *Chiang Mai J. Sci.* 39(3): 373-388
 38. ODDR-Observatorio de Procesos de Desarme, Desmoviliación y Reintegración. 2013. Caracterización Región de La Orinoquía. Universidad Nacional de Colombia. Sede Bogotá
 39. Otoguro M, Hayakawa M, Yamazaki T, Imura Y. 2001. An integrated method for the enrichment and selective isolation of *Actinokineospora* spp. in soil and plant litter. *Journal of Applied Microbiology*. 91, 118-130
 40. Pastrana-Camacho N, Suárez Z, Acosta-González A, Arango C, Haltli B, Correa H, Kerr R, Duque C, Díaz LE. Bioprospecting for culturable Actinobacteria with antimicrobial properties isolated from Rivers from the Colombian Orinoquia. *Trop J Pharm Res*, 2016; 15: 1259-1265
 41. Poomthongdee N, Duangmal K and Pathom-aree W. 2014. Acidophilic actinomycetes from rhizosphere soil: diversity and properties beneficial to plants. *The Journal of Antibiotics*, 1–9
 42. Qiu D, Ruan J, Huang Y. 2008. Selective Isolation and Rapid Identification of Members of the Genus *Micromonospora*. *Applied and Environmental Microbiology*. Vol 74, No. 17. p. 5593–5597
 43. Ramos E y Zúñiga D. 2008. Efecto de la humedad, temperatura y pH del suelo en la actividad microbiana a nivel de laboratorio. *Ecología Aplicada*, 7(1,2)
 44. Sahu B y Roymon MG. 2017. Review on current techniques in isolation and characterization of *Streptomyces* from soil. *Indian J.Sci.Res.* 13 (2): 226-232.
 45. Singhal N, Kumar N, Kanaujia PK and Virdi JS. 2015. MALDI-TOF mass spectrometry: an emerging technology for microbial identification and diagnosis
 46. Stets MI, Soares A, Fernandes L, Maltempi E, Guimarães VF, Couto A, Reynaud MB, Monteiro RA, Pedrosa F, Magalhães L. Rapid identification of bacterial isolates from

- wheat roots by high resolution whole cell MALDI-TOF MS analysis. *J Biotechnol.* 2013 165:167– 174
47. Subramani R y Aalbersberg W. 2013. Culturable rare Actinomycetes: diversity, isolation and marine natural product discovery. *Appl Microbiol Biotechnol* 97:9291–9321
 48. Tiwari K y Gupta RK. 2014. Bioactive Metabolites from Rare Actinomycetes. *Studies in Natural Products Chemistry, Cap 14. Vol. 41. P 419-512*
 49. Undabarrena A, Beltrametti F, Claverias FP, González M, Moore ERB, Seeger M, Cámara B. Exploring the diversity and antimicrobial potential of marine actinobacteria from the Comau Fjord in Northern Patagonia, Chile. *Front Microbiol*, 2016; 7:1-16
 50. USDA. 1998. United States Department of Agriculture, Natural Resources Conservation Service: Soil Quality Information Sheet - Soil Quality Indicators: pH
 51. Velho-Pereira S and Kamat NM. Antimicrobial Screening of Actinobacteria using a Modified Cross-Streak Method, 2011; 73(2): 223–228
 52. Verroken A, Janssens M, Berhin C, Bogaerts P, Huang TD, Wauters G, Glupczynski Y. Evaluation of matrix assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for identification of *Nocardia* species. *J Clin Microbiol*, 2010; 48(11):4015–4021
 53. Wang DS, Xue Q H, Zhu WJ, Zhao J, Duan JL, Shen GH. Microwave Irradiation is a Useful Tool for Improving Isolation of Actinomycetes from Soil. *Microbiology*, 2013; 82: 102–110
 54. Welker M and Moore ERB. Applications of whole-cell matrix-assisted laser-desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry in systematic microbiology. *Syst Appl Microbiol*, 2011; 34: 2–11
 55. Wink J, Mohammadipanah F, Panahi HKS. 2017. Practical Aspects of Working with Actinobacteria. In: *Biology and Biotechnology of Actinobacteria*. Wink J, Mohammadipanah F, Hamedi J. Springer Ed. Switzerland. 2017. Chapter 11.
 56. WWF-Colombia 2016, Universidad de Maryland, Instituto von Humboldt y Fundación Omacha. 2016. Reporte de salud de la cuenca del río Orinoco en Colombia. Cali: WWF-Colombia
 57. WWF-Colombia 2017. Colombia Viva: un país megadiverso de cara al futuro. Informe 2017. Cali: WWF-Colombia.
 58. Yang JY, Sanchez LM, Rath CM, Liu XT, Boudreau PD, Bruns N, Glukhov E, Wodtke A, de Felicio R, Fenner A, et al. 2013. Molecular Networking as a Dereplication Strategy. *J. Nat. Prod*, 76, 1686–1699.
 59. Zakalyukina YV, Zenova GM and Zvyagintsev DG .Acidophilic Soil Actinomycetes *Microbiology*, 2002; 71: 342–345
 60. Zhang J. Improvement of an Isolation Medium for Actinomycetes. *Mod Appl Sci*, 2011; 5: 124-127

CAPITULO 3

Dereplicación química en actinobacterias del río Arauca con actividad antimicrobiana y citotóxica

Uso de herramientas metabolómicas

3.1. INTRODUCCIÓN

El desarrollo de nuevos productos farmacéuticos o de aplicación clínica a partir de fuentes naturales enfrenta en la actualidad un alto índice de “redescubrimiento”, haciendo que el interés en este tipo investigaciones decaiga, si se tiene en cuenta que el tiempo y el costo invertido en este tipo de estudios por lo general es alto (Yuliana N et al 2011)

Diferentes estrategias para hacer frente a este escenario han sido realizadas modificando protocolos desde el momento mismo de la selección de la fuente natural que se desea trabajar. Colecta de muestras biológicas en lugares poco estudiados, metodologías para selección de microorganismos específicos, selección y manipulación de medios de cultivo y condiciones de mantenimiento de muestras para producción de distintos metabolitos secundarios, son algunas de las estrategias comúnmente utilizadas con el fin de encontrar un posible nuevo compuesto a partir de microorganismos.

Sin embargo, el uso de estas estrategias puede llegar a ser opacado si se tiene en cuenta que las colecciones de microorganismos con los que generalmente se trabajan en este tipo de investigaciones pueden incluir entre 200 a 1000 individuos, dificultando su manipulación, seguimiento y visualización de resultados. Estrategias de manejo de datos en donde se involucren metodologías de dereplicación utilizando bioensayos (dereplicación biológica), tecnologías hífenadas, análisis metabolómicos y uso de bases de datos en productos naturales (dereplicación química), son herramientas que en los últimos años han permitido el manejo de grandes colecciones biológicas con el fin de encontrar moléculas específicas, a medida que se reduce el flujo de trabajo (Yuliana et al 2011).

3.1.1 Dereplicación

La dereplicación, entendida como una estrategia para la eliminación de datos redundantes, entra entonces a jugar un papel importante en el manejo de grandes colecciones biológicas de microorganismos, en donde es común encontrar réplicas de aislados que al final generan iguales resultados a través de los mismos protocolos de manejo.

Una dereplicación biológica puede seleccionar aislados microbiológicos según: coloración de micelio aéreo, generación de pigmentos, morfología de hifas y esporas, y presencia de una bioactividad específica. En otros casos, esta selección de microorganismos se complementa con distintos análisis taxonómicos utilizando herramientas de identificación molecular como, por ejemplo: análisis de 16S rRNA, RFLPs, ITS y genes constitutivos, lo que permite detectar réplicas no observables en los primeros pasos de selección biológica (Yang et al 2013; Forner et al 2013, Hou et al 2012).

Por otro lado, una dereplicación química selecciona moléculas conocidas y redundantes a partir de los extractos crudos de una colección de microorganismos, con el fin de enfocar posteriores estudios en aquellas moléculas no conocidas y que puedan tener un interés particular como potencial nuevo agente bioactivo. Tecnologías como High Performance Liquid Chromatography (HPLC), Mass Spectrometry (MS), Nuclear Magnetic Resonance (NMR) o combinaciones de las anteriores son herramientas utilizadas durante la dereplicación química en colecciones microbiológicas de gran tamaño. Los datos que se obtienen a partir de estas herramientas como, por ejemplo: espectro ultravioleta (UV), tiempos de retención (rt), relación masa carga (m/z) y cambios químicos (H^1-C^{13}) son comparados con la información disponible en diferentes bases de datos acerca de compuestos ya conocidos y así poder establecer si el compuesto evaluado es una molécula descrita o si por el contrario es un potencial nuevo compuesto (Yang et al 2013; Gaudencio et al 2015; Forner et al 2013; Ito et al 2014). Dependiendo de la fuente natural estudiada, se encuentran bases de datos especializadas para la búsqueda de compuestos. En el caso de fuentes naturales microbiológicas, bases de datos como *AntiBase*, *MariLint* o *AntiMarin*, son las más conocidas y utilizadas, poniendo a disposición información química y biológica de entre 30.000 a 60.000 productos naturales (Blunt et al 2012).

3.1.2 Técnicas hífenadas

Se entiende como técnicas hífenadas el uso combinado de métodos cromatográficos y espectroscópicos para esclarecer preguntas acerca de la condición química de uno o varios compuestos. Las técnicas cromatográficas permiten diferenciar fracciones casi puras en un extracto crudo, mientras que las técnicas espectroscópicas generan información específica de las moléculas que componen el extracto, ayudando a la identificación de las mismas mediante bases de datos conocidas (Patel et al 2010).

Las técnicas cromatográficas generalmente empleadas para la obtención de fracciones en un extracto crudo son Cromatografía Líquida (LC), Cromatografía Líquida de Alto Rendimiento (HPLC) o Cromatografía de Gases (GC). Estas son acopladas a técnicas espectroscópicas como Infrarrojo por Transformación de Fourier (FTIR), Análisis de Fotodiodos (PDA) UV-vis, Espectrometría de Masas (MS), y Resonancia Magnética Nuclear (NMR), generando las técnicas hífenadas que actualmente se conocen como GC-MS, LC-MS, LC-PDA-MS, LC-MS-MS y LC-NMR, entre otras combinaciones (Patel et al 2010).

Las técnicas cromatográficas más utilizadas son LC, GC, HPLC acopladas a MS como técnica espectroscópica. En estos casos, la muestra o el extracto crudo es evaporado (GC-MS) o llevado como líquido (LC-MS) para ser separado a través de una columna cromatográfica. El tiempo que pasa desde el momento en que el extracto crudo es inyectado hasta que es eluído en la columna cromatográfica es conocido como tiempo de retención (rt). El extracto es entonces fragmentado utilizando procedimientos de ionización como Ionización por Electro spray (ESI) o Ionización por Presión Química (APCI). Esto permite que los datos acerca del peso molecular y patrón de fragmentación de los analitos sean detectados a través de los espectros de masas (MS). A pesar de que este análisis cualitativo posibilita un acercamiento hacia un tipo de compuesto conocido, esta metodología no necesariamente es exacta, ya que depende de la robustez de las bases de datos utilizadas para la comparación de las características químicas encontradas y de la propia naturaleza de los compuestos en el extracto, que en algunos casos pueden ser no conocidos o no incluidos en base de datos alguna (Patel et al 2010).

3.1.2.1 Cromatografía líquida de Alto Rendimiento (HPLC)

Una cromatografía líquida tradicional utiliza la fuerza de la gravedad para separar los diferentes componentes de una muestra en una fase estacionaria o columna cromatográfica. Por otro lado, la técnica de HPLC que también es conocida como Cromatografía Líquida de Alta Presión, utiliza una fase estacionaria reversa y altas presiones (hasta 400 atmosferas) para permitir el paso de la fase móvil a través de la columna cromatográfica (Thammana M 2016). La fase móvil es generalmente una mezcla de solventes (agua, metanol, acetonitrilo), mientras que la fase estacionaria se compone de un material granular de 2 μm - 50 μm de poro, 2.1-4.6 mm de diámetro y 30-250 mm de largo. Estas características le confieren al HPLC un poder de resolución mayor en comparación con la cromatografía líquida tradicional, permitiendo reconocer y aislar diferentes componentes en una mezcla (Thammana M 2016). En HPLC, los parámetros de longitud y diámetro de la columna se encuentran directamente relacionados a la eficiencia, capacidad de resolución y tiempo de obtención de resultados. En cuanto a la longitud de la columna, se tiene que a una mayor longitud se logra una mayor eficiencia y resolución, pero con un tiempo de obtención de resultados mucho mayor al observado con columnas de menor longitud. Adicionalmente, un diámetro de columna mayor se relaciona con una mayor capacidad de carga, mientras que un diámetro más angosto permite obtener una mayor sensibilidad en la prueba.

3.1.2.2 Cromatografía líquida de Ultra Alto Rendimiento (UHPLC)

Propuesta como una técnica alternativa al HPLC, esta técnica ha sido catalogada como “amigable al medio ambiente” ya que utiliza una menor cantidad de solvente, generando una mayor eficiencia y resolución cromatográfica en un tiempo menor, características que influyen directamente en una disminución de costos operativos, convirtiéndola en una técnica atractiva para el análisis de compuestos. Para obtener esto, UHPLC trabaja con columnas cromatográficas con tamaños de poro menores a 2 μm , generando la necesidad de utilizar altas presiones sobre el solvente para que este pueda atravesar la columna. Como resultado, se genera una mayor velocidad en la obtención de datos (Cielecka-Piontek J et al 2013).

3.1.2.3 Técnicas espectroscópicas – Detectores PDA y MS

Como se había mencionado anteriormente, las técnicas cromatográficas generalmente se encuentran acopladas a técnicas espectroscópicas como por ejemplo UV o MS.

PDA – detector de iones según absorbancia de luz UV: El análisis de fotodiodos o PDA, es un detector o espectrómetro que utiliza luz ultravioleta (UV) con longitudes de onda entre 190-500 nm sobre la muestra luego de que ésta atraviesa la columna cromatográfica (Sheliya KG et al 2013). Se mide entonces la absorbancia en la muestra, la cual depende de las características químicas de sus componentes. No todos los compuestos generan absorbancia por UV. Esto depende directamente de la cantidad de enlaces insaturados presentes en la molécula, los cuales son excitados cuando son expuestos a la longitud de onda UV. Los detectores de UV son útiles cuando se tienen compuestos con cromóforos como por ejemplo compuestos aromáticos que logran generar absorbancia a 260 nm o menos, compuestos con uno o más de dos dobles enlaces (absorbancia aprox. 215 nm), compuestos alifáticos (absorbancia aprox. 205 nm), entre otros (Swartz M 2010). Compuestos sin estas características deben ser detectados utilizando acoplamientos a espectrómetros adicionales como por ejemplo el espectrómetro de masas-MS, el cual permite obtener información sobre el peso molecular y cantidad de un compuesto en un extracto crudo (Sheliya KG et al 2013).

Espectrometría de masas – MS: Los equipos para espectrometría de masas constan de tres partes: una fuente de ionización, un analizador de masas y un detector. La fuente de ionización tiene como fin la conversión de muestras líquidas o sólidas en muestras en fase gaseosa e ionizadas. Estas fuentes pueden ser: Ionización por Electro Spray (ESI), Ionización por presión atómica (APCI), Ionización asistida por matriz (MALDI), entre otras (Awad H et al 2015). ESI y MALDI son consideradas técnicas de ionización suave con poca fragmentación de analitos, siendo ESI el espectrómetro de masas comúnmente acoplado a HPLC. Para la ionización por ESI, es necesario que la muestra a analizar se encuentre en forma de solución para luego ser introducida en un capilar, a un flujo de 1-1000 $\mu\text{L}/\text{min}$ y con un voltaje de 3-6 kV. El voltaje puede ser negativo o positivo dependiendo de la naturaleza de la muestra y tiene como fin generar pequeñas gotas cargadas que son nebulizadas desde la punta del capilar hacia la atmósfera del equipo. La presión

en el sistema y la colisión continua de un gas inerte como el nitrógeno sobre las gotas permiten la evaporación completa del solvente y así los iones obtenidos y cargados pasan al analizador de masas (Awad H et al 2015). El analizador de masas se encarga de separar los iones de acuerdo a su relación de masa/carga (m/z) en un campo electromagnético. Analizadores tipo cuadrupolo, trampa de iones, tiempo de vuelo (TOF) y orbitrap son comúnmente utilizados en estos procesos. TOF y cuadrupolos son conocidos también como analizadores por pulso, ya que a través de éstos los iones pueden viajar y ser separados por el sistema mediante pulsos continuos. Por otro lado, los analizadores tipo trampa de iones y orbitrap caracterizan los iones de acuerdo a su frecuencia, la cual es generada por los movimientos oscilatorios de los iones cuando éstos llegan al eje central del analizador. Obtener la frecuencia de estas oscilaciones permite establecer el m/z de un ión ya que ésta es inversamente proporcional a la raíz cuadrada de la relación masa-carga (m/z) (Demartini DG 2013 en Varela A 2013). Una vez los iones son separados, el proceso finaliza en un detector. Para la detección de un ión en un espectro cromatográfico, es necesario que este genere primero una corriente eléctrica que luego pueda ser medida en términos de voltaje. Sistemas como los Multiplicadores de Electrones (EM) o los Tubos Fotomultiplicadores (PMT) son los encargados de detectar el ión y convertirlo en un grupo de electrones cuya corriente puede ser medida en términos de voltaje. Los sistemas de detección se componen de una serie de fotoplasmas llamadas dianodos, que se encuentran en lados opuestos al interior de un tubo fotodetector. El primer paso es la conversión del ión en electrones. Para esto es necesario que a la entrada del detector se encuentre un fotocátodo o fotoplasma de carga negativa (cátodo), que al recibir el impacto del ión libere electrones al medio. Los electrones liberados impactan luego en una fotoplasma de carga positiva llamada dínodo, liberando más electrones. Estos a su vez se dirigen a un dínodo opuesto con carga positiva mayor, liberando una mayor cantidad de electrones. Este proceso se repite a lo largo del tubo fotodetector hasta obtener un conteo de aproximadamente 10^6 electrones por segundo en el ánodo, generando una corriente que es medible como voltaje a partir de un ión (Koppelaar et al 2005). La generación de estos datos genera información acerca de la relación masa/carga de los metabolitos presentes en los extractos crudos analizados, permitiendo el conocimiento de su peso molecular, el cual puede ser

buscado en bases de datos de productos naturales para poder establecer si se trata de un compuesto conocido o no.

3.1.3 Acercamiento metabolómico – Relación entre perfiles químicos (cromatográficos) y PCA

El uso de técnicas hífenadas permite la detección de una gran cantidad de iones en extractos crudos provenientes de fuentes naturales. Estos iones pueden ser relacionados a compuestos ya conocidos mediante su búsqueda en bases de datos, partiendo de diferentes características químicas como por ejemplo su peso molecular. Teniendo en cuenta que el interés de una estrategia de dereplicación es detectar aquello que no es conocido y que la cantidad de iones que pueden encontrarse en un extracto crudo es alta, la búsqueda de posibles nuevos compuestos en bases de datos puede ser difícil y tomar largo tiempo.

Debido a esto y ante la necesidad de acortar tiempos en la búsqueda y análisis de nuevos productos naturales, otras estrategias han sido creadas en los últimos años como metodologías complementarias de dereplicación.

Herramientas estadísticas como el análisis multivariado (MDVA) facilitan la visualización de posibles nuevos productos naturales sobre las muestras analizadas, agrupando datos similares y dejando al descubierto resultados con características diferentes (Yuliana et al 2011). El Análisis de Componentes Principales (PCA) es uno de los métodos de análisis multivariado más utilizado en estudios para el biodescubrimiento de nuevos productos naturales. Se caracteriza por ser un análisis estadístico no supervisado, diseñado para obtener una representación visual del agrupamiento de extractos o metabolitos similares dejando en evidencia aquellos con características diferentes (Cheng 2016). PCA describe la varianza entre los perfiles cromatográficos de los extractos tomando como base distintas variables (características químicas como por ejemplo r_t y m/z). Una matriz de datos que involucra las características químicas de cada uno de los extractos evaluados y sus respectivos valores debe ser generada para la evaluación de los gráficos de análisis multivariado. A partir de la matriz, la varianza entre extractos puede ser visualizada en Componentes Principales (PCs) (Rajalahti et al 2011) y dependiendo de la dirección en que se quieran observar en un espacio x,y,z (ortogonalidad), se puede tener una mayor o menor varianza entre datos. De esta manera, aunque se pueden visualizar gráficamente

varios análisis de componentes principales, es el primer componente principal quien muestra la mayor varianza, permitiendo diferenciar claramente grupos de extractos con características similares de extractos aislados o con características distintas. Paralelamente y dependiendo del PC que se evalúe, este análisis multivariado asigna un valor a cada uno de los puntos sobre la matriz (relación entre las características químicas evaluadas en cada uno de los extractos en el PC escogido). Estos valores son graficados en un “score plot”, lo que permite identificar “outliers” o datos no agrupados de otros clusters o agrupaciones. Esta metodología permite detectar, en una gran colección de microorganismos, no solo extractos crudos con perfiles cromatográficos diferentes, si no también metabolitos (outliers) dentro de esos extractos crudos con características químicas poco comunes en la muestra evaluada y que pueden conducir a la obtención de posibles nuevos compuestos.

Otros análisis estadísticos multivariados como por ejemplo el análisis discriminante por mínimos cuadrados parciales (PLS-DA) y el análisis discriminante por mínimos cuadrados ortogonales (OPLS-DA), se caracterizan por ser estudios supervisados en donde las variables o características químicas de los metabolitos a analizar (ej. m/z) son identificadas y agrupadas de acuerdo a una clasificación ya establecida utilizando patrones conocidos (Cheng 2016). Estos análisis son empleados cuando el PCA no permite una visualización de datos o la separación de grupos es difícil. En estos casos, variables adicionales conocidas son empleadas, siendo los resultados por bioactividad (activo o inactivo), las variables utilizadas en el caso de los estudios bioprospectivos (Cheng 2016).

El uso de estos tipos de análisis estadísticos sobre perfiles cromatográficos de extractos crudos obtenidos por técnicas hífenadas es una herramienta útil para el análisis metabolómico de muestras de diferentes fuentes naturales, entendiendo metabolómica como la medida global de pequeños metabolitos en un sistema biológico y que es complementaria a las características fenotípicas y genotípicas de las muestras que se analicen (Hou et al 2012, Yuliana et al 2011). Establecer una metodología específica para el estudio metabolómico en extractos crudos de microorganismos, depende de las características propias de las muestras y a la facilidad de acceso a equipos, software y bases de datos especializadas. Las metodologías que presentan mayor facilidad de acceso y agilidad en obtención de resultados a partir de extractos crudos de

microorganismos generalmente incluyen el uso de UHPLC-HRMS, análisis estadístico por PCA, búsqueda por bases de datos tipo AntiBase y ensayos biológicos complementarios con los extractos crudos (Hou et al 2012, Forner et al 2013).

3.2 OBJETIVO PROPUESTO

Las actinobacterias se caracterizan por ser un grupo de microorganismos productor de alto número de productos naturales bioactivos, siendo el género *Streptomyces* su mayor representante (Demain et al 2009; Bérdy 2005). El planteamiento de estrategias para la detección de potenciales nuevos compuestos a partir de actinobacterias es un reto constante en la investigación bioprospectiva en microorganismos. Metodologías, estrategias de análisis y uso de equipos e información especializada juegan en conjunto un papel clave para descubrir nuevos compuestos de origen biológico aún desconocidos en la actualidad y que pueden tener una aplicación relevante a nivel de la sociedad.

Teniendo en cuenta lo anterior, el presente capítulo muestra una metodología de dereplicación para detección de productos naturales potencialmente nuevos, con capacidad antimicrobiana y citotóxica, a través de herramientas de análisis metabolómico como UHPLC-HRMS, PCA y AntiBase. Ensayos biológicos complementarios (pruebas de citotoxicidad) fueron realizados en paralelo con el fin de generar una segunda etapa de priorización de muestras y así facilitar la búsqueda de compuestos potencialmente nuevos con capacidad antimicrobiana y citotóxica por AntiBase.

3.3 MATERIALES Y MÉTODOS

3.3.1. Fermentación a microescala de aislados de actinobacterias del río Arauca con potencial antimicrobiano

La realización de cultivos a microescala permite la fermentación de varias cepas microbiológicas en un mismo espacio y tiempo, fomentando la expresión y síntesis de diferentes tipos de metabolitos secundarios bajo iguales condiciones nutricionales, de incubación y manejo (Genilloud 2011, Forner 2013).

Se seleccionaron 78 aislados de actinobacterias (Tabla 6. Cap 2) para comenzar los procesos de fermentación a microescala y posterior extracción de la fase orgánica mediante solvente. El total de aislados proviene del primer proceso de priorización establecido en el capítulo dos de esta investigación, siendo las cepas de actinobacterias con capacidad antimicrobiana frente al menos una bacteria y un hongo patógeno como: *Klebsiella pneumoniae* (ATCC® 700603™), *Staphylococcus aureus*-MRSA (ATCC® BAA-44™), *Enterococcus faecium*-VRE (ATCC® 700221™) y *Bacillus subtilis* (ATCC® 21556™), *Cladosporium cladosporioides* (aislado clínico) y *Epicoccum nigrum* (aislado clínico). Haciendo uso de esta estrategia, la investigación mantiene su enfoque a encontrar posibles nuevos compuestos con actividad biológica asociada a partir de actinobacterias del río Arauca.

Se siguió la metodología de fermentación a microescala descrita por Duncan y colaboradores (2014). En condiciones de esterilidad, los aislados de actinobacterias seleccionados fueron en cajas de Petri con agar-avena ISP3 (Atlas RM 2010), sin antibióticos y antifúngicos, y llevados a incubación a 30°C por 7 días. Luego del tiempo de incubación y posterior verificación de crecimiento microbiano, aproximadamente 1 cm² de micelio aéreo del cultivo de actinobacterias fue tomado para inocular 7 ml de caldo BSM (Bacterial Seed Medium) servido en tubo de borosilicato con 4-5 perlas de vidrio para agitación. Los tubos inoculados fueron llevados a incubación en un equipo Innova® 42 Incubator a 30°C, con agitación continua de 200 rpm por un

periodo de 72 h. Después de este tiempo, 1 ml de cultivo inoculado fue llevado a un nuevo tubo de borosilicato con 7 ml de caldo BSM fresco y perlas de agitación. Este nuevo inóculo se llevó a incubación bajo las mismas condiciones y por 24 horas adicionales. Posteriormente, 350 µl del nuevo cultivo fueron usados para inocular 7 ml de caldo ISP2 (Atlas RM 2010) servido en tubo de borosilicato con perlas de agitación y llevado a incubación por 7 días a 30°C y en agitación continua a 200 rpm. Procesos de verificación para descartar contaminación fueron realizados en cada etapa del proceso sobre agar ISP3. No se evidenció contaminación.

3.3.2. Extracción de fase orgánica sobre cultivos de actinobacterias a microescala

Para la extracción de la fase orgánica, fue utilizado como solvente Acetato de Etilo. Este solvente orgánico es comúnmente utilizado para la extracción de metabolitos secundarios provenientes de actinobacterias (Forner et al 2013, Gebreyohannes *et al* 2013; Chaudhary *et al* 2013; Janardhan *et al* 2014) debido a sus características biológicas y químicas como por ejemplo su baja toxicidad frente a cultivos biológicos y polaridad media, lo que permite extraer compuestos de mediana a baja polaridad. Adicionalmente se caracteriza por presentar alta volatilidad e insolubilidad en el agua, características que permiten una mayor facilidad de manejo al momento de realizar procesos de extracción a partir de cultivos líquidos de microorganismos.

Para el proceso de extracción con solvente se siguió el protocolo establecido por Duncan y colaboradores (2014). En este caso, 7 ml de acetato de etilo fueron adicionados a cada uno de los cultivos de actinobacterias luego del proceso de fermentación. Cada cultivo fue llevado a una placa de agitación a temperatura ambiente por 3 horas. Posteriormente, la fase orgánica fue extraída con ayuda de una pipeta de vidrio y servida en un recipiente de vidrio previamente pesado. La extracción con acetato de etilo fue repetida una segunda vez en iguales condiciones, para cada uno de los cultivos. Cada uno de los extractos fue secado usando un evaporador tipo Genevac EZ-2 (SP Scientific®).

3.3.3. Segunda dereplicación biológica utilizando priorización por embudo - Ensayos de citotoxicidad

La totalidad de los extractos crudos fueron enviados a ensayos de citotoxicidad frente a 5 líneas celulares, entre ellas 4 líneas tumorales (MDA, A549, SiHa, PC-3) y línea celular no tumoral Vero (Tabla 1).

Tabla 1. Líneas celulares de importancia clínica relevante utilizadas durante el ensayo de actividad citotóxica de las cepas de actinobacterias aisladas de sedimentos de las riberas del río Arauca. Se describen las características de cada línea según la *American Type Culture Collection – ATCC*, Piñeros *et al* 2010 y Pardo *et al* 2017.

Línea celular	código ATCC	Características
MDA-MB-231	HTB-26™	Línea celular extraída de un adenocarcinoma de glándula mamaria. En Colombia, el cáncer de mama ocupa el primer lugar en mortalidad en mujeres
A549	CCL-185™	Línea celular extraída de tejido pulmonar carcinomatoso. En Colombia, el cáncer de pulmón es la segunda causa de muerte por cáncer en la población general, tercera para hombres y cuarta para mujeres
SiHa	HTB-35™	Carcinoma cervical. En Colombia el cáncer de cuello uterino representa la segunda causa de mortalidad por cáncer en mujeres
PC-3	CRL-1435™	Línea celular extraída de adenocarcinoma prostático. En Colombia, el cáncer de próstata ocupa el segundo lugar en mortalidad por cáncer en hombres
Vero	CCL-81™	Línea celular epitelial de <i>Cercopithecus aethiops</i> , comúnmente utilizada como línea control en bioensayos

Para el mantenimiento de las líneas celulares se utilizó medio Eagle modificado de Dulbecco (DMEM) suplementado con suero fetal bovino SFB al 10%, penicilina (100 µU) y estreptomycin (0.1 mg mL⁻¹). Las células fueron incubadas en atmosfera húmeda manteniendo una temperatura de 37°C y 5% de CO₂. Al 80% de confluencia las células fueron lavadas con medio

nuevo sin antibióticos. Posteriormente 90 µL del cultivo fueron sembrados en placas de 96 pozos, a una concentración de 5×10^3 células/pozo y llevados a incubación por 72 horas adicionales. Luego, 10 µL de los extractos crudos de cada uno de los aislados de actinobacterias a analizar fueron añadidos a cada pozo en triplicado, a una concentración final de 62.5 µg/ml. Blancos control fueron realizados utilizando DMSO al 1% en medio de cultivo, doxorubicina como control positivo para las líneas tumorales y fenoxietanol para la línea no tumoral Vero. Las placas fueron llevadas a incubación por 72 horas. Se agregó reactivo alamarBlue® a cada pozo a una concentración de 10% (v/v) y se midió la fluorescencia del reactivo en cada pozo al inicio del ensayo (tiempo cero) y luego de cuatro horas de exposición. La medición de fluorescencia se realizó en un lector de placas Thermo Scientific Varioskan Flash a 590 nm de emisión. El cambio en las emisiones de fluorescencia se utilizó para calcular el porcentaje de viabilidad celular luego de cada tratamiento con los extractos. Se estableció como resultado positivo una citotoxicidad mayor al 50%. Extractos con respuesta citotóxica positiva frente a las líneas tumorales evaluadas y resultados negativos frente a la línea celular Vero, fueron seleccionados para posteriores análisis por dereplicación química.

3.3.4. Dereplicación química y acercamiento metabolómico mediante UPLC-HRMS, MzMine 2 y PCA

3.3.4.1. Cromatografía Líquida de Ultra Alto Rendimiento acoplada a Masas de Alta Resolución (UPLC-HRMS)

Los extractos crudos de actinobacterias que presentaron actividad citotóxica positiva frente al menos una línea celular tumoral y actividad negativa para la línea celular Vero, fueron diluidos en metanol a una concentración de 500 µg/ml con adición de Reserpina a una concentración de 1 µg/ml. Para el análisis de los extractos, 10 µl de la dilución fueron inyectados a una Cromatografía Líquida de Ultra Alto Rendimiento acoplada a Masas de Alta Resolución (UPLC-HRMS), usando un equipo UPLC Accela con Orbitrap Exactive (Thermo Fisher Scientific-Waltham, MA, USA) operado en modo positivo con una resolución de 30.000 y rango de detección de masas entre 190 a 2000

m/z. Como detectores se utilizaron Evaporative Light Scattering Detector (ELSD) y Detector de Fotodiodos (PDA) a un rango de detección entre 200–600 nm. La separación del extracto crudo se llevó a cabo utilizando una columna Kinetex C18 (2.1 × 50 mm, 1.7 μm) con un gradiente lineal de agua (H₂O), acetonitrilo (ACN) y ácido fórmico (FA) a una proporción de 95:5:0.1 respectivamente y por 5 minutos, seguido de un gradiente de ACN:FA (100:0.1) por 3 minutos para finalizar con gradiente inicial H₂O:ACN:FA (95:5:0.1) por 2 minutos.

3.3.4.2. *MzMine y Análisis de Componentes Principales (PCA) enfocados a la dereplicación sobre perfiles cromatográficos*

Los perfiles cromatográficos de PDA, ELSD y TIC de cada uno de los extractos crudos con actividad citotóxica positiva fueron visualizados usando el software XCalibur 2.2 SP1.48 (Thermo Scientific). Estos cromatogramas contienen información acerca del tiempo de retención y m/z de cada uno de los iones detectados dentro de un extracto. Para el manejo y procesamiento de estos datos es necesario el uso de un software adicional para detectar, filtrar y alinear señales dentro de diferentes muestras con el fin único de simplificar y facilitar el manejo de la información (Perez de Souza et al 2017). MzMine 2 (<http://mzmine.github.io>) es un software de libre acceso para el procesamiento de datos provenientes de cromatografía líquida acoplada a masas (Pluskal et al 2010) y desde su lanzamiento en 2006 ha sido utilizado con éxito para manejo de datos cromatográficos asociados al descubrimiento de productos naturales (Perez de Souza et al 2017; Forner 2013; Hou 2012). Al finalizar el procesamiento de datos a través de MZmine, se realizó el estudio de Componentes Principales, con el fin de facilitar un análisis exploratorio de las muestras, nombrando a los extractos crudos como muestras y teniendo como variables a los agrupamientos por tiempo de retención (rt) y relación masa/carga (m/z).

MzMine – Procesamiento de datos provenientes de UHPLC-HRMS: Para el uso de MzMine es necesario la conversión de los archivos de formato propio de XCalibur (.RAW), en archivos computables que permitan una visualización y manejo de datos en otros programas (.CDF). Este primer paso se realiza desde un módulo específico contenido en XCalibur. Se siguieron los siguientes pasos y se establecieron los siguientes parámetros de acuerdo a lo sugerido por el software, reportes previos y características de los datos obtenidos:

1. *Raw Data Import*: Se importaron los archivos provenientes de XCalibur a MzMine bajo el formato .cdf
2. *Peak Detection*: Es el primer paso para el análisis es la detección de las masas dentro de los cromatogramas. Antes de iniciar, se debe seleccionar el nivel de ruido dentro de las muestras, el cual se determina dependiendo de la intensidad de las señales del metanol (solvente utilizado para la dilución del extracto) y del medio de cultivo microbiológico utilizado para el crecimiento de las bacterias. Un nivel de ruido de 1×10^4 (1E4) fue establecido para la detección de masas a partir de extractos crudos de actinobacterias diluidos en metanol. Picos debajo de este nivel no fueron reconocidos en pasos posteriores dentro del software. Los iones candidatos son detectados.
3. *Chromatogram building*: Paso siguiente es la construcción de un nuevo cromatograma para cada uno de los iones que fueron detectados sucesivamente en diferentes escaneos. Para que un ion sea incluido dentro de este nuevo cromatograma, debe tener un espacio mínimo de aparición de 0.1 min entre escaneo y escaneo, al nivel de ruido elegido y tener como mínimo 0.005 unidades de m/z con respecto al ion principal. Datos menores a lo seleccionado no permiten la detección del ión dentro de este nuevo cromatograma.
4. *Peak deconvolution*: Ordena los iones seleccionados para el nuevo cromatograma de acuerdo a parámetros establecidos. En este paso es de clave observar el cromatograma y visualizar la estructura del pico. De tener una morfología clara, con una punta clara para evitar sospecha de tener picos de distintas características dentro del mismo cromatograma. Los parámetros en este caso establecidos fueron:
 - Límite cromatográfico: 85%
 - Rango mínimo de diferencia para tiempo de retención: 0.10 min
 - Altura de pico mínima relativa: 1.0%
 - Altura de pico mínima absoluta: 1×10^5
 - Radio mínimo del pico (punta-base): 1.3
5. *Isotopic Grouping*: Este paso elimina los isótopos dentro del cromatograma menos el más intenso, limpiando aún más los datos. Los parámetros de selección fueron los siguientes:
 - Tolerancia m/z: 0.005 m/z o 5.0 ppm

- Tolerancia para tiempo de retención: 0.5 min
 - Carga máxima: 1
 - Isótopo representativo: El más intenso
6. *Signal Intensity Normalization*: MzMine contiene una herramienta interna para normalizar los datos una vez filtrados por los pasos anteriores, utilizando como guía los datos provenientes del estándar interno que se halla colocado a la muestra antes de comenzar el análisis, en este caso la Reserpina. Los parámetros elegidos fueron:
- Tipo de normalización: Total raw signal
 - Tipo de medida del pico: Area de pico
7. *Alignment*: Los datos finales se alinean para visualizarlos de manera ordenada en una matriz. El software permite la observación de cuáles picos detectados están o no presentes en una de las muestras analizadas, a manera de señales verdes (presente) o rojas (ausente). Se logran visualizar los cromatogramas de cada pico. Los parámetros utilizados fueron:
- Tolerancia m/z: 0.005 m/z o 5.0 ppm
 - Peso por m/z: 20
 - Tolerancia en tiempo de retención: 0.5 min
 - Peso para tiempo de retención: 10
8. *Gap filling*: Esta herramienta permite incluir otros iones que fueron descartados durante los anteriores pasos pero que bajo un nivel de tolerancia establecido pueden agregar mayor información a la matriz de datos. Estos iones son visualizados en la matriz a manera de señales amarillas, según codificación del programa. Los parámetros establecidos para el gap filling fueron:
- Tolerancia en la intensidad de pico: 5.0%
 - Tolerancia en m/z: 0.005 o 5.0 ppm
 - Tolerancia en tiempo de retención: 0.05 min
9. Exportar datos: La matriz final generada por MZmine fue exportada como archivo de valores separados por comas (.CSV).

PCA – Análisis de Componentes Principales: El análisis estadístico por componentes principales fue realizado mediante el software *The Unscrambler*® X 10.5 (CAMO Software). Como primer paso, la matriz de datos en formato .CSV proveniente del procesamiento por MZmine, es incluida dentro del módulo de trabajo de PCA en *The Unscrambler*. Cada uno de los extractos fue tomado como muestra o sujeto de estudio, mientras que los valores de tiempo de retención y relación maza/carga fueron establecidos como variables. Aunque es el primer componente principal quien otorga la mayor varianza entre los datos, permitiendo la visualización de grupos diferentes, la varianza entre los extractos fue obtenida para un total de 10 componentes principales con el fin de detectar posibles diferencias entre los mismos y aumentar la posibilidad de encontrar datos no agrupados en un espacio ortogonal. Los “score plots” mostraron las varianzas entre extractos, mientras que los “loading plots” mostraron las varianzas entre los agrupamientos de tiempo de retención y relación maza/carga ($rt_{m/z}$) de los iones detectados en cada uno de los extractos. El análisis final se basó en la búsqueda de posibles “outliers” en los loading plots, los cuales son sugestivos de un ión o iones distintos dentro del total de iones provenientes de todos los extractos evaluados. Este ion o iones detectados como posibles “outliers” son buscados en la base de datos Antibase 2017, según su m/z . Posibles “outliers” sin asociaciones a compuestos conocidos en AntiBase fueron catalogados como posibles nuevos compuestos.

3.4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.4.1 Segunda dereplicación biológica utilizando priorización por embudo - Ensayos de citotoxicidad

Los extractos obtenidos luego del proceso de fermentación a microescala en medio ISP2 y posterior extracción de la fase orgánica con acetato de etilo, fueron secados y diluidos en DMSO a una concentración final de 1%, para evaluar su potencial citotóxico frente a las líneas tumorales MDA, A549, SiHa, PC-3 y línea celular no tumoral Vero. La priorización de los aislados en esta segunda etapa de dereplicación biológica se estableció de acuerdo con el porcentaje de citotoxicidad del extracto frente a las líneas tumorales y la línea Vero. Un porcentaje de citotoxicidad entre el 0 y 49% fue indicativo de baja citotoxicidad, mientras que porcentajes entre

50 – 79% y 80 – 100% fueron indicativos de mediana y alta citotoxicidad, respectivamente. Se priorizaron los extractos con porcentaje de citotoxicidad mayor al 50% frente al menos una línea tumoral y porcentaje de citotoxicidad menor al 50% frente a la línea no tumoral Vero. De los 78 extractos evaluados, 31 presentaron las anteriores características descritas (Tabla 2).

Tabla 2. Aislados con potencial citotóxico positivo frente al menos una línea tumoral analizada (MDA, A549, SiHa, PC-3) y citotoxicidad negativa frente a la línea no tumoral Vero. Rangos establecidos: 0-49% baja citotoxicidad, 50-79% citotoxicidad moderada, 80-100% citotoxicidad alta.

AISLADO	% CITOTOXICIDAD				
	MDA	A549	Siha	PC3	Vero
112		65			2
126	81			53	27
135		52	59		4
138	62	68			19
145	75		65	58	17
152	80				30
208	60				19
213	65				27
220	75				24
243		48	59		3
246		55	74	80	0
276	72		64	53	30
290	81				46
292	75		53	53	30
356	99				47
365	82				19
382	64				27
388	99				38
397	86	70	67	64	33
439	78	51			27
448	88				49
481	77				17
530	92				45
531	86	48			48
559			50		42
627	66				29
723	67				18
744	86				12
775	92	59	51		37
805	83	61	71		13
847	76				30

Los extractos seleccionados por medio de esta estrategia de priorización fueron llevados a análisis por UPLC-HRMS para obtención de los perfiles químicos y posterior acercamiento metabólico por PCA y bases de datos comerciales como estrategia de dereplicación química enfocada a la búsqueda de posibles nuevos compuestos bioactivos.

3.4.2 Dereplicación química y acercamiento metabólico por UPLC-HRMS, MzMine 2 y PCA

3.4.2.1 Código de barras (barcode) - Visualización de la diversidad química

Los perfiles cromatográficos de PDA, ELSD y TIC de cada uno de los extractos crudos con actividad citotóxica positiva fueron visualizados usando el software *XCalibur 2.2 SP1.48* (Thermo Scientific).

La información acerca del tiempo de retención y m/z de cada uno de los iones detectados dentro de un extracto fue analizada mediante el software MzMine 2 con el fin de facilitar el manejo de datos, generando agrupamientos por tiempo de retención (rt) y relación masa/carga (m/z), agrupamientos que se conocen como *buckets* (Forner et al 2013). Luego del procesamiento por MzMine 2, los datos fueron exportados a formato Microsoft Excel 2010, evidenciando un total de 478 agrupamientos rt_m/z (*buckets*), a un nivel de ruido de $1E4$, luego de la eliminación de picos pertenecientes al solvente de elución (metanol), el medio de crecimiento bacteriano (ISP2) y el estándar interno (Reserpina).

Haciendo uso de la función condicional IF ($=IF(celda>0;1;0)$), los *buckets* con una intensidad mayor a cero recibieron un valor de 1, mientras que intensidades iguales a cero permanecieron con valor cero. Mediante la función de formato condicional en la matriz, las celdas con valores de 1 fueron sombreadas en negro y aquellas con valor 0, en blanco. Esta metodología permite generar un código de barras (barcode) que facilita la visualización de la diversidad química dentro de la muestra analizada. Paralelo a este proceso, un análisis de cluster fue realizado utilizando el Método de Ward para lograr detectar agrupamientos según una mínima varianza entre las muestras. Estos dos procesos en conjunto, barcoding y cluster por Método Ward, permitieron construir lo siguiente (Figura 1):

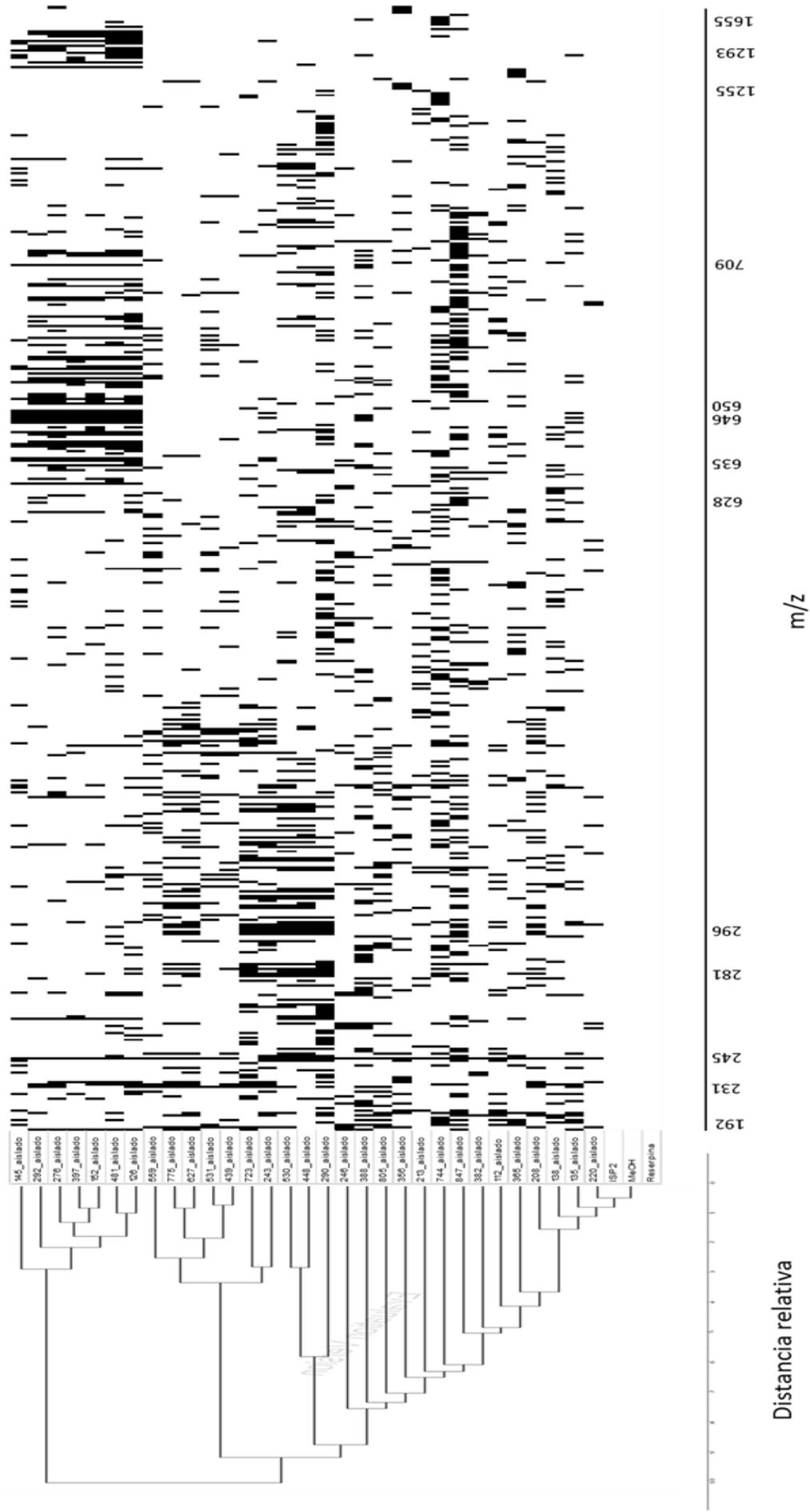


Fig. 91 **Figura 1.** Barcoding y análisis de cluster de 31 extractos con actividad antimicrobiana y citotóxica, provenientes de aislados de actinobacterias de sedimentos del río Arauca

Mediante barcode y análisis por cluster, se puede apreciar la diversidad química presente en los extractos seleccionados (Forner 2013). Se distinguen al menos 2 grupos: Un primer grupo o cluster relacionado con la producción de metabolitos de m/z entre 280-298 g/mol y un segundo cluster agrupando metabolitos con un m/z entre 628-650 g/mol y 1255-1293 g/mol. Estos dos clusters se contenían 12 aislados, 5 de ellos agrupados en el cluster 1 y los restantes 7 aislados en el cluster 2.

Los aislados 243, 290, 448, 530 y 723 conformaron el cluster 1. Los iones presentes en este cluster fueron identificados mediante análisis de HRMS y Antibase 2017 como aductos positivamente cargados de protón, sodio o amonio de una clase de metabolitos comúnmente extraídos de *Streptomyces*, conocidos como carbazomicina D, juglomycinina Z, deoxinibomicina y análogos de los mismos (Figura 2). Estos metabolitos se caracterizan por presentar actividad antimicrobiana moderada a alta frente a diferentes bacterias patógenas Gram positivas y Gram negativas, cepas de *Candida albicans* (Naganawa et al 1970, Naid et al 1987, Fielder et al 1994) y respuesta antitumoral frente a cáncer gástrico, caso particular observado durante pruebas antitumorales usando deoxinibomicina (Egawa et al 2000).

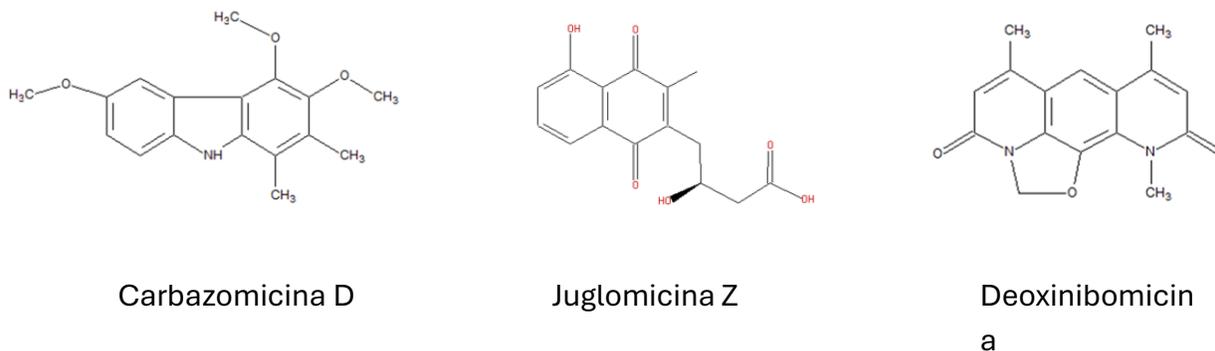
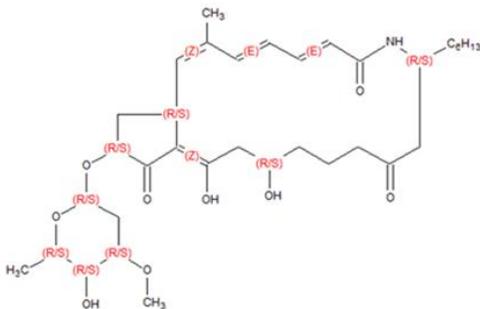
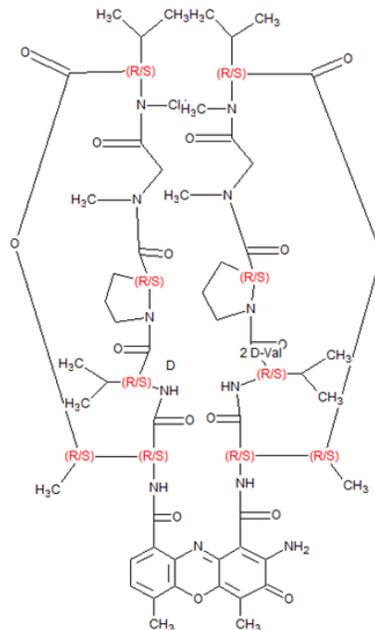


Figura 2. Metabolitos asociados a cluster 1. Rango de m/z entre 280-298 g/mol.

Por otro lado, los aislados 126, 145, 152, 276, 292, 397 y 481 conformaron el cluster 2, caracterizado por presentar dos patrones de agrupamiento según m/z: 628-650 g/mol y 1255-1293 g/mol. El primer patrón es característico de aductos positivamente cargados de protón, sodio o amonio de metabolitos producidos por *Streptomyces* como: cremimicina (Figura 3), UK-80695 y UK-78621, según datos de HRMS y Antibase 2017. Estos metabolitos son caracterizados como antibióticos macrocíclicos y su actividad como inhibidor del crecimiento bacteriano ha sido reportada frente a cepas de patógenas multirresistentes como la MRSA (Igarashi 1997; Buckingham 1994). El segundo patrón, es característico de aductos positivamente cargados de protón, sodio o amonio de actinomicinas (Figura 3), metabolitos que se encuentran comúnmente en extractos de *Streptomyces*. Las actinomicinas pertenecen a la familia de los cromopéptidos y son producidos por varias especies de *Streptomyces*. Existen hasta la fecha al menos 25 actinomicinas reportadas (Cai 2016), todas compuestas por un cromóforo de fenoxano y diferenciadas por los péptidos que acompañan a ese cromóforo, los cuales forman dos estructuras en forma de anillo llamadas ciclos de pentapeptidolactona (Bitzer 2009). Son nombradas como actinomicina A, B, C, D, I, V, X, Y y Z dependiendo de su ciclo peptídico (Zhang 2016, Bitzer 2009, Lackner 2000), con pesos moleculares que varían entre los 1250-1300 g/mol. En los microorganismos productores de estos metabolitos es común encontrar más de un tipo de actinomicina, por lo que pueden detectarse cuatro o más pesos moleculares de análogos (Bitzer 2009). La actinomicina D es la más conocida y estudiada de esta familia y es actualmente utilizada como agente antibacterial y antitumoral, en particular para el tratamiento de tumores de riñón en menores (Wei Z et al 2017, Bitzer 2009). En el caso de estudio, pesos moleculares de 1255, 1269 fueron detectados en la mayoría de las cepas del grupo 2 y se relacionan con la presencia de actinomicina D y análogos de la misma.



Cremimicina



Actinomicina

Figura 3. Metabolitos asociados a cluster 2. Rango de m/z con dos patrones de agrupamiento según m/z: 628-650 g/mol (ej. Cremimicina) y 1255-1293 g/mol (ej. Actinomicina).

3.4.2.2 Análisis de Componentes Principales - PCA

La matriz de datos fue finalmente analizada a través de un Análisis de Componentes Principales (PCA) incluido en el software The Unscrambler X, generando una visión exploratoria de las muestras, teniendo a los extractos crudos como muestras y como variables agrupamientos por tiempo de retención (rt) y relación masa/carga (m/z). Este análisis exploratorio permite obtener una visualización gráfica de los iones presentes dentro de los extractos analizados, generando grupos de iones similares que facilitan la observación de iones diferentes generalmente asociados a metabolitos potencialmente nuevos.

Se obtuvieron 10 PCA y sus combinaciones fueron visualizadas por medio de un “Score plot” y un “Loading plot”. De acuerdo a los *eigen-values* o valores propios de cada componente principal

que generan información acerca de la varianza en cada componente, se encontró un porcentaje mayor en los componentes PC1, PC2, PC3, PC4 y PC5 con valores del 71, 64, 60, 52 y 45% respectivamente. Los análisis PC1vsPC2, PC2vsPC3, PC3vsPC4 y PC4vsPC5 en conjunto explican el 94% de la varianza encontrada en los datos analizados, por lo que se decidió continuar el análisis de PCA tomando como base los resultados del score y loading plots de estas combinaciones. Los score y loading plots de estos componentes principales se muestran en la Figura 4 (A, B, C y D):

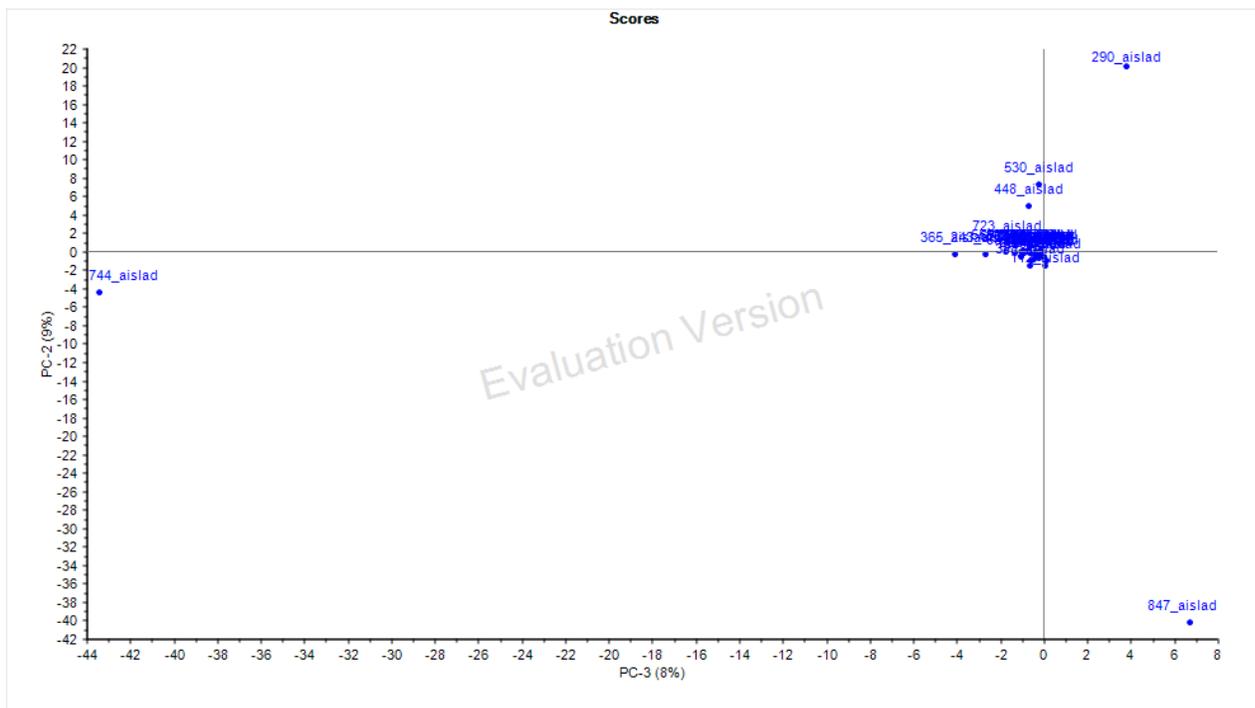
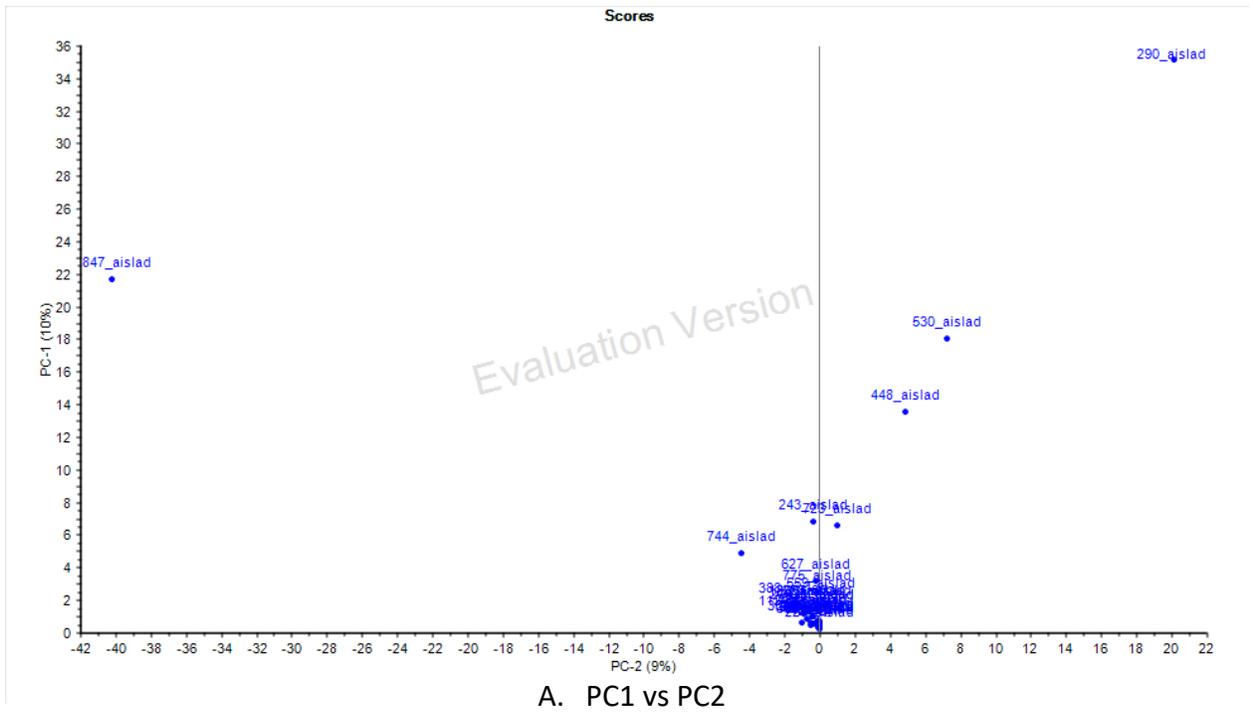


Figura 4. Score Plot y Loading Plot de los componentes principales PC1 vs PC2 hasta PC4vsPC5 (A, B).

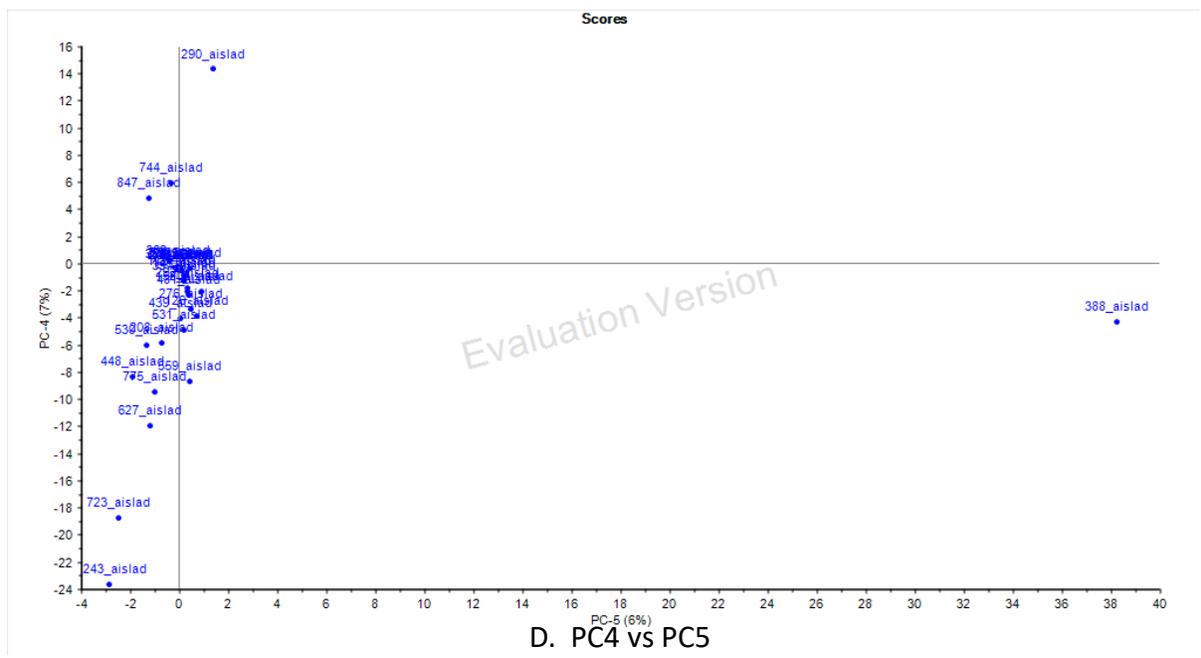
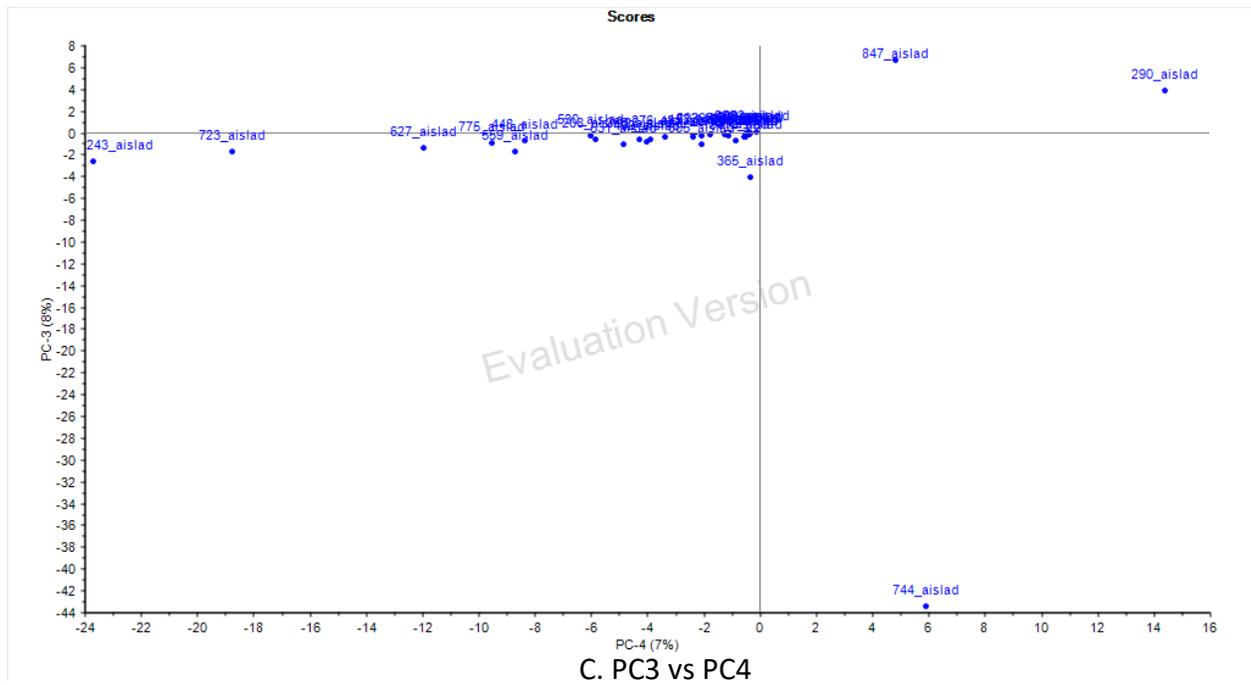


Figura 4 - continuación. Score Plot y Loading Plot de los componentes principales PC1 vs PC2 hasta PC4vsPC5 (C, D).

Tres extractos fueron siempre detectados en los score plot seleccionados, permaneciendo alejados del agrupamiento principal, sugiriendo la presencia de características de masa y tiempo de retención distintas a la mayoría de las muestras. Estos extractos pertenecían a los aislados 290, 744 y 847.

A nivel de bioactividad, los extractos 290, 744 y 847 se caracterizan por presentar citotoxicidad frente a la línea tumoral de cáncer de seno MDA con valores del 81, 86 y 76% respectivamente, aunque no se detectó citotoxicidad frente a otras líneas tumorales analizadas. El conjunto de resultados del screening biológico realizado en la primera fase de priorización (potencial antimicrobiano) y los obtenidos en esta segunda fase (potencial citotóxico) de los aislados detectados mediante análisis de componentes principales es el siguiente:

Tabla 3. Resultados de screening biológico por actividad antimicrobiana y citotóxica de los aislados 290, 744 y 847 de actinobacterias del río Arauca detectados por PCA y sugeridos como potenciales cepas con características químicas diferentes a las demás muestras analizadas.

	ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA							CITOTOXICIDAD	
	MRSA <i>Staphylococcus aureus</i>	VRE <i>Enterococcus faecium</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Cladosporium cladosporioides</i> C1	<i>Cladosporium cladosporioides</i> C2	<i>Epicoccum nigrum</i> C3	MDA-MB-231	VERO
290	++	++	-	+	++	++	+++	81%	46%
744	++	-	-	++	++	++	++	86%	12%
847	-	-	-	+	++	++	+++	76%	30%

De acuerdo a los loading plots de estos tres aislados, se observaron 5 iones no agrupados los cuales fueron identificados mediante análisis de HRMS y Antibase 2017 como aductos positivamente cargados de protón, sodio o amonio de una clase de metabolitos comúnmente extraídos de *Streptomyces*, conocidos como endofenazina E, cadeguomicina, derivados del ácido tetrónico, alchivemicina A y análogos de los mismos. Estos metabolitos se caracterizan por presentar respuestas antimicrobianas, antiparasíticas, antimalaria y antitumorales (Saleh 2012, Wu 1981, Igarashi 2010). Sin embargo, de estos 5 iones no agrupados, un ión no logró ser identificado en AntiBase, sugiriendo un potencial nuevo compuesto no conocido hasta el momento. Este ión se encontró en el aislados de actinobacteria RKCA-744, presentando un m/z

de 1330 g/ml t rt de 3.3 min. Posteriores metodologías para la obtención de este potencial nuevo compuesto a través de cultivos a gran escala, fermentación, extracción, fraccionamiento, elucidación estructural y potencial bioactivo son descritas en el capítulo siguiente.

3.5 CONCLUSIONES

La priorización de muestras a partir de grandes colecciones biológicas es una estrategia fundamental dentro de un estudio bioprospectivo a partir de microorganismos. El objetivo final es establecer cuáles son las cepas productoras de compuestos de interés en función de una bioactividad específica y utilizando metodologías que permitan un análisis robusto de datos. El screening biológico y el análisis de perfiles químicos son dos metodologías incluidas dentro de estrategias de dereplicación, que en conjunto tienen como fin detectar y priorizar ejemplares microbiológicos potencialmente activos. Para lograr la consecución de esta estrategia, procesos de fermentación a escala pequeña han sido catalogados como una metodología rápida y robusta para la producción y obtención de metabolitos secundarios a partir de microorganismos, minimizando tiempos de cultivo y optimizando la obtención de perfiles químicos asociados a extractos crudos potencialmente bioactivos. Adicionalmente, el uso de estrategias gráficas y estadísticas que permitan el manejo y visualización de los datos es un complemento de importancia para la correcta priorización de las muestras que se desean analizar. Un código de barras (barcoding) a partir de los perfiles químicos de los extractos, permite visualizar y comprender la naturaleza química de los extractos que son evaluados y hacer un acercamiento sobre los metabolitos más representativos dentro de la muestra y la diversidad de la misma. Sin embargo, el barcoding debe complementarse con otras metodologías estadísticas que permitan priorizar extractos potencialmente de interés. El análisis de componentes principales (PCA) es el complemento a seguir en estas investigaciones.

En el caso acá descrito, 78 aislados de actinobacterias priorizados según actividad antimicrobiana, a partir de una colección biológica de 790 ejemplares, fueron llevados a una segunda dereplicación biológica por actividad citotóxica y posterior dereplicación química utilizando

protocolos de fermentación a pequeña escala y manejo de técnicas hífenadas como LC-HRMS. A partir de un análisis de cluster aplicado a un barcoding de los datos obtenidos por HRMS, se lograron detectar 2 agrupamientos compuestos por 5 a 7 aislados de actinobacterias que se caracterizaban en ser productores de metabolitos relacionados a compuestos como la carbazomicina y deoxinibomicina por un lado y por otro a compuestos asociados a la familia de las cremimicinas y actinomicinas. Estos agentes han sido ampliamente estudiados dentro del género *Streptomyces* debido a su actividad antimicrobiana y antitumoral y era esperado detectarlos en este tipo de análisis. Sin embargo, llama la atención que la mayoría de los aislados incluidos en el análisis no hacían parte de alguno de estos dos cluster. Esta observación es relevante ya que es indicativa del grado de diversidad química presente dentro de los extractos evaluados, hecho que permite dejar entrever una creciente posibilidad en encontrar metabolitos potencialmente nuevos o no descritos y con bioactividad asociada. El análisis de PCA permitió enfocar estos resultados, evidenciando tres aislados con la mayor diversidad química dentro del total analizado: 290, 744 y 847, los tres con bioactividad citotóxica positiva contra cáncer de seno HTB26 y actividad antibacteriana positiva contra MRSA. Entre ellos, los iones no agrupados fueron dereplicados como compuestos relacionados a derivados de las fenazinas, cadeguomicinas y alchivemicinas. Sin embargo, uno de los iones mayoritarios presentes en el aislado 744 no logró ser identificado, generando expectativas acerca de la posibilidad de que el mismo pudiese tratarse de un potencial nuevo compuesto con actividad biológica relevante. Este potencial nuevo metabolito correspondía a un ión con m/z de 1330 g/ml y rt de 3.3 min, encontrado en el extracto crudo del aislado 744, por lo que el aislado en cuestión se candidatizó como aislado para procesos de fermentación a gran escala y fraccionamiento para la búsqueda y elucidación estructural de un potencial nuevo producto natural bioactivo.

La metodología expuesta en este capítulo confirma que los protocolos de dereplicación biológica y dereplicación química deben ser trabajados en conjunto con el objetivo de mantener el enfoque dentro de la búsqueda de cepas con diversidad química asociada a la producción de potenciales nuevos compuestos bioactivos.

3.6. BIBLIOGRAFIA

1. Atlas RM. 2010. Handbook of Microbiological Media. Fourth Edition. ASM Press. Washington D.C.
2. Awad H, Khamis MM and El-Aneed A. 2015. Mass Spectrometry, Review of the Basics: Ionization. Applied Spectroscopy Reviews, 50:158–175
3. Barnes JH. 2005. MS detectors. Anal. Chem., 77 (21), pp 418 A–427 A
4. Bérdy, J. Bioactive microbial metabolites. J Antibiot 58, 1–26 (2005). 15. Demain, A. L. Importance of microbial natural products and the need to revitalize their discovery. J Ind Microbiol Biotechnol 41, 185–201 (2014)
5. Blunt J., Munro M., Upjohn M. (2012) The Role of Databases in Marine Natural Products Research. In: Fattorusso E., Gerwick W., Tagliatalata-Scafati O. (eds) Handbook of Marine Natural Products. Springer, Dordrecht
6. Buckingham J. 1994. Dictionary of Natural Products. Vol 1. Ed. Chapman & Hall. London
7. Cai W, Wang X, Elshahawi SI, Ponomareva LV, Liu X, McErlean MR, Cui Z, Arlinghaus AL, Thorson JS, Van Lanen S. 2016. Antibacterial and Cytotoxic Actinomycins Y6–Y9 and Zp from *Streptomyces* sp. Strain Gö-GS12. Journal of Natural Products: 79 (10), 2731–2739
8. Chaudhary HS, Yadav J, Shrivastava AR, Singh S, Singh AK, Gopalan N. 2013. Antibacterial activity of actinomycetes isolated from different soil samples of Sheopur (A city of central India). J. Adv. Pharm. Tech. Res. Vol 4(2).
9. Cheng CH. 2016. Metabolomics and dereplication-based isolation of novel bioactive natural products from marine sponge-associated actinomycetes. Doctoral Thesis Dissertation. Julius-Maximilians-Universität Würzburg.
10. Cielecka-Piontek J, Zalewski P, Jelinska A, Garbacki P. 2013. UHPLC: The Greening Face of Liquid Chromatography. Chromatographia. 76:1429–1437
11. Demain, A. L. & Sanchez, S. Microbial drug discovery: 80 years of progress. J Antibiot 62, 5–16 (2009)
12. Demartini DR. 2013. A Short Overview of the Components in Mass Spectrometry Instrumentation for Proteomics Analyses. In: Tandem Mass Spectrometry: Molecular Characterization. Ed. Ana Varela Coelho and Catalina F Franco. IntechOpen. Chapter 2.
13. Duncan KR, Haltli B, Gill KA, Correa H, Berrué F, Kerr RG. 2014. Exploring the diversity and metabolic potential of actinomycetes from temperate marine sediments from Newfoundland, Canada. J Ind Microbiol Biotechnol.
14. Egawa K, Yamori T, Nosaka C, Kunimoto S, Takeuchi T, Nos K. 2000. Deoxynybomycin is a selective anti-tumor agent inducing apoptosis and inhibiting topoisomerase I. Biol Pharm Bull. 23(9):1036-40.
15. Fiedler HP, Kulik A, Schüz TC, Volkmann C, Zeeck A. 1994. Biosynthetic capacities of actinomycetes. 2# Juglomycin Z, a new naphthoquinone antibiotic from *Streptomyces tendae*. The Journal of Antibiotics. Vol 47. No. 10
16. Forner D.; Berrué F.; Correa H.; Duncan K.; Kerr R.G. Analytica Chimica Acta. 2013. 805 pag 70–79
17. Gaudencio, S.P and Pereira, F. 2015. Dereplication: racing to speed up the natural products discovery process. Nat Prod Rep. 32(6):779-810

18. Gebreyohannes G, Moges F, Sahile S, Raja N. 2013. Isolation and characterization of potential antibiotic producing actinomycetes from water and sediments of Lake Tana, Ethiopia. *Asian Pac J Trop Biomed*; 3(6): 426-435
19. Genilloud O, González I, Salazar O, Martín J, Tormo JR, Vicente F. 2011. Current approaches to exploit actinomycetes as a source of novel natural products. *J Ind Microbiol Biotechnol*. 38:375–389
20. Hou Y, Braun D, Michel CR, Klassen JL, Adnani N, Wyche TP y Bugni TS. 2012. Microbial Strain Prioritization Using Metabolomics Tools for the Discovery of Natural Products. *Anal. Chem*. 84, 4277–4283
21. Igarashi M, Tsuchida T, Kinoshita N, Kamijima M, Sawa R, Sawa T, Naganawa H, Hamada M, Takeuchi T, Wamazaki K, Ishizuka M. 1997. Cremimycin, a Novel 19-Membered Macrocyclic Lactam Antibiotic, from *Streptomyces* sp. *J. Antibiotics* 51,2: 123-129
22. Igarashi Y, Kim Y, In Y, Ishida T, Kan Y, Fujita T, Iwashita T, Tabata H, Onaka H, Furumai T. 2010. Alchivemycin A, a Bioactive Polycyclic Polyketide with an Unprecedented Skeleton from *Streptomyces* sp. *Org. Lett.*, Vol. 12, No. 15.
23. Ito, T and Masubuchi, M. 2014. Dereplication of microbial extracts and related analytical technologies. *The Journal of Antibiotics*. 67.; 353–360
24. Janardhan A, Kumar AP, Viswanath B, Saigopal DVR, Narasimha G. 2014. Production of Bioactive Compounds by Actinomycetes and Their Antioxidant Properties. *Biotech Res International Vol 2014*
25. Koppenaar DW, Barinaga CJ, Denton B, Sperline RP, Hieftje GM, Schilling GD, Andrade FJ,
26. Lackner H, Bahner I, Shigematsu N, Pannell LK and Mauger AB. 2000. Structures of Five Components of the Actinomycin Z Complex from *Streptomyces fradiae*, Two of Which Contain 4-Chlorothreonine. *J. Nat. Prod*, 63, 352-356
27. Naganawa H, Wakashiro T, Yagi A, Kondo S, Takita T, Hamada M, Maeda K, Umezawa H. 1970. Deoxybomycin from a *Streptomyces*. *The Journal of Antibiotics*. Vol 23, No 7.
28. Naid T, Kitahara T, Kaneda M, Nakamura S. 1987. Carbazomycins C, D, E and F, minor components of the carbazomycin complex. *The Journal of Antibiotics*. Vo 40. No.2
29. Pardo C, de Vries E, Buitrago L, Gamboa O. Atlas de mortalidad por cáncer en Colombia. Cuarta edición. Bogotá D. C. Instituto Nacional de Cancerología, 2017, v.1. p. 124.
30. Patel KN, Patel JK, Patel MP, Rajput GC, Patel HA. 2010. Introduction to hyphenated techniques and their applications in pharmacy. *Pharmaceutical Methods*. Volume 1, Issue 1, Pages 2-13.
31. Perez de Souza L, Naake T, Tohge T, Fernie AR. 2017. From chromatogram to analyte to metabolite. How to pick horses for courses from the massive web resources for mass spectral plant metabolomics. *Giga Science*, 6, 1–20
32. Piñeros M, Pardo C, Gamboa O, Hernández G. 2010. Atlas de mortalidad por cáncer en Colombia. Instituto Nacional de Cancerología E.S.E. Ministerio de la Protección Social. República de Colombia.
33. Pluskal T, Castillo S, Villar-Briones A, Orešič M. 2010. MZmine 2: Modular framework for processing, visualizing, and analyzing mass spectrometry-based molecular profile data, *BMC Bioinformatics* 11:395
34. Rajalahti, T. and Kvalheim, OM. 2011. Multivariate data analysis in pharmaceuticals: a tutorial review. *Int J Pharma* 417, 280–290

35. Saleh O, Flinspach K, Westrich L, Kulik A, Gust B, Fiedler HP, Heide L. 2012. Mutational analysis of a phenazine biosynthetic gene cluster in *Streptomyces anulatus* 9663. *Beilstein J Org Chem.* 8, 501-513
36. Sheliya KG and Shah KV. 2013. Ultra Performance Liquid Chromatography (UPLC): A Modern Chromatography Technique. *Pharma Science Monitor.* Vol - 4, Issue – 3
37. Swartz M. 2010. HPLC detectors: A Brief Review. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, 33:1130–1150
38. Thammana M. 2016. A Review on High Performance Liquid Chromatography (HPLC). *Research & Reviews: Journal of Pharmaceutical Analysis.* Volume 5. Issue 2
39. Wei Z, Xu C, Wang J, Lu F, Bie X and Lu Z. 2017. Identification and characterization of *Streptomyces flavogriseus* NJ-4 as a novel producer of actinomycin D and holomycin. *PeerJ* 5:e3601; DOI 10.7717/peerj.3601
40. Wu RT, Okabe T, Namikoshi M, Okuda S, Nishimura, Tanaka N. 1981. Cadeguomycin, a novel nucleoside analog antibiotic. *The Journal of Antibiotics.* Vol 35. No 3.
41. Yang, J.Y.; Sanchez, L.M.; Rath, C.M.; Liu, X.T.; Boudreau, P.D.; Bruns, N.; Glukhov, E.; Wodtke, A.; de Felicio, R.; Fenner, A.; et al. *J. Nat. Prod.* 2013, 76, 1686–1699.
42. Yuliana N, Khatib A, Choi Y and Verpoorte R. 2011. Metabolomics for Bioactivity Assessment of Natural Products. *Phytother. Res.* 25: 157–169 (2011)
43. Zhang X, Ye X, Chai W, Lian XY and Zhang Z. 2016. New Metabolites and Bioactive Actinomycins from Marine-Derived *Streptomyces* sp. ZZ338. *Mar. Drugs* 2016, 14, 181; doi:10.3390/md14100181

CAPITULO 4

Aislamiento y caracterización de compuestos mayoritarios presentes en el aislado *Streptomyces* RKCA-744.

Extracción y elucidación química de un péptido no ribosomal potencialmente nuevo

4.1. INTRODUCCIÓN

Las actinobacterias son uno de los grupos de microorganismos cultivables con mayor capacidad de producción de productos naturales bioactivos ampliamente utilizados en la industria farmacéutica y agroindustrial (Berdy 2005). Las características químicas de los compuestos producidos a través de diferentes rutas biosintéticas presentes los genomas bacterianos permiten definirlos como metabolitos tipo policétidos, carbapenemos, aminoglicósidos y péptidos no ribosomales (Dewick 2009). Entre ellos, los policétidos y los péptidos no ribosomales presentan las estructuras químicas más complejas y son generalmente asociados a bioactividades antimicrobianas y citotóxicas (Igarashi 2010).

4.1.1. Policétidos

Estos productos naturales se caracterizan por poseer una gran diversidad química que puede ser explicada por la presencia de múltiples rutas biosintéticas. Los policétidos son conformados por cadenas de poli-beta-cetona, las cuales son establecidas por acoplamientos de unidades de ácido acético por reacciones de condensación (Dewick 2009). La formación de la cadena de poli-beta-cetona se obtiene a partir de una serie de reacciones de Claisen. En este caso, dos moléculas de acetyl-CoA generan una molécula de acetoacetyl-CoA por una condensación de Claisen y esta reacción se repite hasta lograr la formación de una cadena poli-beta-ceto ester (Figura 1).

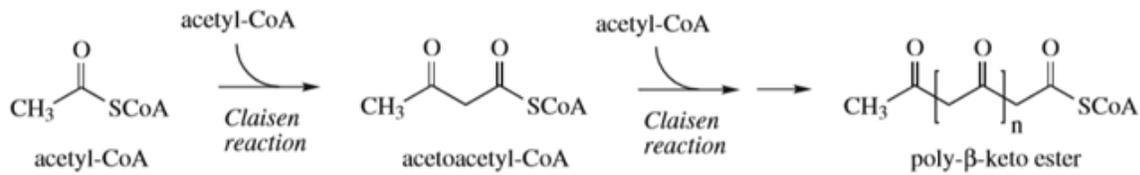


Figura 1. Reacción de Claisen para formación de cadena base de poli-beta-ceto ester, en biosíntesis de policétidos (Tomado de Dewick 2009).

Diferentes enzimas intervienen en la modificación postraducciona de esta cadena para generar distintos tipos de policétidos. Estos complejos enzimáticos reciben el nombre de policétido sintasas (PKSs) y hasta el momento se han descrito tres clases: Tipo I, Tipo II y Tipo III. El complejo enzimático PKS tipo I se relaciona con la producción de compuestos antibacteriales y antifúngicos como la eritromicina y nistatina, mientras que los complejos enzimáticos PKSs tipo II y tipo III se encuentran asociados con la producción de productos naturales aromáticos y compuestos fenólicos, respectivamente (Gomes 2013).

Los complejos enzimáticos se conforman por moléculas tipo aciltransferasas (AT), Proteínas transportadoras de grupos acilos (ACP), Cetosintasas (KS), Cetoreductasas (KR), dehidratasas (DH), tioesterasas (TE), entre otras enzimas y su disposición y actividad es la base para la generación de los distintos módulos que caracterizan a un determinado policétido. El módulo inicial también conocido como módulo de carga, se compone de moléculas de acetil CoA seleccionadas y transferidas a la cadena base de poli-beta-ceto ester, por medio de una aciltransferasa (AT). Paso siguiente, la proteína transportadora de acilos (ACP) se encarga de unir este módulo inicial al siguiente módulo enzimático que va a componer la cadena creciente del nuevo policétido. Dependiendo de la estructura del policétido, diferentes módulos pueden generarse y ser conformados mediante la adición de nuevos monómeros a la cadena cetona utilizando reacciones de oxidación, reducción y transferencia, que son auxiliadas por las cetosintasas (KS), cetoreductasas (KR) y aciltransferasas (AT). Cada módulo es unido a la cadena mediante una proteína transportadora de acilos (ACP) hasta el final del complejo, el cual es

determinado por la presencia de una tioesterasa (TE) que se encarga de liberar al ACP (Gomes 2013, Weissman 2009) (Figura 2).

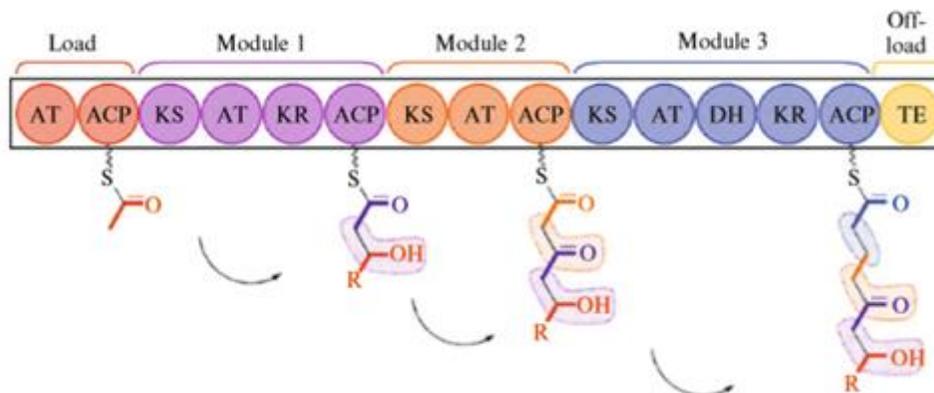


Figura 2. Esquemmatización del complejo modular presente en PKS tipo I. Tomado de Weissman 2009.

Las diferencias entre los tipos de PKS se basan de acuerdo a los módulos enzimáticos presentes en ellas. A diferencia de los módulos presentes en PKS tipo I, las tipo II presentan solo dos módulos enzimáticos basados en dos clases de cetosintasas: $KS\alpha$ y $KS\beta$. Estos dos módulos se repiten y son unidos mediante un ACP dentro de la cadena creciente hasta la posición de la tioesterasa (TE) o terminación de la cadena. Por último, las PKS tipo III se componen de un único dominio cetosintasa KS el cual se une a una molécula de acetil CoA para generar la reacción de Claisen sin otras enzimas auxiliares (Gomes 2013, Weissman 2009)

4.1.2. Péptidos No Ribosomales

Los péptidos no ribosomales son conocidos por tener una ruta biosintética independiente de la maquinaria ribosomal (Roy 2017), conllevando a la producción de diversos compuestos bioactivos. La estructura química de estos compuestos es generalmente macrocíclica o macrocíclica con ramificaciones y se caracteriza por tener aminoácidos no comunes como por ejemplo aminoácidos tipo D o aminoácidos con modificaciones tipo glicosilaciones, acilaciones o presencia de grupos N-metilo o N-formilo (Martinez 2016).

Estos péptidos son sintetizados por complejos enzimáticos de sintasas no ribosomales conocidas como NRPS (non ribosomal peptide synthases), las cuales se organizan en módulos que son los encargados de incorporar aminoácidos dentro del péptido en formación. Cada módulo consiste en tres dominios: dominio de adenilación (A), dominio de tiolación (T también conocido como PCP) y un dominio de condensación (C), los cuales generan péptidos lineares, cíclicos o ramificados con 3 a 15 aminoácidos (Martinez 2016) (Figura 3).

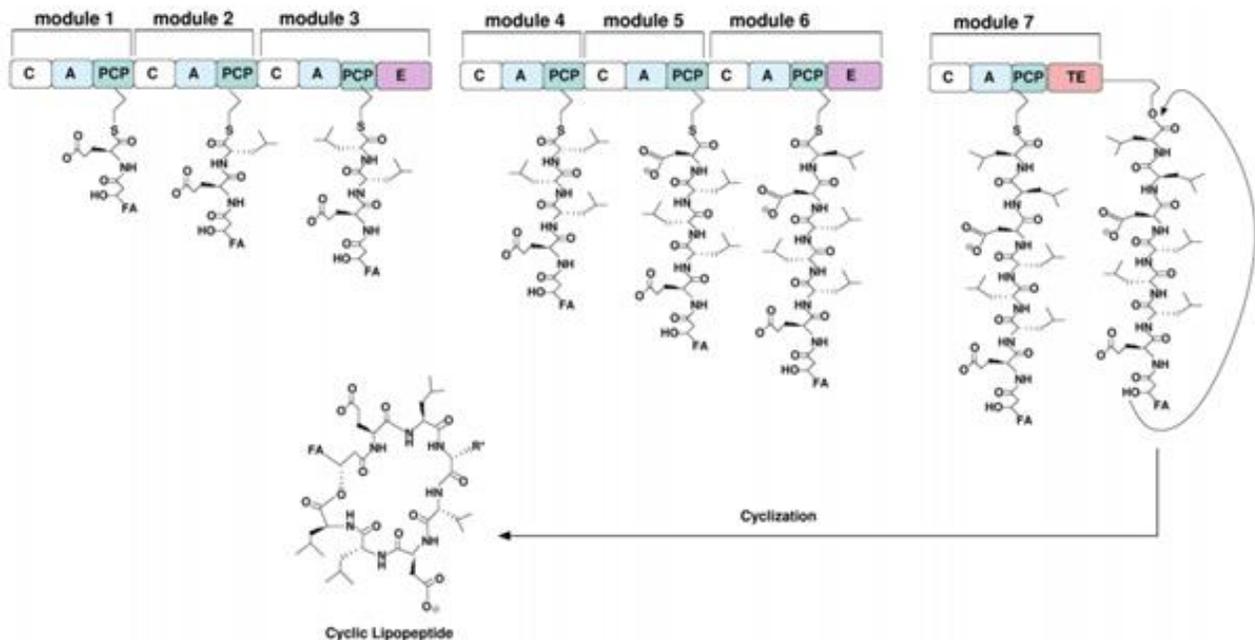


Figura 3. Esquemización de un péptido no ribosomal. Tomado de Martinez 2016

Aunque es común encontrar varios módulos en complejos enzimáticos NRPS, en sistemas bacterianos pueden generarse complejos NRPS con uno o dos módulos, conocidos también como NRPS no modulares y que tienen como característica interactuar con otras proteínas NRPS para generar una biosíntesis no lineal. Adicionalmente, los NRPS también pueden conformar una tercera estructura al fusionarse con una unidad policétido sintasa (PKS), generando un polipéptido híbrido entre los dos complejos enzimáticos (Martinez 2016).

4.2 OBJETIVO PROPUESTO

Tomando como base los resultados obtenidos a partir de la estrategia de selección de aislados bioactivos de actinobacterias del río Arauca, mediante metodologías combinadas de dereplicación biológica, química y análisis metabolómico, el presente capítulo expone el aislamiento y caracterización de péptido no ribosomal (NRPS) potencialmente nuevo y un híbrido NRPS-PKS conocido como Alchivemicina A, detectados como compuestos mayoritarios en el aislado de actinobacteria RKCA-744, mediante estrategias de fraccionamiento de extracto crudo por Combiflash y elucidación estructural por medio de análisis de Resonancia Magnética Nuclear mono y bidimensional.

4.3 MATERIALES Y MÉTODOS

4.3.1. Fermentación a gran escala del aislado RKCA-744 y obtención de extracto crudo

Se siguió la metodología de fermentación descrita por Duncan y colaboradores (2014). En condiciones de esterilidad, el aislado RKCA- 744 fue sembrado en medio solido ISP3 (Atlas RM 2010), sin antibióticos y antifúngicos, e incubado a 30°C por 7 días. Finalizado el tiempo de incubación y posterior verificación de crecimiento microbiano, aproximadamente 1 cm² de micelio aéreo del cultivo de actinobacteria fue tomado para inocular 7 ml de caldo BSM (Bacterial Seed Medium) servido en tubo de borosilicato con 4-5 perlas de vidrio para agitación. El tubo inoculado fue llevado a incubación en un equipo Innova[®] 42 Incubator a 30°C, con agitación continua de 200 rpm por un periodo de 72 h. Después de este tiempo, 1 ml de cultivo inoculado fue llevado a un nuevo tubo de borosilicato con 7 ml de caldo BSM fresco y perlas de agitación. Este nuevo inóculo se llevó a incubación bajo las mismas condiciones y por 24 horas adicionales. El cultivo bacteriano obtenido fue usado para la inoculación de tres erlenmyer con 1 litro de caldo ISP2 cada uno, a una concentración del 3% v/v. Este montaje fue llevado a incubación por 7 días a 30°C y en agitación continua a 200 rpm. Procesos de verificación para descartar contaminación fueron realizados en cada etapa del proceso sobre agar ISP3. No se evidenció contaminación.

Luego del periodo de incubación, 1 litro de acetato de etilo fue agregado a cada Erlenmeyer. Cada recipiente fue colocado en agitación continua a 150 rpm por 3 horas consecutivas. Posteriormente y utilizando un embudo de decantación, la fase orgánica de cada cultivo bacteriano fue separada del medio y llevada a un balón de rotaevaporación. Este procedimiento se repitió una segunda vez. Los extractos obtenidos fueron secados utilizando un rotaevaporador convencional (Heidolph® Laboreta 4003). Cada extracto crudo fue analizado por UPLC-HRMS a una concentración de 500 µg/mL, con el fin de corroborar el mantenimiento del perfil químico en la muestra.

4.3.2. Fraccionamiento del extracto crudo del aislado RKCA-744

Un sistema automático de cromatografía flash (CombiFlash® Rf (Teledyne Isco®)) fue utilizado para el fraccionamiento del extracto crudo proveniente del aislado RKCA-744. La técnica utilizada dentro de este sistema se basa en la medición de la absorbancia generada por un detector de UV (PDA – cap 3, 3.1.2) y que es encontrada en determinados picos dentro de un extracto crudo. De esta manera, el fraccionamiento de un extracto crudo por Combiflash depende de los picos de absorbancia detectados en la muestra, facilitando la automatización del sistema una vez los parámetros de absorbancia son preestablecidos en el sistema. Esta característica hace posible la separación de compuestos de acuerdo a sus longitudes de onda detectadas por PDA previos, enfocando el proceso de fraccionamiento a compuestos de interés (Teledyne ISCO 2012).

El extracto crudo seco fue llevado a una columna C18 de alta eficiencia (15.5g) (High Performance Teledyne C18) y eluído a 30 mL/min. Como solventes se utilizaron agua y metanol (solvente A y solvente B, respectivamente), en gradiente: 10% solvente B (0-1 min); 100% solvente B (15 min) y 100% solvente B (8 min). La separación de las fracciones fue monitoreada a longitudes de onda de 228 nm and 279 nm. Estas mediciones de absorbancia fueron detectadas por PDA en el extracto crudo de RKCA-744 para los iones de m/z de 1330 g/ml (rt 3.3 min) y de m/z de 647 g/ml (rt 4.0 min), respectivamente y corresponden a los picos mayoritarios dentro del perfil químico

del extracto, siendo el primer ión un potencial nuevo compuesto bioactivo y el segundo un ión relacionado a la alchevimicina A, según dereplicación por base de datos (Antibase 2017).

La totalidad de las fracciones obtenidas fueron secadas y diluídas en metanol a una concentración de 500 µg/mL, para obtención del perfil químico por LCMS. Los perfiles químicos de las fracciones con los iones de interés fueron detectados dentro del material analizado y estas fracciones fueron llevadas posteriores análisis de elucidación estructural por Resonancia Magnética mono y bidimensional.

4.3.3. Elucidación estructural de los iones mayoritarios presentes en el extracto crudo del aislado RKCA-744.

Los análisis de elucidación estructural de biomacromoléculas se realizan llevando a cabo experimentos de Resonancia Magnética Nuclear (RMN). Esta se define como el momento electromagnético de un átomo o espín y la interacción de este espín con respecto a los átomos cercanos genera información no solo del átomo como tal si no también de su vecindario (Castillo 2011). Los átomos comúnmente utilizados para la visualización del espectro son protones (^1H) y Carbono (^{13}C). La cantidad de protones y carbonos es una medición monodimensional y es la primera fase de visualización en RMN. Otros experimentos que permiten obtener una visualización bidimensional de la molécula basándose en las correlaciones existentes entre distintos tipos de átomos, son: COSY (COrrrelation SpectroscopY) que permite observar los desplazamientos químicos de los protones ^1H en ambas direcciones y las correlaciones de estos entre 3 a 4 enlaces de distancia; HSQC (Heteronuclear Single Quantum Coherence), el cual determina los protones que se encuentran unidos a átomos de Carbono dentro de una molécula y HMBC (Heteronuclear Multiple Bond Correlation) cuya función es detectar las conectividades protón-carbono al igual que el HSQC, pero a dos y tres enlaces de distancia (Castillo 2011).

En el caso de esta investigación, las fracciones de interés fueron secadas y diluídas en 600 µL de metanol deuterado para análisis monodimensional de protón (^1H) y carbono (^{13}C) y análisis

bidimensionales tipo COSY, HSQC y HMBC utilizando un resonador Bruker Avance de 600 MHz y el software MestReNova para análisis de espectros. La esquematización inicial de las moléculas presentes en las fracciones de interés fue realizada mediante el programa de libre acceso NMRDB (www.nmrdb.org), detectando cantidad de protones y carbonos dentro de la molécula y ubicando cada elemento según correlaciones visualizadas en los espectros bidimensionales. La esquematización final se realizó utilizando el software ChemDraw Pro 8.0 (PerkinElmer®).

4.4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.4.1. Fermentación a gran escala del aislado RKCA-744 y obtención de extracto crudo

Luego del protocolo de fermentación del aislado RKCA-744 en tres litros de medio ISP2 a una concentración del 3% v/v y posterior extracción de la fase orgánica en acetato de etilo, 148.85 mg de un polvo de color amarillo fue obtenido como extracto crudo. Este extracto fue diluido en metanol a concentración de 500 ug/ml para obtención del perfil químico por UPLC-HRMS y comparación con el perfil químico obtenido en el primer protocolo de fermentación de cultivos en microescala (7 ml).

Los perfiles cromatográficos de PDA, ELSD y TIC (corriente total iónica) fueron visualizados usando el software XCalibur 2.2 SP1.48 (Thermo Scientific). Dos picos mayoritarios fueron detectados en ambos cultivos. El primer pico presentó un m/z de 1330 g/ml y rt de 3.3 min, sin asociaciones a productos naturales conocidos en Antibase 2017. El compuesto asociado a este primer pico recibió codificación interna como CA-13. El segundo pico presentó un m/z de 648 g/ml con rt de 4.2 min y fue asociado a la Alchevimicina A según datos de Antibase 2017. El compuesto asociado a este segundo pico recibió codificación interna como CA-64 (Figura 4).

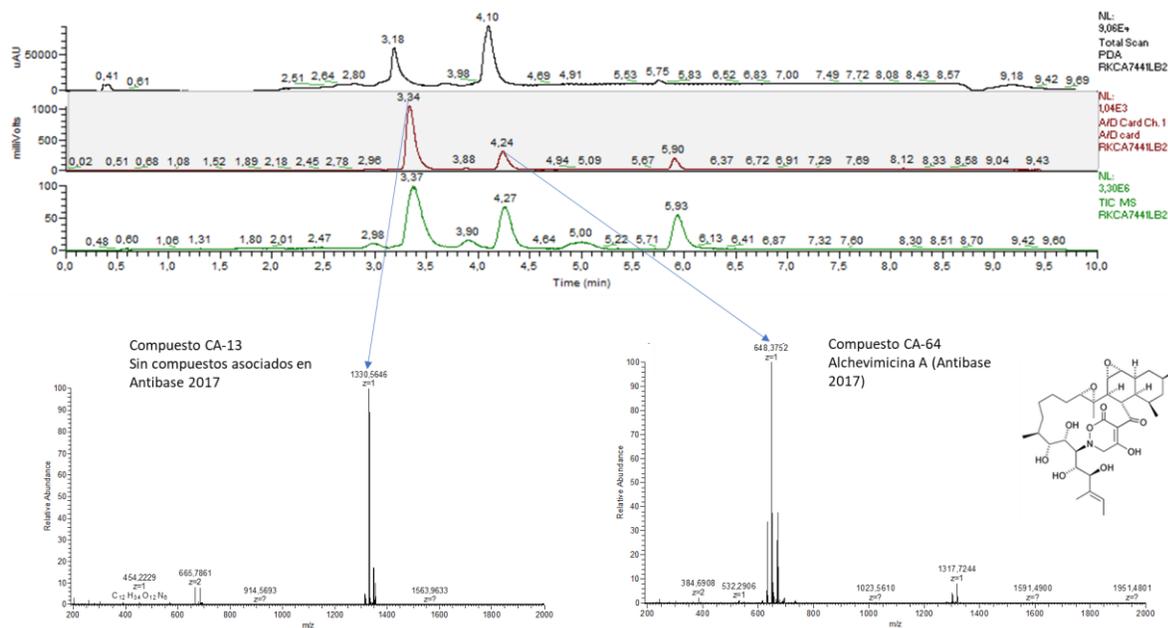


Figura 4. Perfil químico del aislado de actinobacteria RKCA-744, obtenido por UPLC-HRMS acoplado a ELSD y PDA. Se observan dos picos mayoritarios: CA-13, con m/z de 1330 g/ml y CA-64 con m/z de 648 g/ml.

Debido a que el perfil químico presente en el extracto crudo del cultivo de 3 litros de caldo ISP2 fue equiparable al obtenido en cultivos previos realizados en 7 ml de medio, manteniendo los mismos picos mayoritarios CA-13 y CA-64, la totalidad del extracto crudo obtenido (148.85 mg) fue llevada a protocolos de fraccionamiento por CombiFlash para la obtención por separado de cada uno de los compuestos.

4.4.2. Fraccionamiento del extracto crudo del aislado RKCA-744

Un total de 15 fracciones fueron obtenidas a partir de 148.85 mg de extracto crudo del aislado de actinobacteria RKCA-744, por medio de CombiFlash® Rf (Teledyne Isco®). Cada una de las fracciones fue llevada UPLC-HRMS para obtención de perfil químico y posterior detección de las fracciones de interés, en este caso aquellas evidenciando los picos mayoritarios de los compuestos CA-13 y CA-64.

El pico del compuesto mayoritario CA-13 fue detectado en las fracciones 6 y 7. Por otro lado, en las fracciones 10 y 11 se evidenció el pico del compuesto mayoritario CA-64 (Figura 5).

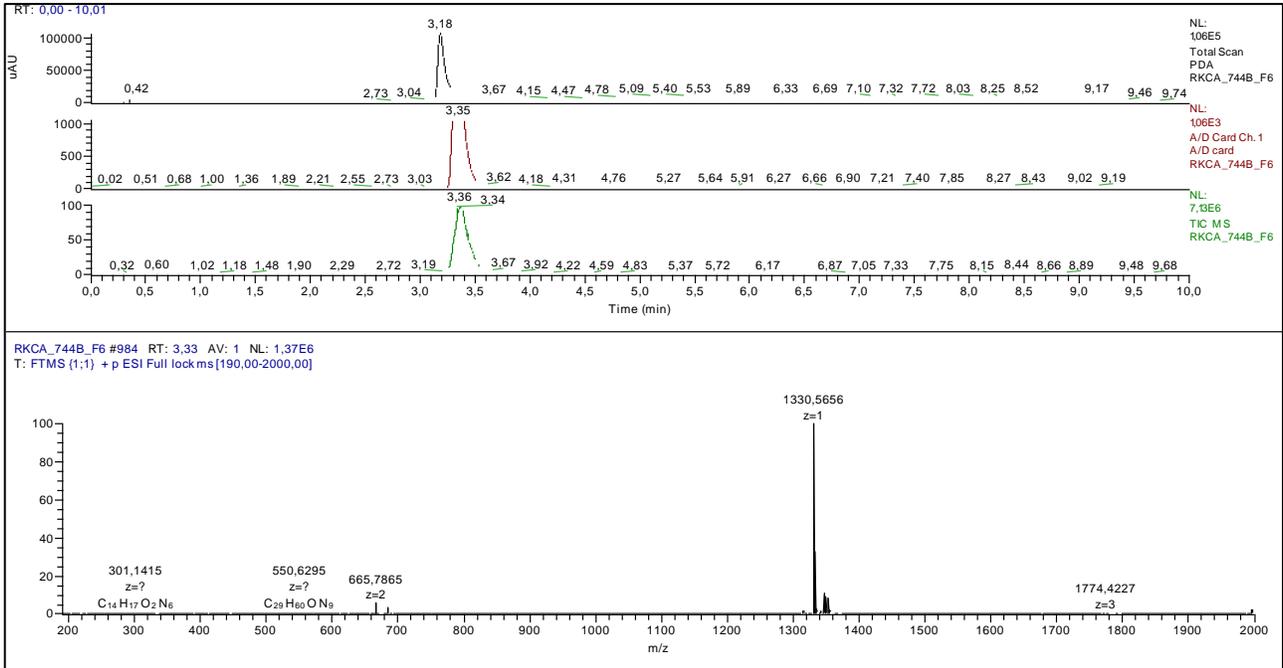
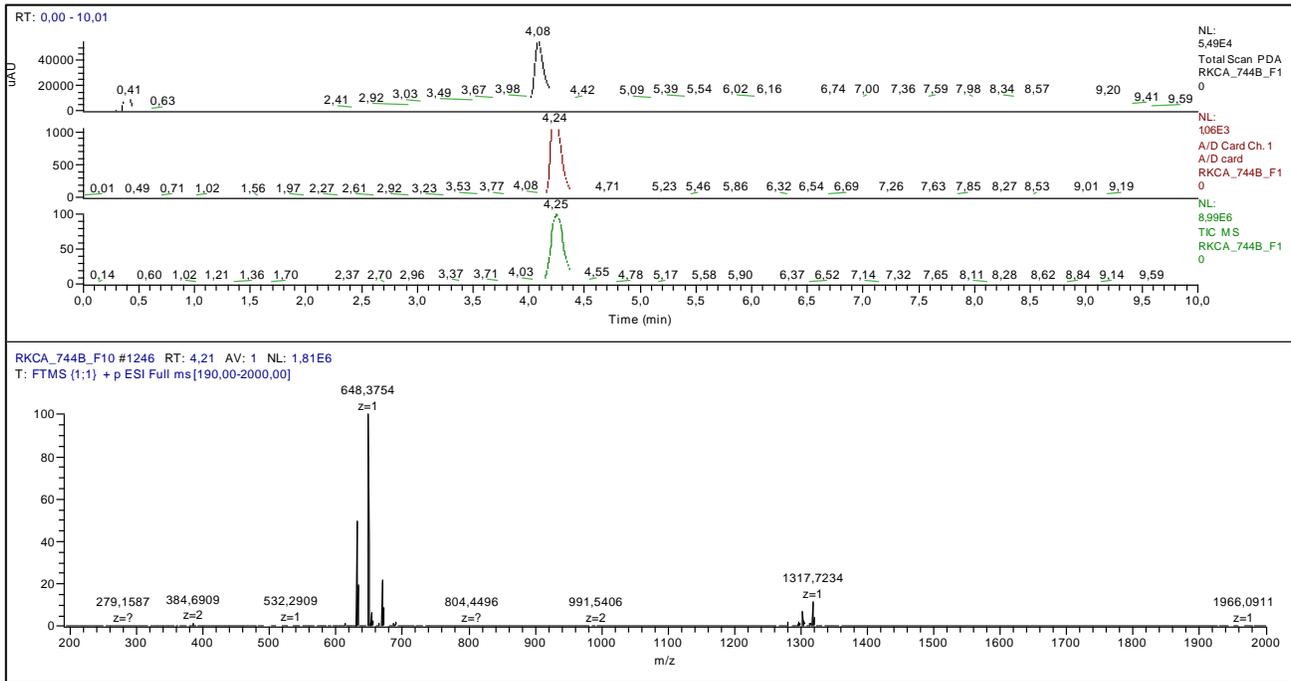
A.**B.**

Figura 5. Perfiles cromatográficos de las fracciones 6 y 10 del extracto crudo del aislado de actinobacteria RKCA-744. **A.** Pico mayoritario CA-13 (m/z de 1330 g/ml) y **B.** Pico mayoritario CA-64 (m/z de 648 mig/ml).

Las fracciones de interés fueron separadas y secadas para obtener un total de 31.01 mg del compuesto CA-13, renombrado como fracción 1 y 19.99 mg del compuesto CA-64, renombrado como fracción 2. Un total de 4.5 mg de cada compuesto fue utilizado para posteriores análisis de elucidación estructural por NMR.

4.4.3. Elucidación estructural de los iones mayoritarios presentes en el extracto crudo del aislado RKCA-744.

4.4.3.1 Compuesto CA-13. Fracción 1

Mediante análisis de Resonancia Magnética Nuclear mono y bidimensional, la fracción 1 correspondiente al posible nuevo compuesto CA-13 evidenció 6 grupos metilo, 6 metilenos y 22 carbonos cuaternarios. Los datos espectrales y las correlaciones evidenciadas en HMBC se presentan en la Tabla 1. La interpretación de los datos de correlación entre protones ^1H - ^1H mediante COSY NMR permitió la identificación de 15 sistemas de spin correspondientes a los fragmentos C-1_C-2, C-4_C-5, C-7_C-8, C-9_C-10, C-12_C-13, C-17_C-18, C-17_C-19, C-22_C-23, C-27_C-28, C-32_C-33, C-34_C-35, C-37_C-38, C-42_C-43, C-53_C-54 and C-59_C-60. La presencia de al menos dos anillos aromáticos fue deducida a partir de las resonancias entre los δH 8.0-6.35 ppm y fueron ubicadas dentro de un cromóforo que presentó dos cambios químicos distintivos (δC 149.22 y δC 149.09), indicando la presencia de enlaces sustituyentes O y N en los carbonos C-49 y C-47, respectivamente. Las correlaciones observadas mediante análisis HMBC y la presencia de grupos carbonilo con resonancias entre los δC 175.7-170.59 ppm, permitieron detectar la presencia de 6 aminoácidos: Alanina, Leucina, Valina, Asparginina, Treonina y Prolina. Otras cuatro unidades de aminoácidos fueron deducidas como: Unidad 1, con fragmento C-1_C-2 correlacionado con un carbonil en C-3 (δC 142.15); Unidad 2: con fragmento C-12_C-13 correlacionado con un carbonil en C-15 (δC 172.35); Unidad 3: metino (δH 5.0) correlacionado con C-27 (δC 70.98); and unidad 4: con fragmentos C-37_C-38, correlacionados con un carbonil en C-39 (δC 173.16) y acoplado con los fragmentos C-9_C-10. La conectividad entre esta cadena de aminoácidos y el cromóforo fue elucidada a partir de las correlaciones encontradas en el

espectro HMBC, encontrando conexión entre C-42_C-43, C-45 con el carbonil detectado en C-40 (δ_C 162.11); conexión C-12_C13 con un metino aromático en C-56 (δ_C 121.57) y conexión C-7_C-8 con un metino aromático en C-62 (δ_C 126.52).

Tabla 1. Datos de ^{13}C y ^1H por Resonancia Magnética Nuclear para la fracción 1 (compuesto CA13 disuelto en MeOH-d₄, 600 MHz)

Posición	δ_C	δ_H (J en Hz)	HMBC
1	75.45, CH	4.59, d (9.64)	3, 4
2	58.84, CH	4.81, d (9.68)	3
3	142.15, C		
4	58.93, CH	2.90, m	5
5	17.59, CH ₃	0.90, m	2, 4, 7, 9
6	171.76, C		
7	57.69, CH	3.50, d (1.97)	4,5, 62
8	44.05, CH ₂	3.52, 4.22, m	6
9	25.9, CH	1.55, m	38
10	22.47, CH ₃	0.90, m	8, 38
11	23.44, CH ₃	0.90, m	8, 10
12	71.98, CH	4.74, d (10.31)	15, 46, 56
13	65.42, CH	3.67, dd (3.51, 13.85)	15
14	73.19, CH	5.98, s	15
15	172.35, C		
16	59.01, CH	4.76, m	17, 19, 24
17	30.80, CH	2.74, m	20, 22
18	18.69, CH ₃	1.23, t (7.59)	19, 16, 17
19	20.57, CH ₃	0.96, d (6.96)	16, 17, 18
20	174.27, C		
21	171.31, C		

Tabla 1 - continuacion. Datos de ^{13}C y ^1H por Resonancia Magnética Nuclear para la fracción 1 (compuesto CA13 disuelto en MeOH-d4, 600 MHz)

Posición	δ_{C}	δ_{H} (J en Hz)	HMBC
22	51.07, CH	4.12, dd (3.94, 8.95)	
23	36.02, CH ₂	2.74, 2.83, m	20, 21, 22
24	172.81, C		
25	175.7, C		
26	62.74, CH	5.00, d (5.21)	
27	70.98, CH	5.40, m	21, 25
28	18.44, CH ₃	1.40, d (6.85)	26, 27
29	170.59, C		
30	62.15, CH	5.00, t (7.82)	27
31	172.74, C		
32	49.14, CH ₂	3.79, 4.04, m	
33	26.15, CH ₂	1.95, 2.00, m	30, 34, 35
34	31.62, CH ₂	1.80, 2.34, m	32, 33, 36
35	62.03, CH	4.43, dd (3.94, 8.95)	
36	173.77, C		
37	52.35, CH	4.68, dd (5.49, 9.05)	9
38	44.16, CH ₂	1.47, 1.54, m	10, 11, 36
39	173.16, C		
40	162.11, C		
41	132.73, C		
42	125.34, CH	6.76, dd (2.55, 8.60)	40, 41
43	129.54, CH	7.25 dd (2.29, 8.60)	36, 40, 41, 46
44	128.98, C		
45	132.67, CH	7.46 dd (2.30, 8.26)	36, 40
46	133.66, C		
47	149.22, C		
48	130.65, C		
49	149.09, C		
50	136.65, C		
51	129.39, CH	7.32, dd (6.54, 10.38)	52
52	137.53, C		
53	139.05, CH	8.06, d (15.64)	52,55
54	126.76, CH	7.00, d (15.62)	50

Tabla 1 - continuacion. Datos de ^{13}C y ^1H por Resonancia Magnética Nuclear para la fracción 1 (compuesto CA13 disuelto en MeOH-d₄, 600 MHz)

Posición	δ_{C}	δ_{H} (J en Hz)	HMBC
55	127.83, CH	7.50 d (7.21)	58
56	121.57, CH	6.35, d (2.11)	12, 49
57	121.26, C		
58	128.63, C		
59	121.57, CH	7.17, dd (0.60, 10.62)	12, 47, 54
60	117.35, CH	6.93, d (8.46)	50
61	123.77, CH	7.28 dd (2.56, 8.18)	50
62	126.52, CH	7.14, d (7.91)	50, 51

La esquematización del compuesto CA13 presente en la fracción 1 del asilado de actinobacteria RKCA-744 se presenta en la figura 6.

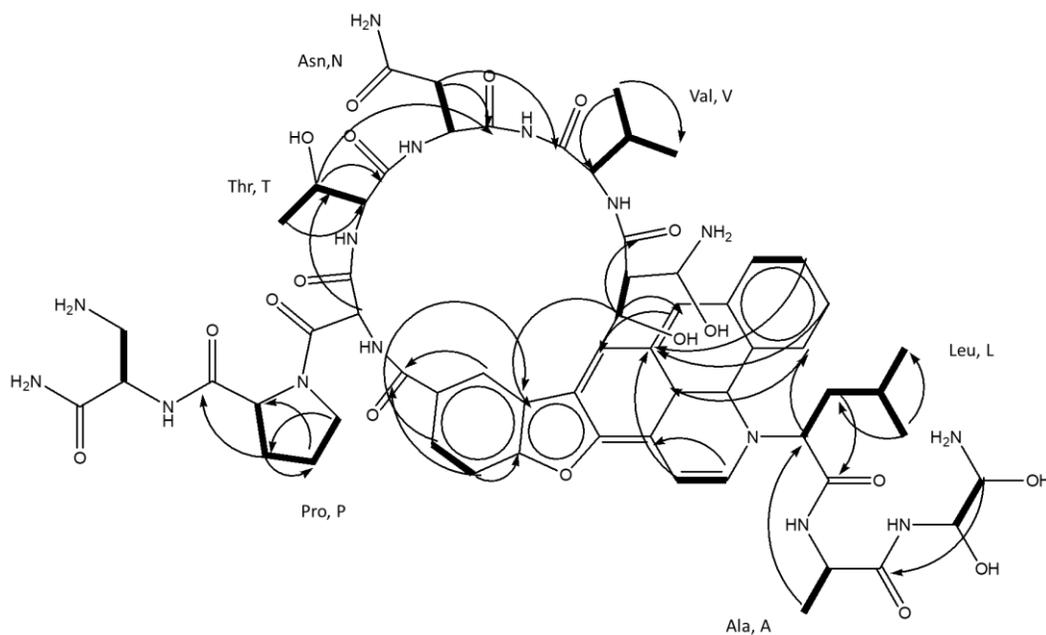


Figura 6. Esquematización del compuesto CA-13 presente en la fracción 1 del aislado RKCA-744. En línea gruesa se resaltan correlaciones COSY. Software utilizado ChemDraw Pro 8.0

Observando la conformación química de la molécula elucidada CA-13, se encontró en esta una estructura macrocíclica con ramificaciones y posible presencia de aminoácidos no comunes. Estas características son comunes en los péptidos no ribosomales (Roy 2017) los cuales han sido aislados de diversas cepas de actinobacterias debido a su utilidad como agentes con diversas propiedades farmacológicas, especialmente antibacteriales o citotóxicas (Martinez 2016). Sin embargo, la ruta biosintética de esta molécula aún no es conocida.

4.4.3.2 Compuesto CA-64. Fracción 2

Mediante análisis de Resonancia Magnética Nuclear mono y bidimensional, la fracción 2 correspondiente al compuesto CA-64, relacionado con la Alchivemicina por medio de Antibase 2017, evidenció la presencia de 6 grupos metilo, 7 metilenos y 4 carbonos cuaternarios. De acuerdo a la interpretación del espectro ^1H - ^1H COSY NMR, se identificaron 16 sistema de spin correspondientes a: : C-4_C-5, C-9b_C-8, C-9b_C-10, C-17b_C-18b, C-11_C-10, C-12_C-10, C-22_C-21, C-22_C-23, C-25_C-24. Debido a la relación del compuesto CA-64 con un metabolito ya reportado en Antibase 2017, los movimientos químicos encontrados de CA-64 fueron comparados con aquellos reportados por Igarashi y colaboradores, referente a la descripción de las características químicas de la Alchivemicina A, como nuevo compuesto extraído a partir de un aislado de *Streptomyces* sp (Igarashi 2010) (Tabla 2).

Tabla 2. A la derecha, datos de HSQC, ¹³C y ¹H por Resonancia Magnética Nuclear para la fracción 2 (compuesto CA64 disuelto en MeOH-d₄, 600 MHz). A la izquierda, datos de HSQC, ¹³C y ¹H por Resonancia Magnética Nuclear para la Alchivemicina A (MeOH-d₄, 600 MHz), descritos por Igarashi y colaboradores en 2010

No.	Artículo de Referencia Igarashi et al 2010		Tipo de carbono HSQC	Fracción 2	
	δH	δX		δX	δH
1	-	176.6	qC	176.4	-
2	-	105.3	qC	105.04	-
3	-	201.3	qC	205	-
4	4.72	36.8	CH	37.44	4.5
5	2.25	38.7	CH	37.2	2.31
6	1.67	39.4	CH	39.13	1.67
7A	1.34	39.9	CH ₂	39.62	1.34
7B	1.23	39.9	CH ₂	39.62	1.26
8	1.58	34.7	CH	34.48	1.58
9A	1.67	34	CH ₂	33.73	1.66
9B	1.17	34	CH ₂	33.73	1.19
10	2.19	40.4	CH	39.46	2.18
11	3.11	58.7	CH	58.32	3.09
12	3.05	54.5	CH	53.86	3.03
13	2.09	51.3	CH	51.39	1.95
14	-	61.6	qC	59.81	-
15	2.74	64.8	CH	65.79	2.7
16	1.72	26.5	CH	25.78	1.68
17A	1.71	27.4	CH ₂	27.11	1.69
17B	1.47	27.4	CH ₂	27.11	1.5
18A	1.58	28	CH ₂	27.91	1.66
18B	1.33	28	CH ₂	27.91	1.48
19A	1.62	34.7	CH ₂	34.25	1.68
19B	1.57	34.7	CH ₂	34.25	1.47
20	1.67	36.2	CH	38.85	1.67

Tabla 2-continuación. A la derecha, datos de HSQC, ¹³C y ¹H por Resonancia Magnética Nuclear para la fracción 2 (compuesto CA64 disuelto en MeOH-d₄, 600 MHz). A la izquierda, datos de HSQC, ¹³C y ¹H por Resonancia Magnética Nuclear para la Alchivemicina A (MeOH-d₄, 600 MHz), descritos por Igarashi y colaboradores en 2010

No.	Artículo de Referencia Igarashi et al 2010		Tipo de carbono HSQC	Fracción 2	
	δ H	δ X		δ X	δ H
21	3.5	79.5	CH	79.69	3.82
22	4.3	75.3	CH	75.25	4.3
23	3.77	62.7	CH	62.27	3.76
24	4.42	71.8	CH	71.39	4.45
25	4.06	80.4	CH	80.13	4.06
26	-	137.4	qC	137.21	-
27	5.61	124.1	CH	123.76	5.61
28	1.66	13.8	CH ₃	13.87	1.66
29	-	192.2	qC	191.78	-
30A	4.31	64.1	CH ₂	63.65	4.26
30B	4.16	64.1	CH ₂	63.65	4.11
31	0.81	22.1	CH ₃	21.79	0.83
32	1.02	23.3	CH ₃	22.92	1.01
33	1.28	15.3	CH ₃	14.44	1.29
34	0.83	12.7	CH ₃	13.46	0.85
35	1.68	12.1	CH ₃	11.22	1.68

La similitud de señales y espectros de resonancia magnética nuclear entre los dos compuestos, permitió confirmar que el metabolito CA-64 detectado en el aislado RKCA-744 era en efecto la Alchivemicina A (Figura 7), dato sugerido en primera instancia mediante dereplicación por base de datos Antibase 2017.

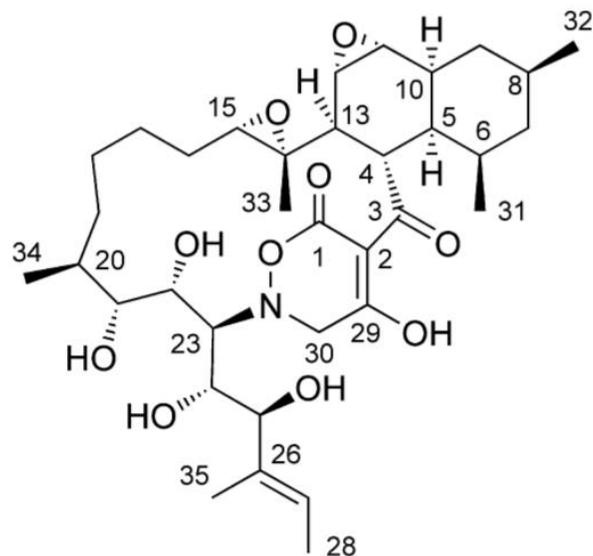


Figura 7. Esquematzación de la Alchivemicina A presente en la fracción 2 del aislado RKCA-744. Tomado de Igarashi et al 2010

La Alchivemicina A es un metabolito tipo policétido policíclico, derivado posiblemente a partir de las biosíntesis de un híbrido entre un péptido no ribosomal y un policétido sintasa (NPRS-PKS). Este metabolito fue descrito por primera vez en el año 2010 luego de su extracción a partir de una cepa de *Streptomyces* sp aislada de un hoja de *Allium tuberosum* en Japón (Komaki 2016; Igarashi 2010). Una ruta biosintética propuesta para este metabolito en particular, implica el enlace de una glicina (que sirve de sustrato para biosíntesis NPRS) con parte de una molécula proveniente de la biosíntesis PKS, resultando en un anillo de tetrahidrooxacina también conocido como 2H-tetrahydro-4,6-dioxo-1,2-oxacina (TDOR), el cual es característico de este compuesto (Komaki 2016; Yang 2016; Kim 2013).

Este tipo de estructuras híbridas son resultado del complejo repertorio encontrado en la producción de metabolitos secundarios en microorganismos (Martinez 2016) y son de interés debido a su posible utilidad como agentes bioactivos

4.4.4. Potencial biológico de los iones mayoritarios presentes en el extracto crudo del aislado RKCA-744.

Debido a que el extracto crudo del aislado RKCA-744 evidenció bioactividad positiva antibacteriana frente a *Staphylococcus aureus*-MRSA (ATCC® BAA-44™) y actividad citotóxica positiva frente a la línea tumoral de cáncer de seno (ATCC® HTB-26™), las fracciones de los dos compuestos mayoritarios CA-13 y CA-64 presentes en el extracto fueron llevadas a evaluación de bioactividad antibacteriana y citotóxica con el fin de establecer la función de cada una en esta respuesta biológica.

Para la evaluación de la bioactividad antibacteriana, ensayos con cultivos bacterianos a microescala fueron realizados en platos de 96 pozos. Cada fracción fue disuelta en 20% de DMSO y utilizada a una concentración de 62.5 ug/ml frente a cultivos bacterianos de *Staphylococcus aureus*-MRSA (ATCC® BAA-44™). El crecimiento bacteriano fue medido a una densidad óptica de 600 nm en el tiempo cero (medida inicial) y luego de 22 horas de incubación a 37°C usando un lector de microplacas Thermo Scientific Varioskan. El cambio en la densidad óptica medida a 600 nm luego del periodo de incubación fue comparado con controles negativos estableciendo un porcentaje de inhibición. Un porcentaje de actividad antibacteriana entre el 0 y 49% fue indicativo de baja actividad, mientras que porcentajes entre 50 – 79% y 80 – 100% fueron indicativos de mediana y alta respuesta antibacteriana, respectivamente.

Para la evaluación de la actividad citotóxica frente a la línea tumoral de cáncer de seno (ATCC® HTB-26™), cada fracción fue disuelta en 1% de DMSO y utilizada a una concentración de 62.5 ug/ml. Blancos control fueron realizados utilizando DMSO al 1% en medio de cultivo, doxorubicina como control positivo para la línea tumoral y fenoxietanol para la línea no tumoral Vero. La placa fue llevada a incubación por 72 horas. Se agregó reactivo alamarBlue® a cada pozo a una concentración de 10% (v/v) y se midió la fluorescencia del reactivo en cada pozo al inicio del ensayo (tiempo cero) y luego de cuatro horas de exposición. La medición de fluorescencia se realizó en un lector de placas Thermo Scientific Varioskan Flash a 590 nm de emisión. El cambio

en las emisiones de fluorescencia se utilizó para calcular el porcentaje de viabilidad celular luego de cada tratamiento con los extractos. Se estableció como resultado positivo una citotoxicidad mayor al 50%.

4.4.4.1 Compuesto CA-13. Fracción 1

No se observó actividad antibacteriana frente a la cepa *Staphylococcus aureus*-MRSA (ATCC® BAA-44™) a una concentración de 62.5 ug/ml del compuesto. Sin embargo, a una concentración de 62.5 ug/ml, el compuesto CA-13 presentó un porcentaje de inhibición del 94% frente a la línea tumoral de cáncer de seno (ATCC® HTB-26™) y un 20% de citotoxicidad frente a la línea no tumoral Vero (Tabla 3).

4.4.4.2 Compuesto CA-64. Fracción 2

Se observó actividad antibacteriana del 82% frente a la cepa *Staphylococcus aureus*-MRSA (ATCC® BAA-44™) a una concentración de 62.5 ug/ml del compuesto. Con respecto a la actividad citotóxica, la fracción 2 presentó un 97% de actividad citotóxica frente a la línea tumoral de cáncer de seno (ATCC® HTB-26™) y 91% de citotoxicidad frente a la línea no tumoral Vero, a una concentración de 62.5 ug/ml (Tabla 3).

Tabla 3. Porcentaje de actividad antibacterial y citotóxica del extracto crudo de RKCA-744 y sus dos compuestos mayoritarios CA-13 y CA-64. Cepa patógena bacteriana y cultivos celulares utilizados: *Staphylococcus aureus*-MRSA (ATCC® BAA-44™), la línea tumoral de cáncer de seno (ATCC® HTB-26™) y línea no tumoral Vero.

	Extracto crudo RKCA-744 [62,5 µg/ml]	Compuesto CA-13 Fracción 1 [62,5 µg/ml]	Compuesto CA-64 Fracción 2 [62,5 µg/ml]
Actividad antibacterial frente a <i>Staphylococcus aureus</i> -MRSA (ATCC® BAA-44™)	92%	0%	82%
Actividad citotóxica frente a la línea tumoral de cáncer de seno (ATCC® HTB-26™)	86%	94%	97%
Actividad citotóxica frente a la línea no tumoral Vero	12%	20%	91%

4.5 CONCLUSIONES

A partir de una colección microbiológica de 790 aislados de actinobacterias obtenidos de las riberas del río Arauca (Colombia) y utilizando diferentes estrategias de priorización mediante ensayos por bioactividad y dereplicación química (cap. 3) fue posible detectar el aislado RKCA-744 como una cepa de actinobacteria capaz de producir dos metabolitos de interés farmacológico

Los dos metabolitos encontrados corresponden a los compuestos CA-13 y CA-64, compuestos mayoritarios en el extracto crudo del aislado RKCA-744. La relevancia de este hallazgo radica en la novedad del metabolito CA-13 ya que hasta la fecha no existe información disponible acerca

de este posible nuevo compuesto y también en la novedad de reportar por primera vez la extracción del metabolito Alchevimicina A (compuesto CA-64) a partir de un aislado de actinobacteria asociado a hábitats acuáticos en nuestro país y cuyas características químicas y bioactivas aún se encuentran en proceso de estudio a nivel global, debido a su reciente descubrimiento que data del año 2010 (Igarashi 2010, Ma 2016; Yang 2016).

La relevancia biológica de estos compuestos fue definida de acuerdo al porcentaje de inhibición frente a la cepa de bacteria patógena multirresistente *Staphylococcus aureus*-MRSA (ATCC® BAA-44™) y frente a la línea tumoral de cáncer de seno (ATCC® HTB-26™), línea celular cancerígena de relevancia clínica a razón de su resistencia frente a las terapias de tratamiento actuales.

A pesar de que el extracto crudo de la cepa RKCA-744 presentó un porcentaje del 92% de actividad antibacteriana frente a *Staphylococcus aureus*-MRSA (ATCC® BAA-44™), el compuesto CA-13 no evidenció una actividad antibacteriana a diferencia del compuesto CA-64 (Tabla 3). Por otro lado, la alchivemicina A relacionada al compuesto CA-64, ha sido reportada con anterioridad como agente antimicrobiano contra *Micrococcus luteus* (Onaka 2011, Kim 2013). Sin embargo, son pocos los reportes referentes a otro tipo de actividad antimicrobiana posiblemente debido a su escasa extracción y aislamiento y las dificultades propias para el desarrollo sintético de este tipo de compuestos heterocíclicos (Ma 2016, Yan 2016). Al momento, este sería el primer reporte evidenciando la actividad antibacteriana positiva de la Alchivemicina A frente *Staphylococcus aureus*-MRSA (ATCC® BAA-44™).

A nivel de citotoxicidad, ambos compuestos mostraron una respuesta biológica positiva frente a la línea tumoral de cáncer de seno (ATCC® HTB-26™) con porcentajes mayores al 90% a una concentración del 62.5 µg/ml, sugiriéndolos como potenciales agentes citotóxicos. Sin embargo, la actividad citotóxica frente a la línea no tumoral Vero fue determinante para diferenciar la relevancia de estos los dos metabolitos en cuanto a este tipo de respuesta biológica. En el caso del compuesto CA-64 se evidenció un porcentaje del 91% de citotoxicidad en esta línea celular a una concentración del 62.5 µg/ml, resultado que disminuye la probabilidad de continuar con

posteriores análisis antitumorales debido a su escasa viabilidad en células no tumorales. Por otro lado, el compuesto CA-13, mostró una respuesta citotóxica negativa frente a la misma línea celular en iguales condiciones, hecho que permite priorizar el compuesto CA-13 para posteriores estudios como agente antitumoral contra ATCC® HTB-26™ al evidenciar citotoxicidad ante células cancerígenas y viabilidad celular en células no tumorales. Este hecho es de relevancia si se tiene en cuenta que esta línea tumoral de cáncer de seno es catalogada como triple negativa (TNBC), al presentar ausencia de receptores de estrógenos (ER), receptores de progesterona (PR) y receptores de crecimiento epidermal 2 (HER2), lo cual se asocia a un mal pronóstico ya que no existe hasta al momento una terapia hormonal alterna disponible para el tratamiento de esta enfermedad fuera de la quimioterapia tradicional mediante el uso de antraciclinas y taxanos (Losada 2017).

Los hallazgos obtenidos en este capítulo permiten corroborar la utilidad de la metodología establecida en esta investigación como vía para la obtención de productos naturales potencialmente novedosos y con actividad biológica relevante. Combinación de estrategias de aislamiento (cap 2), estrategias de priorización mediante dereplicación biológica y química (cap 3) y priorización de compuestos mayoritarios a partir de análisis de perfiles químicos en extractos bioactivos (cap 4) fueron confirmados como pasos esenciales dentro de la búsqueda de nuevos productos naturales bioactivos a partir de microorganismos.

4.6 BIBLIOGRAFIA

1. Atlas RM. 2010. Handbook of Microbiological Media. Fourth Edition. ASM Press. Washington D.C.
2. Bérdy, J. Bioactive microbial metabolites. *J Antibiot* 58, 1–26 (2005). 15. Demain, A. L. Importance of microbial natural products and the need to revitalize their discovery. *J Ind Microbiol Biotechnol* 41, 185–201 (2014)
3. Castillo AM. 2011. Elucidación asistida de estructuras a partir de espectros de resonancia magnética nuclear. Tesis de Maestría. Universidad Nacional de Colombia.
4. Dewick PM. 2009. Medicinal Natural Products: A Biosynthetic Approach, 3rd Edition. John Wiley & Sons, Ltd.
5. Duncan KR, Haltli B, Gill KA, Correa H, Berrué F, Kerr RG. 2014. Exploring the diversity and metabolic potential of actinomycetes from temperate marine sediments from Newfoundland, Canada. *J Ind Microbiol Biotechnol*.
6. Gomes E, Schuch V, Lemos E. 2013. Biotechnology of polyketides: New breath of life for the novel antibiotic genetic pathways discovery through metagenomics. *Brazilian Journal of Microbiology* 44, 4, 1007-1034
7. Igarashi Y, Kim Y, In Y, Ishida T, Kan Y, Fujita T, Iwashita T, Tabata H, Onaka H, Furumai T. 2010. Alchivemycin A, a Bioactive Polycyclic Polyketide with an Unprecedented Skeleton from *Streptomyces* sp. *Org. Lett.*, Vol. 12, No. 15
8. Losada M, Herranz M, Micol V, Barrajon E. 2017. Polyphenols as Promising Drugs against Main Breast Cancer Signatures. *Antioxidants*. 6, 88
9. Ma K, Liao D, Yang S, Li X, Lei X. 2016. Studies towards the synthesis of the functionalized C3-C14 decalin framework of alchivemycin A. *Org. Chem. Front.*,3, 251-258
10. Martínez MA and López VE. 2016. Nonribosomal peptides synthetases and their applications in industry. *Sustain Chem Process*. 4:13
11. Onaka H, Mori Y, Igarashi Y, Furumai T. 2011. Mycolic Acid-Containing Bacteria Induce Natural-Product Biosynthesis in *Streptomyces* Species. *Applied and Environmental Microbiology*, p. 400–406
12. Roy S, Banerjee D (2017) Bioactive Metabolites of Actinomycetes—Screening from Genomic and Metabolomic Approach. *Metabolomics (Los Angel)* 7:e154
13. Teledyne ISCO. 2012. Chromatography Application Note AN81. All-Wavelength Collection.
14. Weissman KJ. 2009. Introduction to Polyketide Biosynthesis. *In: Methods in Enzymology - Complex Enzymes in Microbial Natural Product Biosynthesis, Part B: Polyketides, Aminocoumarins and Carbohydrates*. Hopwood DA. 2009. Vol 459. Elsevier Inc.
15. Yang S, Liao D, Tian X, Lei X. 2016. Access to the 2H-Tetrahydro-4,6-dioxo-1,2-oxazine Ring System from Nitron via a Tandem Nucleophilic Addition and Transesterification Reaction. *Org. Lett.*, 18 (3), pp 376–379

CAPITULO 5

Resultados principales y perspectivas

A continuación se presentan los principales resultados obtenidos en esta investigación, derivados de los hallazgos evidenciados en cada uno de los capítulos descritos.

El resultado final se traduce en el cumplimiento del objetivo principal propuesto, cuyo propósito era determinar el potencial bioactivo de actinobacterias cultivables aisladas de la ribera del Río Arauca (Colombia), mediante la conjunción de diferentes estrategias de aislamiento que permitiesen encontrar aislados de actinobacterias adaptadas a este habitat acuático y con capacidad de producir metabolitos secundarios de importancia farmacéutica.

5.1 Sobre estrategias de aislamiento y screening biológico para el estudio de las actinobacterias del río Arauca

En análisis bioprospectivos, la priorización de aislados microbianos mediante el uso de diferentes estrategias de aislamiento y dereplicación biológica es fundamental para la toma inicial de decisiones y agilización de procesos

Pretratamientos fisicoquímicos como adición de fenol, procesos de sonicación y exposición a ondas no ionizantes (microondas) sobre sedimentos de río, favorecen el aislamiento de aislados de actinobacterias con bioactividad de baja abundancia

Los estudios biosprospectivos enfocados en la producción de metabolitos secundarios bioactivos en microorganismos, tienen el reto de solucionar de manera ágil y certera el continuo “redescubrimiento” de productos naturales bioactivos a partir de esta fuente natural. Establecer

una estrategia de aislamiento alternativa mediante la recolección de muestras biológicas en ambientes poco estudiados, el uso de pretratamientos fisicoquímicos sobre una muestra biológica y el uso de estrategias de dereplicación biológica con el fin de detectar aislados potencialmente bioactivos a nivel antimicrobiano, permitió detectar aislados de actinobacterias bioactivos de baja abundancia dentro de la muestra biológica analizada, dato que fue observado mediante el análisis de similitud por perfiles protéicos mediante MALDI TOF-MS.

Al final, esta estrategia metodológica permitió enfocar el estudio bioprospectivo en 78 aislados de actinobacterias a partir de una colección biológica de 790 ejemplares. Es decir, se disminuyó el tiempo de proceso y costo al continuar el estudio con microorganismos priorizados según diferentes parámetros, agilizando análisis posteriores.

5.2 Sobre estrategias de dereplicación química y uso de herramientas metabolómicas en actinobacterias del río Arauca con actividad antimicrobiana y citotóxica.

El uso combinado de estrategias de aislamiento, priorización de ejemplares y uso de técnicas hífenadas y herramientas metabolómicas permiten la obtención y detección de una mayor diversidad química incrementando la posibilidad de encontrar compuestos potencialmente novedosos

El screening biológico y el análisis de perfiles químicos son dos metodologías incluidas dentro de estrategias de dereplicación, que en conjunto tienen como fin no solo detectar y seleccionar ejemplares microbiológicos potencialmente activos, sino también destacar cuáles de ellos son productores de posibles nuevos compuestos. En el caso acá descrito, 78 aislados de actinobacterias priorizados según actividad antimicrobiana, a partir de una colección biológica de 790 ejemplares, fueron llevados a una segunda dereplicación biológica por actividad citotóxica y posterior dereplicación química utilizando protocolos de fermentación a pequeña escala, manejo de técnicas hífenadas como LC-HRMS y análisis metabolómico. Se lograron detectar 2

agrupamientos de aislados, siendo éstos relacionados a la producción de compuestos como la carbazomicina y deoxinibomicina o a la producción de compuestos asociados a la familia de las cremimicinas y actinomicinas, agentes que han sido ampliamente estudiados dentro del género *Streptomyces*. Sin embargo, se encontró que la mayoría de los aislados no hacían parte de alguno de estos dos cluster. Esta observación es indicativa del grado de diversidad química presente dentro de los extractos evaluados, hecho que permite dejar entrever una creciente posibilidad en encontrar metabolitos potencialmente nuevos o no descritos y con bioactividad asociada. Se logró detectar un ión mayoritario no reportado en bases de datos actuales, proveniente del aislado RKCA-744. Este potencial nuevo metabolito correspondía a un ión con m/z de 1330 g/ml y rt de 3.3 min, por lo que el asilado en cuestión se candidatizó como asilado para procesos de fermentación a gran escala y fraccionamiento para la búsqueda y elucidación estructural de un potencial nuevo producto natural bioactivo.

5.3 Sobre el aislamiento y caracterización de compuestos mayoritarios presentes en el aislado *Streptomyces* RKCA-744. Extracción y elucidación química de un péptido no ribosomal potencial nuevo

Un flujo metodológico utilizando estrategias combinadas de aislamiento de microorganismos en hábitats poco estudiados, aunado a estrategias de dereplicación química y biológica permitió la detección de un péptido no ribosomal (NRPS) potencial nuevo con actividad citotóxica relevante

A partir de una colección microbiológica de 790 aislados de actinobacterias obtenidos de las riberas del río Arauca (Colombia) y utilizando diferentes estrategias de priorización mediante ensayos por bioactividad y dereplicación química, fue posible detectar el aislado RKCA-744 como una cepa de actinobacteria capaz de producir dos metabolitos de interés farmacológico. Los dos

metabolitos encontrados corresponden a los compuestos CA-13 y CA-64, compuestos mayoritarios en el extracto crudo del aislado RKCA-744. La relevancia de este hallazgo radica en la novedad del metabolito CA-13 ya que hasta la fecha no existe información disponible acerca de este posible nuevo compuesto y también en la novedad de reportar por primera vez la extracción del metabolito Alchevimicina A (compuesto CA-64) a partir de un aislado de actinobacteria asociado a hábitats acuáticos en nuestro país y cuyas características químicas y bioactivas aún se encuentran en proceso de estudio a nivel global, debido a su reciente descubrimiento que data del año 2010 (Igarashi 2010, Ma 2016; Yang 2016).

La relevancia biológica de estos compuestos fue definida de acuerdo al porcentaje de inhibición frente a la cepa de bacteria patógena multirresistente *Staphylococcus aureus*-MRSA (ATCC® BAA-44™) que fue positiva en CA-64 y negativa en CA-13. A nivel de citotoxicidad, ambos compuestos mostraron una respuesta biológica positiva frente a la línea tumoral de cáncer de seno (ATCC® HTB-26™). Sin embargo, la actividad citotóxica frente a la línea no tumoral Vero fue determinante para diferenciar la relevancia de estos los dos metabolitos, encontrándose positiva en CA-64 y negativa en CA-13 hecho que permite priorizar el compuesto CA-13 para posteriores estudios como agente antitumoral.

5.4 Perspectivas

En general, los resultados obtenidos demuestran la validez del flujo metodológico propuesto, logrando obtener un posible nuevo compuesto con actividad biológica relevante a partir de una gran colección biológica de microorganismos por primera vez aislados de sedimentos del río Arauca en Colombia.

El posible nuevo compuesto CA-13, proveniente del aislado RKCA-744 es sugerido para futuros estudios como agente antitumoral en específico para la línea tumoral de cáncer de seno (ATCC® HTB-26™). Esta línea tumoral de cáncer de seno es catalogada como triple negativa (TNBC), al presentar ausencia de receptores de estrógenos (ER), receptores de progesterona (PR) y

receptores de crecimiento epidermal 2 (HER2), lo cual se asocia a un mal pronóstico ya que no existe hasta el momento una terapia hormonal alterna disponible para el tratamiento de esta enfermedad. Aunque se han iniciado numerosos esfuerzos para lograr obtener nuevos agentes terapéuticos, nuevas moléculas aún son requeridas para el inicio de estudios antitumorales preclínicos.

Así mismo y debido a la novedad de este producto natural, la ruta biosintética aún permanece sin ser definida, aunque de acuerdo a las características de la molécula, el compuesto CA-13 se cataloga como un péptido no ribosomal. Mayor información en este aspecto puede contribuir al desarrollo de nuevas rutas para la biosíntesis de la molécula.

El compuesto CA-64 o Alchivemicina A, fue extraído por primera vez a partir de cultivo líquido de un aislado de actinobacteria de sedimentos del río Arauca. La información relevante a este compuesto se asocia a una cepa de *Streptomyces* sp endógena de la planta *Allium tuberosum* con reporte de actividad antimicrobiana frente a *Micrococcus luteus*. A l momento, este sería el primer reporte evidenciando la actividad antibacteriana positiva de la Alchivemicina A frente a la cepa de bacteria patógena resistente *Staphylococcus aureus*-MRSA (ATCC® BAA-44™), por lo cual posteriores estudios acerca de su mecanismo de acción pueden ser conducidos.

Aunque la tasa de redescubrimiento de productos naturales nuevos dentro de las actinobacterias y en específico dentro del género *Streptomyces* es alta, el flujo de trabajo planteado en esta investigación y sus resultados, permiten sugerir al sistema hidrogeográfico de la Orinoquía colombiana, como un ecosistema con potencial bioprospectivo enfocado al biodescubrimiento de nuevos agentes bioactivos. Estas investigaciones pueden enfocarse también al biodescubrimiento de nuevos compuestos a partir de otros microorganismos asociados a esta fuente natural que en este caso no fueron estudiados y que debido a la escacés de estudios biológicos en la zona aún permanecen desconocidos.

ANEXOS

Anexo 1. H^1 PROTON NMR *Compuesto CA-13*.

Anexo 2. C^{13} CARBON NMR *Compuesto CA-13*.

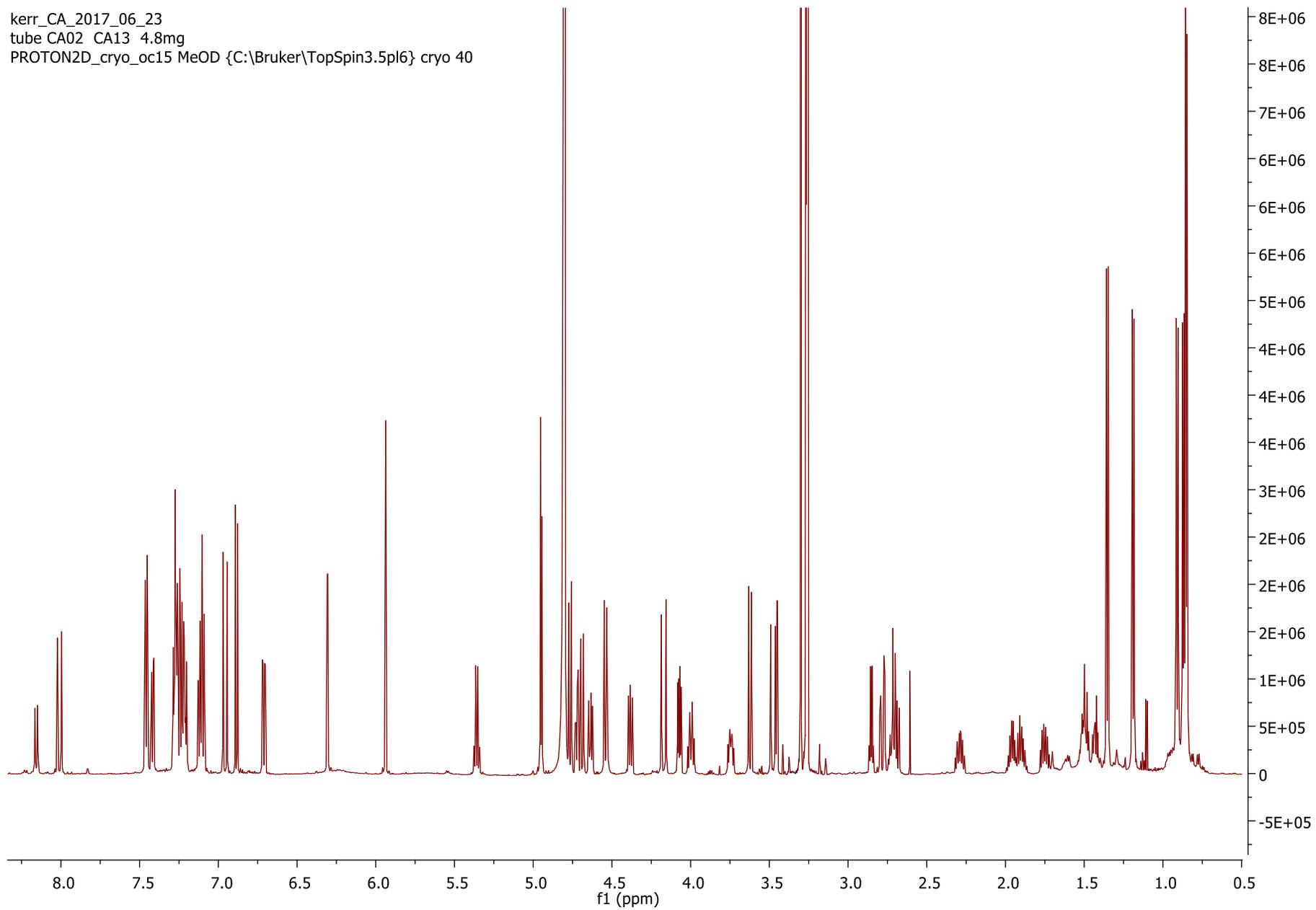
Anexo 3. COSY *Compuesto CA-13*.

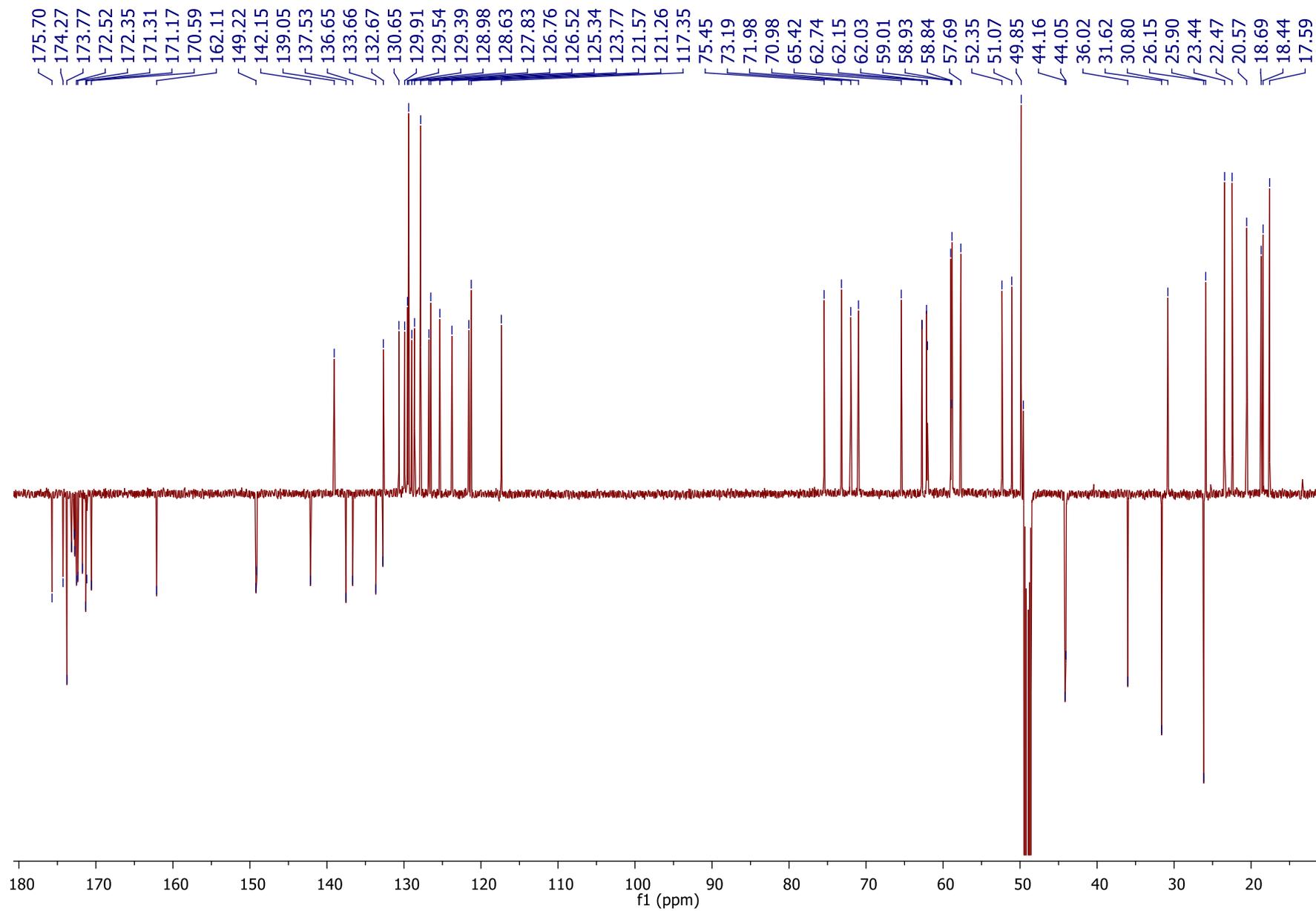
Anexo 4. HSQC *Compuesto CA-13*.

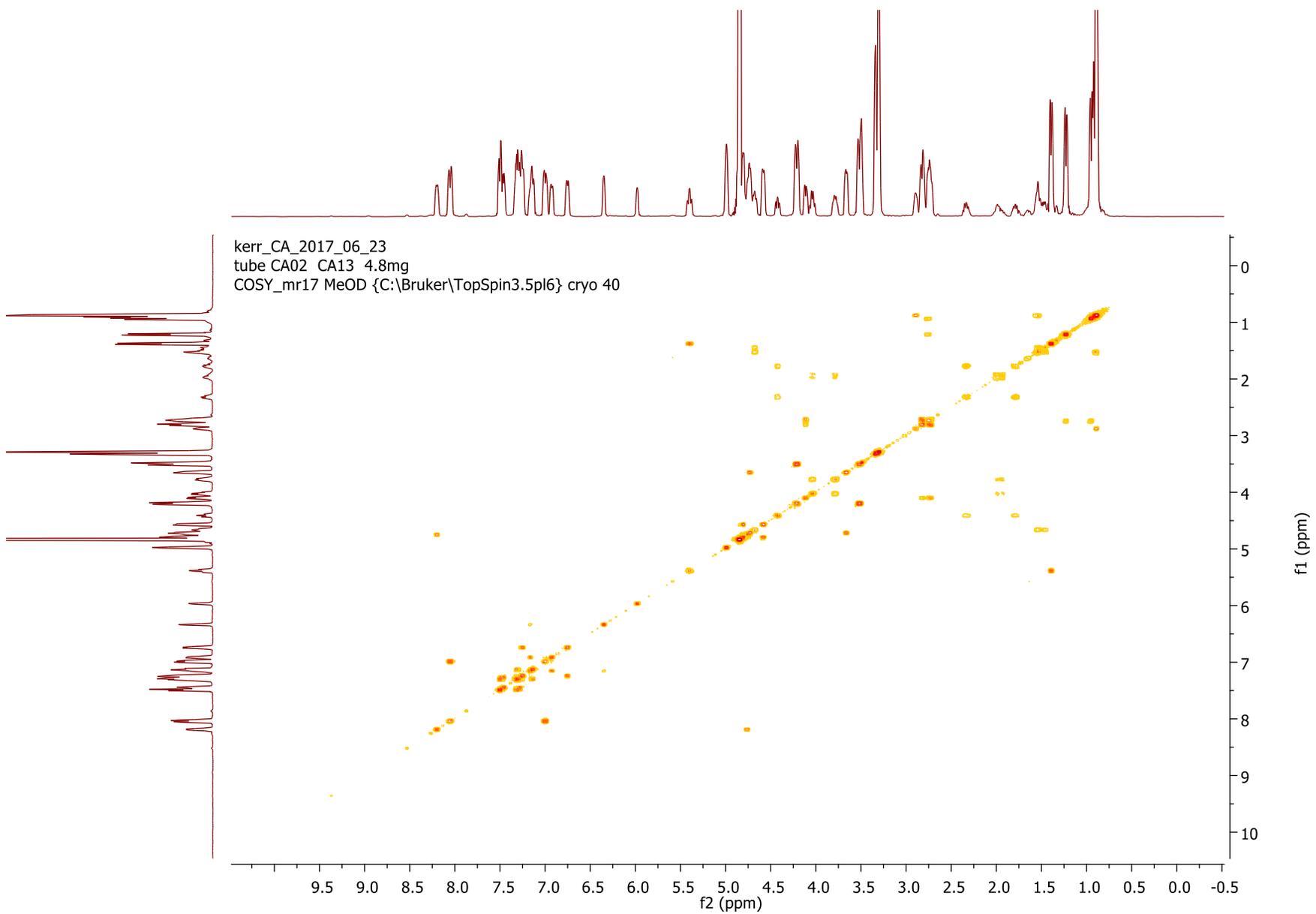
Anexo 5. HMBC *Compuesto CA-13*.

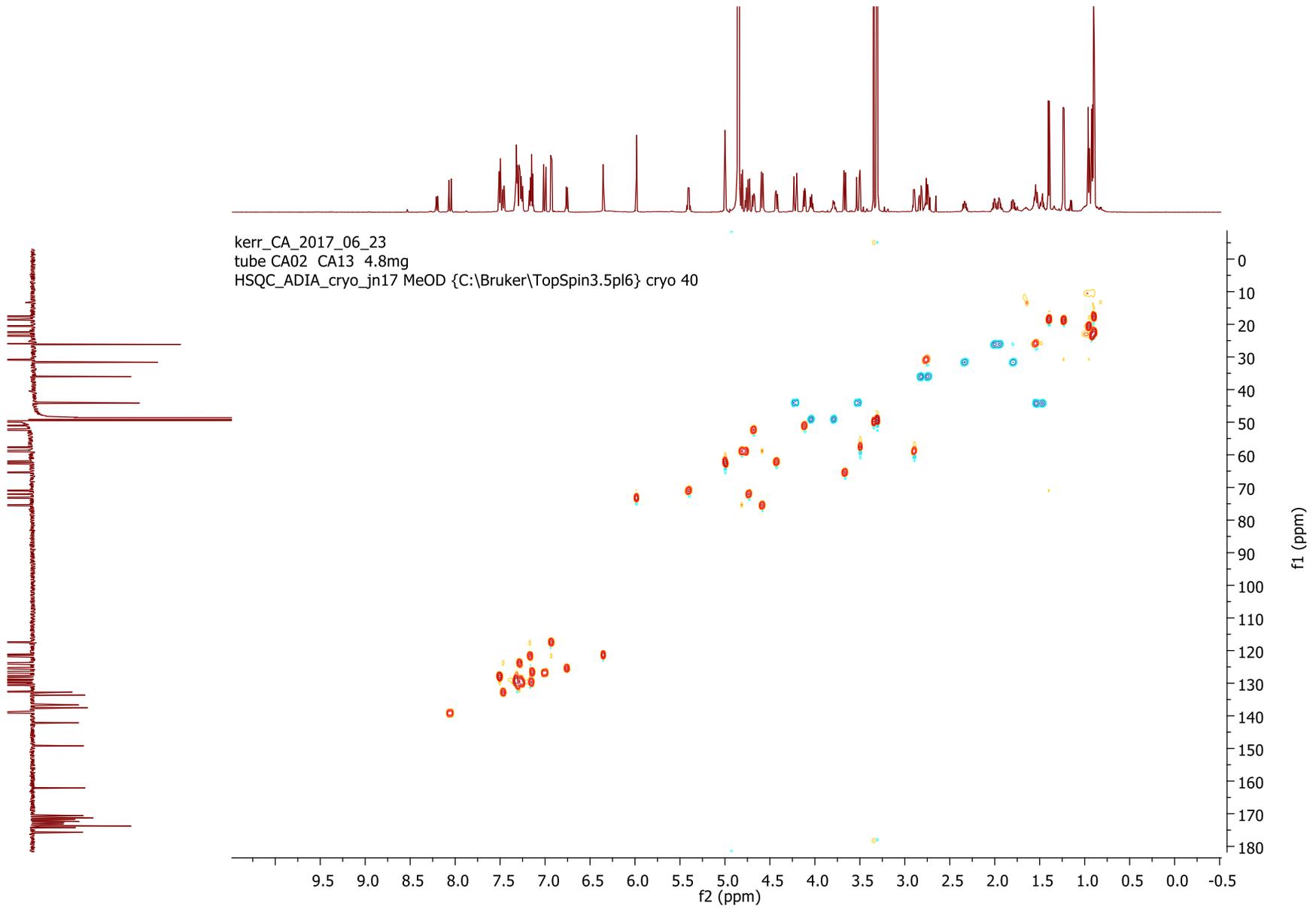
Anexo 6. Artículos publicados a la fecha.

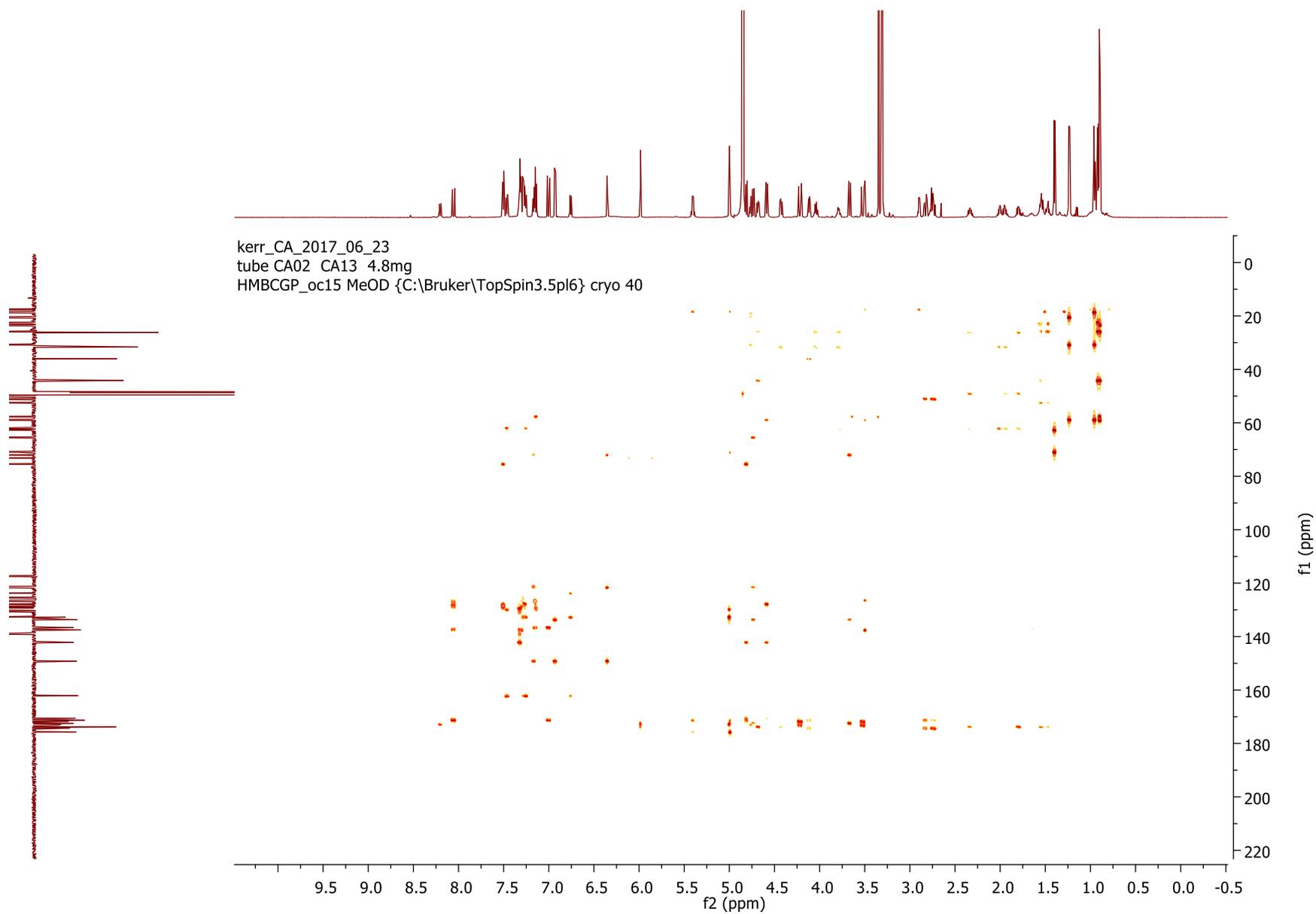
kerr_CA_2017_06_23
tube CA02 CA13 4.8mg
PROTON2D_cryo_oc15 MeOD {C:\Bruker\TopSpin3.5pl6} cryo 40













RESEARCH ARTICLE

Characterization of Actinobacterial Communities from Arauca River Sediments (Colombia) Reveals Antimicrobial Potential Presented in Low Abundant Isolates

Carolina Arango¹, Alejandro Acosta-Gonzalez¹, Claudia M. Parra-Giraldo², Zilpa A. Sánchez-Quitian², Russell Kerr³ and Luis E. Díaz^{1,*}

¹Universidad de La Sabana, Campus del Puente del Común, Km 7 Autopista Norte de Bogotá, Chia, Colombia

²Unidad de Investigación en Proteómica y Micosis Humanas, Pontificia Universidad Javeriana, Carrera 7 No. 40-62, Bogotá, Colombia

³University of Prince Edward Island, 550 University Avenue, Charlottetown, PE C1A 4P3, Canada

Received: February 22, 2018

Revised: May 15, 2018

Accepted: May 16, 2018

Abstract:

Introduction:

New strategies have been arisen to set a rapid and effective screening for selection of microorganism with bioactive potential. This study suggests that combination of physicochemical pretreatments and taxonomic dereplication of microbial collections through MALDI-TOF MS, facilitates the detection of low abundance actinobacteria with potential as a source of antimicrobial agents.

Material and Methods:

An unstudied microbial community from a tropical river sediment in Colombian Orinoquia is described, applying an extended cultivation strategy using physicochemical pretreatments, biological screenings and taxonomic dereplication through MALDI-TOF MS approach.

Results:

Actinobacteria-like isolates (790) were growth and their antimicrobial activity was assessed against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, Vancomycin-resistant *Enterococcus faecium*, extended-spectrum β -lactamase *Klebsiella pneumoniae*, and clinical isolates of *Cladosporium cladosporioides* and *Epicoccum nigrum*. Seventy-eight isolates, belonging to the Streptomycetaceae family according to 16S rDNA analysis were found to have antimicrobial activity and were categorized as low abundance actinobacteria by MALDI-TOF MS.

Conclusion:

The results suggest that combination of physicochemical pretreatments and taxonomic dereplication of microbial collections through MALDI-TOF MS, facilitates the detection of low abundance actinobacteria with potential as a source of antimicrobial agents.

Keywords: Actinobacteria, Antimicrobial, Bioprospecting, MALDI-TOF MS, Physicochemical pretreatments, Taxonomic dereplication.

1. INTRODUCTION

The continued and poorly controlled use of antimicrobial compounds has led to the emergence of resistant strains which have increased since the early 1960's [1]. Well-known examples of resistant bacterial strains are Methicillin

* Address correspondence to this author at the Universidad de La Sabana Autop. Norte Km. 7, Campus del Común, Chia, Colombia, Ext 25208, Tel: +57 1 8615555; Fax: +57 1 8615555; Email: luisdb@unisabana.edu.co



Draft Genome Sequence of *Streptomyces* sp. Strain RKCA744, Isolated from the Arauca River, Colombia

Christopher Cartmell,^a Alyssa L. Grunwald,^c Carolina Arango,^{bd} Noelle J. Duncan,^c Bradley A. Hattli,^{bc} Luis E. Diaz,^d Russell G. Kerr^{abc}

^aDepartment of Chemistry, University of Prince Edward Island, Charlottetown, PEI, Canada

^bDepartment of Biomedical Sciences, Atlantic Veterinary College, Charlottetown, PEI, Canada

^cNautilus Biosciences Croda, Charlottetown, PEI, Canada

^dUniversidad de La Sabana, Chia, Colombia

ABSTRACT *Streptomyces* sp. strain RKCA744 was isolated from sediment collected from the Arauca River, Colombia.

In continuing bioprospecting efforts to discover new bioactive natural products, sediment (ca. 400 g) was collected from the banks of the Arauca River located at 7.07263889°N, 70.82741667°W, at a water depth of 50 cm. The bacterium was isolated by dilution plating as described previously (1). BLASTN (v. 2.13.0) analysis of the full-length 16S rRNA gene sequence extracted from the genome sequence of *Streptomyces* sp. strain RKCA744 (1,527 bp) indicated that the closest match in the GenBank 16S rRNA gene sequence database was *Streptomyces hygrosopicus* (100% identity; accession number [NR_043379.1](https://doi.org/10.1093/nar/nq43379.1)) (2, 3). To further interrogate the biosynthetic potential of RKCA744 biosynthetic gene clusters (BGCs) within the genome of this organism, we obtained a draft whole-genome sequence.

Streptomyces sp. strain RKCA744 was cultured in Difco ISP2 broth at 30°C with shaking at 200 rpm. DNA was isolated using the DNeasy UltraClean microbial kit (Qiagen) following the manufacturer's protocol, and 16 µg of high-quality genomic DNA was obtained. Library preparation and Pacific Biosciences RS II DNA sequencing were performed by McGill University and the Génome Québec Innovation Centre using a standard PacBio protocol for sheared large-insert (20-kb) libraries (4) and a PacBio RS II single-molecule real-time (SMRT) platform with P4-C2 chemistry (Pacific Biosciences, USA). Sequencing was performed using one SMRT cell, which generated a total of 221,223 raw subreads (423,176,179 bp) with an average length of 1,913 bp and a GC content of 72.1%. The raw reads were filtered for quality using the SMRT Analysis software (version 2.3.0) (5) with a minimum subread length of 500, a minimum polymerase read quality of 0.75, and a minimum polymerase read length of 100. *De novo* genome assembly of the filtered reads was performed by the sequencing facility using the Hierarchical Genome Assembly Process (HGAP2)/Quiver protocol (5). Assembly resulted in the generation of 392 contigs with a total assembly length of 9,759,387 bp. The longest contig was 164,905 bp, the N_{50} was 40,528 bp, and sequencing coverage of the assembled genome was 43×.

The *Streptomyces* sp. RKCA744 draft genome was annotated using the Prokaryotic Genome Annotation Pipeline (6) yielding 7,860 predicted protein-coding sequences and 61 tRNAs (3 rRNA operons) from all contigs.

AntiSMASH (v. 6.1.1) was used to identify natural product BGCs. A total of 62 putative BGCs were identified and included putative siderophore (3), ectoine (2), butyrolactone (1), arylpolyene (1), homoserine lactone (1), terpene (6), nonribosomal peptide (NRP; 10), polyketide (PK; 24), and hybrid NRP/PK (8) BGCs. Several BGCs exhibited a

Editor: J. Cameron Thrash, University of Southern California

Copyright © 2022 Cartmell et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution 4.0 International License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

Address correspondence to Russell G. Kerr, rkerr@upel.ca.

The authors declare no conflict of interest.

Received 10 August 2022

Accepted 15 September 2022

Published 26 September 2022