

20. Productos Naturales Bioactivos y sus Aplicaciones

Búsqueda de nuevos antimicrobianos a partir de microorganismos del suelo

Raffaelli, Sofía; Hartmann, Stephane.

sraffaelli@fq.edu.uy; stephane.hartmann@ensiacet.fr

Orientadores: Alborés, Silvana; Vázquez, Álvaro

Facultad de Química

Universidad de la República

Resumen

A pesar de los grandes avances en la quimioterapia de las enfermedades infecciosas estas están lejos de ser controladas y más aún erradicadas, y son aún una de las principales causas de muerte en el mundo. Uno de los motivos de que esto suceda es la generación de resistencia, que puede darse por diversos medios, entre ellos la formación de comunidades microbianas, o biofilms, que les confieren resistencia y ventajas evolutivas.

El objetivo del trabajo es obtener nuevos compuestos antimicrobianos a partir de los metabolitos extracelulares de microorganismos del suelo. Los mismos son evaluados contra microorganismos patógenos en su estado plantónico y en forma de comunidades microbianas.

Para esto, se partió de caldos de cultivo de 13 microorganismos distintos. Se realizó una extracción del caldo de cultivo de los microorganismos con una resina de adsorción, posteriormente desorbida con acetato de etilo, a fin de obtener un

extracto de metabolitos con un rango amplio de polaridad.

Se evaluó la actividad de varios microorganismos del suelo utilizando las técnicas de Concentración Inhibitoria Mínima y Bioautografía, y se obtuvieron resultados prometedores de varios extractos contra patógenos humanos en su estado plantónico.

Se continuó trabajando con algunos extractos, y se comenzaron estudios en comunidades microbianas, procurando determinar la Concentración Inhibitoria de Biofilms, y obteniéndose buenos resultados en la actividad contra biofilms de *Candida albicans*.

Palabras clave: Antimicrobianos, Productos Naturales, Biofilms

Introducción

La terapéutica de las enfermedades infecciosas ha avanzado mucho desde el comienzo de su desarrollo, a principios del siglo XX. Sin embargo, las enfermedades infecciosas siguen siendo una de las

principales causas de muerte en el mundo. Esto se debe entre otros motivos, a la falta de una terapéutica adecuada, tanto sea por la falta de fármacos efectivos (para infecciones fúngicas o virales) como a la rápida aparición de resistencia que vuelve inefectivas las drogas existentes. Esto ha llevado a numerosas iniciativas para desarrollar programas colaborativos para enfrentar esta situación como el programa ESKAPE. Los microorganismos ESKAPE (Boucher *et al.*, 2009; Pendleton, Gorman y Gilmore, 2013) *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, y varias especies de *Enterobacter* son los patógenos que en la actualidad causan la mayoría de las infecciones hospitalarias de Estados Unidos y de manera efectiva "se escapan" de los efectos de los fármacos antibacterianos.

Similarmente a lo descripto en Salud Humana, en el área de Salud Animal las enfermedades infecciosas representan un gran problema sanitario y económico. El largo período entre que un animal adquiere una infección y los síntomas de la enfermedad aparecen lleva a que la infección se propague, dando lugar en muchos casos a enormes pérdidas en producción animal (Troncarelli *et al.*, 2013).

Por otro lado, en el área agrícola-alimentaria las pérdidas de productos

relacionadas con el ataque de plagas y enfermedades durante las etapas de pre y poscosecha son considerables (Serrano y Galindo, 2007). Las enfermedades no sólo tienen el potencial de destruir enteramente las cosechas; aun en los casos en que no causan pérdidas totales, por lo general reducen en forma crónica el rendimiento de la mayoría de los cultivos, obligan a tomar medidas de combate que aumentan los costos de producción, y afectan la calidad y la durabilidad de los productos cosechados, de manera que constituyen una de las principales causas de inestabilidad en la empresa agrícola y del déficit alimentario mundial. A pesar de las mejoras en la capacidad de diagnóstico y en la disponibilidad de tecnologías para el control de estas enfermedades, ellas aun son capaces de causar enormes pérdidas, con un importante impacto económico y social (Vurro, Vonciani y Vannacci, 2010). A pesar de que el estudio de microorganismos en su estado plantónico ha sido la forma clásica de trabajo, actualmente se acepta que la mayoría de las bacterias se encuentran en la naturaleza como parte de comunidades (o biofilms), lo cual les confiere ventajas evolutivas y competitivas. Es sabido que aproximadamente el 99% de las bacterias existe como biofilms y el NIH reporta que un 65% de las enfermedades bacterianas y un 80% de las crónicas en humanos son producidas por ellos (Mah y O'Toole, 2001; Jamal *et al.*, 2018). Por esto, es de creciente importancia el estudio de

microorganismos patógenos en el contexto de sus comunidades.

Todos estos datos refuerzan la necesidad de continuar con la búsqueda de compuestos con actividad antimicrobiana con nuevas estructuras y mecanismos de acción novedosos.

El rastreo de actividad de fuentes naturales es la forma tradicional de trabajo en el área de antimicrobianos y se ha mostrado extraordinariamente exitosa llevando al desarrollo de la quimioterapia antiinfecciosa moderna. Utiliza técnicas sencillas, probadas y normalizadas a lo largo de los años en innumerables laboratorios

La eficacia de los productos naturales como antibacterianos probablemente se deba a que han evolucionado para ser activos, dando a los organismos que los producen una ventaja selectiva en el ambiente (Bologna, Ursu, Tudor, Melacon y Tegos, 2013). Como carecen de un sistema inmune, dependen de mecanismos de defensa químicos, por lo que son una fuente importante de metabolitos antimicrobianos: de todos los productos naturales reportados, entre un 20 y un 25% han demostrado tener actividad biológica, y de estos un 10% proviene de microorganismos (Demain y Sánchez, 2009).

El estudio de metabolitos de fuentes naturales capaces de atacar biofilms es un campo que ha demostrado resultados prometedores (Beoletto, Oliva, Marioli, Carezzano y Demo, 2017; Song, Xia, He y

Zhang, 2017), comprobándose la actividad de una gran variedad de moléculas capaces de inhibir el crecimiento de los biofilms, incluyendo estudios que han llegado ya a fases clínicas (Arweiler *et al.*, 2011; Satthanakul *et al.*, 2015). Estas moléculas actúan de varias maneras, ya sea como antibióticos capaces de penetrar las barreras físicas del biofilm, desestabilizantes de la matriz extracelular, inhibidores de las moléculas que actúan en el quorum sensing, inductores de estrés oxidativo, etc.

En el campo de los productos naturales contra biofilms, los metabolitos de microorganismos han sido aún poco explotados, en comparación con los metabolitos provenientes de plantas, algas y esponjas marinas. Sin embargo, es un campo en desarrollo que ha mostrado resultados prometedores en el descubrimiento de nuevas formas de atacar o prevenir el crecimiento de comunidades microbianas (Papa *et al.*, 2015; Vacheva *et al.*, 2012; Viju, Satheesh y Punitha, 2016; Zhou *et al.*, 2017).

Dado que los metabolitos conocidos a la fecha representan una pequeña fracción de la diversidad metabólica, el estudio de organismos menos estudiados abre grandes posibilidades de encontrar nuevas moléculas de interés.

Este trabajo se basa en el estudio de cepas de microorganismos del suelo aisladas en Uruguay, que son consideradas de interés económico para otras aplicaciones biotecnológicas, como

productoras de metabolitos con actividad antimicrobiana.

Objetivos

- ▶ Evaluar la capacidad antimicrobiana de los metabolitos de cepas microbianas nativas
- ▶ Identificar y caracterizar compuestos con actividad antimicrobiana a partir de dichos extractos.
- ▶ Estudiar la capacidad de estos extractos y compuestos de inhibir el crecimiento de biofilms microbianos

Materiales y Métodos

Se partió de medio líquido donde fueron cultivados distintos microorganismos del suelo.

La extracción de los metabolitos extracelulares se realizó mediante adsorción sobre una resina polimérica en batch, y posterior elución con metanol y acetato de etilo. La fracción eluida con acetato de etilo se secó mediante evaporación a vacío.

A partir del extracto seco, se realizó la evaluación de la actividad antimicrobiana contra diversos patógenos, mediante el ensayo de determinación de concentración inhibitoria mínima (CIM). Para esto, se realizaron diluciones seriadas de los extractos en microplaca, y se inocularon con una suspensión estandarizada de células, según el método de Eloff (1998). Se incubaron durante un tiempo adecuado y se evaluó el crecimiento (Fig. 1)

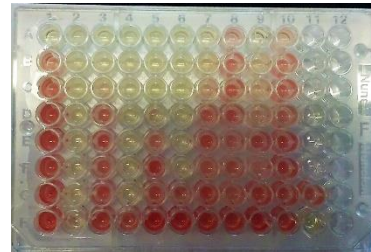


Figura 1. Ensayo de Concentración Inhibitoria Mínima Para aquellos extractos que presentaron actividad contra microorganismos, se realizó una evaluación de la naturaleza de sus compuestos. Para esto, se realizaron varias técnicas de cromatografía en capa fina.

Con el fin de determinar los compuestos responsables de la actividad, se utilizó una técnica de bioautografía, según el método de Rahalison, Hamburger, Hostettman, Monod y Frenck (1991). Se desarrolló una cromatografía en capa fina. La placa se colocó dentro de una placa de Petri y se vertió sobre ella agar fundido, previamente inoculado con el microorganismo de interés (Fig. 2). Luego se determinó el desplazamiento de los compuestos que inhiben el crecimiento a lo largo de la placa y eso se comparó con diferentes reveladores para placas finas, pudiendo obtenerse una idea de la

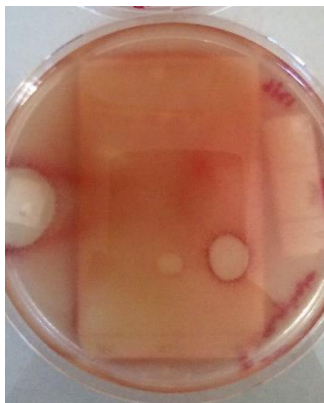


Figura 2. Ensayo de bioautografía, mostrando halo de inhibición del crecimiento para el control positivo (izquierda) y sobre la placa de TLC.

naturaleza de los compuestos responsables de la actividad.

A partir de los datos obtenidos, se realizó un fraccionamiento bio guiado mediante técnicas de cromatografía líquida en columna y determinación de la CIM de las fracciones obtenidas.

Para la muestra que demostró mejores resultados de actividad antimicrobiana, se realizaron estudios de actividad contra biofilms de *Candida albicans* y

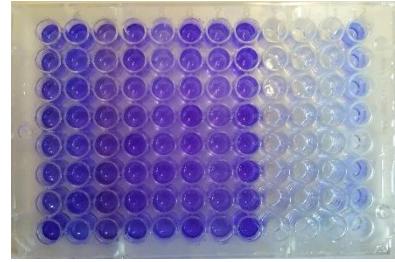


Figura 3. Ensayo de erradicación de biofilms, mostrando la tinción de las células en los biofilms formados y la ausencia de color en el control negativo

Staphylococcus aureus. Esto se realizó mediante una adaptación de la técnica reportada en Marioni, da Silva, Cabrera, Montoya y Paraje (2016). Para *S. aureus* se incubó una microplaca con una suspensión estandarizada del microorganismo en caldo nutriente, durante 24hs. Para *C. albicans*, se realizó un pretratamiento de la placa con suero fetal bovino previo a la incubación durante 24 o 48hs con una suspensión estandarizada del microorganismo en PDB. Se incubó nuevamente 24hs en presencia de los tratamientos correspondientes. Luego de esto, se tiñen las células adheridas a la placa con cristal violeta 1%. Este se resuspende con una solución de EtOH:Acetona (70:30) y se mide absorbancia a 560nm (Fig. 3). Se definen las Unidades de Biomasa de Biofilms (UBB) como diez veces la absorbancia.

Resultados y Discusión

Se realizó un screening de la actividad antimicrobiana de 13 extractos distintos contra hongos y bacterias patógenas. Para todos ellos se encontró una actividad significativa contra uno o más de los microorganismos en estudio (se considera

Tabla 2. Concentración Inhibitoria Mínima de extractos vs. Bacterias ESKAPE

Muestras	Microorganismo productor	Concentración Inhibitoria Mínima (µg/mL)					
		<i>S. aureus</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>E. cloacae</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>K. pneumoniae</i>	<i>A. baumannii</i>
Blanco		>2500	500	>2500	2500	>2500	>2500
B15	<i>Bacillus butanolivorans</i>	312	625	2500	/	/	>2500
B63		625	312	2500	625	2500	>2500
B68		1250	312	2500	2500	2500	>2500
B44	<i>Bacillus pumilis/safensis</i>	312	625	2500	>2500	>2500	>2500
B55		1250	312	2500	>2500	>2500	>2500
B7	<i>Lysinibacillus fusiformis</i>	625	117	>2500	/	/	>2500
B19		625	312	2500	>5000	/	2500
B139		1250	312	2500	2500	2500	>2500
B172		625	312	2500	1250	2500	2500
B95		1250	312	>2500	2500	>2500	2500
ILBB 162	<i>Serratia sp</i>	156	62	76	>2500	>2500	/
ILBB 145	<i>Serratia ureilytica</i>	1250	250	1250	>2500	>2500	/
ILBB 219		1250	125	2500	>2500	>2500	/

significativa una CIM ≤ 320 µg/mL) (Tabla 1 y 2).

Para aquellos extractos que presentaron una actividad significativa contra varios microorganismos de interés, se realizaron

proveniente del medio de cultivo. Se realizó el cultivo de la bacteria en medios de cultivo con distintas concentraciones de extracto de levadura, obteniéndose una concentración ideal, que minimiza la

Tabla 1. Concentración Inhibitoria Mínima de extractos vs. Microorganismos fitopatógenos

Muestras	Microorganismo productor	Concentración Inhibitoria Mínima (µg/mL)			
		<i>X. vesicatoria</i>	<i>R. stolonifer</i>	<i>A. alternata</i>	<i>F. graminearum</i>
Blanco		>2500	2500	625	1250
B15	<i>Bacillus butanolivorans</i>	>2500	2500	/	1250
B63		1250	2500	625	/
B68		/	2500	/	/
B44	<i>Bacillus pumilis/safensis</i>	/	2500	/	2500
B55		/	/	/	2500
B7	<i>Lysinibacillus fusiformis</i>	156	312	312	156
B19		/	/	/	1250
B139		/	/	/	2500
B172		>2500	2500	1250	1250
B95		>2500	2500	/	2500
ILBB 162	<i>Serratia sp</i>	78	1250	1250	156
ILBB 145	<i>Serratia ureilytica</i>	625	1250	625	/
ILBB 219		1250	2500	312	312

estudios más profundos de su naturaleza química y sus posibles compuestos activos.

Particularmente interesante resultó el extracto denominado ILBB162, proveniente de una bacteria identificada como *Serratia sp*. Al estudiar su composición química, se observó gran interferencia de extracto de levadura,

interferencia sin comprometer la producción de compuestos activos.

Para comenzar la separación y purificación de compuestos activos, se realizaron técnicas de fraccionamiento bioquímico. Se seleccionó *Staphylococcus aureus* para realizar los ensayos de actividad derivados de los distintos procesos de separación.

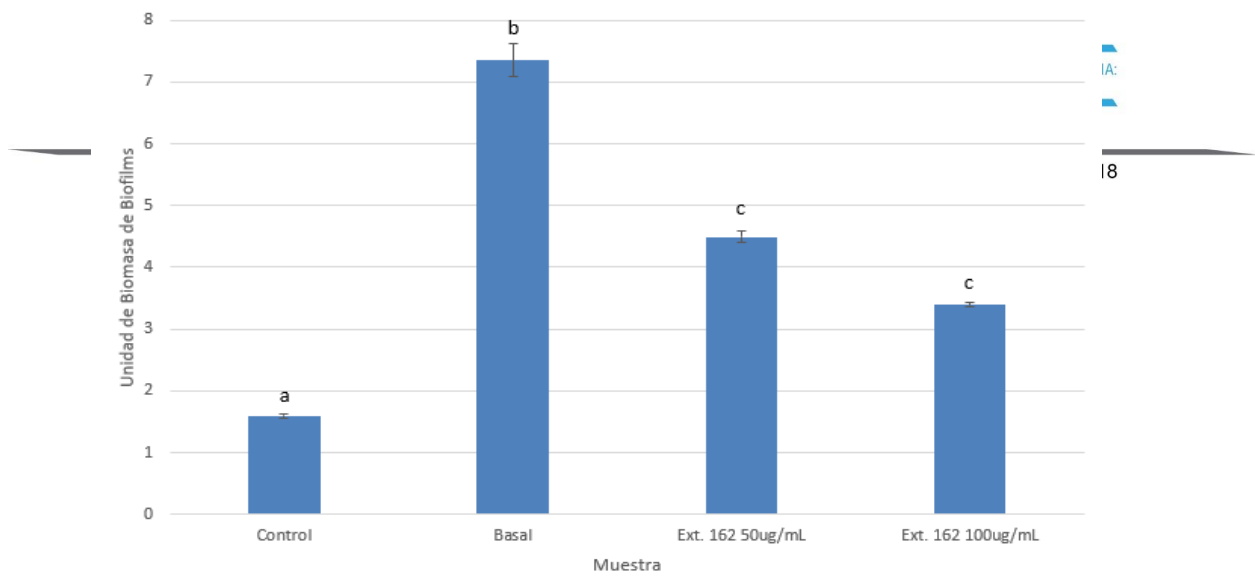


Figura 4. Inhibición de biofilms de *C. albicans* por el extracto ILBB162

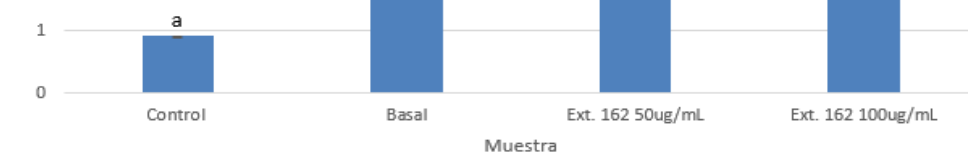


Figura 5. Inhibición de biofilms de *S. aureus* por el extracto ILBB162

Se realizó un primer fraccionamiento mediante técnica de cromatografía líquida a vacío, utilizando como solvente distintas mezclas de CH₂Cl₂:MeOH, obteniéndose 11 fracciones. De estas, tres fracciones presentaron actividad contra *S. aureus*.

Se continúa trabajando con esas fracciones, utilizando técnicas de cromatografía líquida, a fin de poder aislar los compuestos responsables de la actividad.

Además, se realizaron ensayos de erradicación de biofilms de *C. albicans* y *S. aureus*.

Para biofilms de *C. albicans*, se obtuvo una reducción de 53% de biomasa al tratarlo con una solución de 100ug/mL del extracto, y de 39% al tratarlo con una solución de 50ug/mL del extracto (Fig. 4). Dado que no se observó una actividad importante de este extracto contra células plantónicas de

C. albicans, resulta interesante profundizar estudios sobre el mecanismo

de este extracto para erradicar biofilms. Para biofilms de *S. aureus* se obtuvo una reducción de 61% de biomasa al tratarlo con una solución de 100 ug/mL y una reducción de biomasa de 44% al tratarlo con una solución de 50ug/mL de extracto (Fig. 5).

Conclusiones

Se realizó la extracción de metabolitos extracelulares de varios microorganismos del suelo y se demostró su capacidad antimicrobiana contra uno o más microorganismos patógenos de interés.

Se demostró la capacidad del extracto ILBB162 de inhibir biofilms de *C. albicans* y de *S. aureus*.

Se realizaron los primeros pasos de fraccionamiento de las muestras de interés, a fin de poder aislar los compuestos con actividad antimicrobiana.

Bibliografía

- Arweiler, N.B., Pergola, G., Kuenz, J., Hellwig, E., Sculean, A. y Ausschill, T.M. (2011) Clinical and antibacterial effect of an anti-inflammatory toothpaste formulation with *Scutellaria baicalensis* extract on experimental gingivitis. *Clin. Oral Investig.*, 15(6), 909-913.
- Beoletto, V., Oliva, M., Marioli, J., Carezzano, M. y Demo, M. (2016). Antimicrobial Natural Products against Bacterial Biofilms. En K. Kon y M. Rai (Ed.), *Antibiotic Resistance. Mechanisms and New Antimicrobial Approaches* (pp.291-305) Maharashtra, India: Elsevier.
- Bologna, C., Ursu, O., Tudor, O., Melacon, C. y Tegos, G.P. (2013). Emerging trends in the discovery of natural product antibacterials. *Current Opinion in Pharmacology.* 13, 678–687.
- Boucher, H.W., Talbot, G.H., Bradley, J.S., Edwards Jr., J.E., Gilbert, D., Rice, L.B., Scheld, M., Spellberg, B. y Bartlett, J. (2009) Bad bugs, no drugs: No ESKAPE! An update from the *Infectious Diseases Society of America Clinical Infectious Diseases*, 48 (1), 1-12.
- Demain, A. y Sanchez, S. (2009). ChemInform Abstract: Microbial Drug Discovery: 80 Years of Progress. *ChemInform*, 40(19), 5-16.
- Eloff, J.N. (1998) A sensitive and quick microplate method to determine the minimal inhibitory concentration of plant extracts for bacteria. *Planta Medica*, 64, 711-713.
- Jamal, M., Ahmad, W., Andleeb, S., Jalil, F., Inram, M., Nawaz, M., Hussain, T., Ali, M., Rafiq, M. y Kamil, M. (2018). Bacterial biofilm and associated infections. *Journal of Chinese Medical Association*, 81(1), pp.7-11.
- Mah T-FC y O'Toole GA. (2001) Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. *Trends Microbiol.* 9, 34–39.
- Marioni, J., da Silva, M., Cabrera, J., Montoya, S. y Paraje, M. (2016). The anthraquinones rubiadin and its 1-methyl ether isolated from *Heterophyllaea pustulata* reduces *Candida tropicalis* biofilms formation. *Phytomedicine*, 23(12), 1321-1328.
- Papa, R., Selan, L., Parrilli, E., Tilotta, M., Sannino, F., Feller, G., Tutino, M. y Artini, M. (2015). Anti-Biofilm Activities from Marine Cold Adapted Bacteria Against *Staphylococci* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Frontiers in Microbiology*, 6, 1333.
- Pendleton, J.N., Gorman, S.P. y Gilmore, B.F. (2013) Clinical relevance of the ESKAPE pathogens. *Expert Review of Anti-Infective Therapy*, 11 (3), 297-308.
- Rahalison, L., Hamburger, M., Hostettman, K., Monod, M. y Frenck, E. (1991). A bioautographic agar overlay method for the detection of

- antifungal compounds from higher plants. *Phytochemical Analysis*, 2, 199-203.
- Satthanakul, P.; Taweechaisupapong, S.; Paphangkorakit, J.; Pesee, M.; Timabut, P. y Khunkitti, W. (2015) Antimicrobial effect of lemongrass oil against oral malodour micro-organisms and the pilot study of safety and efficacy of lemongrass mouthrinse on oral malodour. *J. Appl. Microbiol.*, 118(1), 11-17
- Serrano-Carreón, L. y Galindo, E. (2007). Control biológico de organismos fitopatógenos: un reto multidisciplinario. *Ciencia* 58, 77-88.
- Song, X., Xia, Y., He, Z. y Zhang, H. (2017). A Review of Natural Products with Anti-Biofilm Activity. *Current Organic Chemistry*, 22(8), 789-817.
- Troncarelli M, Mello Brandão H, Gern J, Sá Guimaraes A y Langoni H. (2013) Nanotechnology and Antimicrobials in Veterinary Medicine. En A. Méndez-Vilas (Ed.). *Microbial pathogens and strategies for combating them: science, technology and education* (pp. 543-556), 4 Badajoz, España
- Vacheva, A., Georgieva, R., Danova, S., Mihova, R., Marhova, M., Kostadinova, S., Vasileva, K., Bivolarska, M., & Stoitsova, S. (2012). Modulation of *Escherichia coli* biofilm growth by cell-free spent cultures from lactobacilli. *Open life sciences*, 7(2), 219-229
- Viju, N., Satheesh, S. y Punitha, S. (2016). Antibiofilm and antifouling activities of extracellular polymeric substances isolated from the bacteria associated with marine gastropod *Turbo* sp. *Oceanological and Hydrobiological Studies*, 45(1), 11-19.
- Vurro, M., Bonciani, B. y Vannacci, G. (2010). Emerging infectious diseases of crop plants in developing countries: impact on agriculture and socio-economic consequences. *Food Security* 2, 113–32.
- Zhou, J., Bi, S., Chen, H., Chen, T., Yang, R., Li, M., Fu, Y. y Jia, A. (2017). Anti-Biofilm and Antivirulence Activities of Metabolites from *Plectosphaerella cucumerina* against *Pseudomonas aeruginosa*. *Frontiers in Microbiology*, 8, 769.

Agradecimientos

PEDECIBA Química, Agencia Nacional de Investigación e Innovación (ANII), Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria (INIA), Comisión Académica de Posgrado (CAP-UDELAR).

Financiamiento

Proyecto ANII FCE-3-2016-126616