

Identificación de péptidos antimicrobianos a partir de cepas del género *Streptomyces* para su producción, análisis y caracterización.

O. F. Hernández-Saldaña¹, J. E. Barboza-Corona², L. E. Casados Vázquez^{2*}.

1 Posgrado en Biociencias, División de Ciencias de la Vida, Universidad de Guanajuato Campus Irapuato-Salamanca. **2** Departamento de Alimentos División de Ciencias de la vida, Universidad de Guanajuato Campus Irapuato-Salamanca.

*Laboratorio de biotecnología y microbiología molecular. Ex-hacienda El Copal km. 9, carretera Irapuato-Silao; A.P. 311, C.P: 36500, Irapuato, Gto. México. Cel. 4621659334, correo electrónico: edith.casados@gmail.com

RESUMEN:

Streptomyces es un género de bacterias Gram-positivas capaces de producir compuestos denominados metabolitos secundarios. La mayor producción de estos ocurre en la fase de deceleración y estacionaria de las bacterias. Entre éstos se encuentran los péptidos antimicrobianos, llamados bacteriocinas por ser producidos por bacterias, son péptidos de defensa que varían en el número de aminoácidos que los componen, y están involucrados en mecanismos de acción contra-patógenos. Su uso como antimicrobiano representa una alternativa con ventajas sobre otros compuestos en diversas áreas de interés. Aquí presentamos un estudio de cómo las condiciones de crecimiento, diferentes medios y temperaturas pueden afectar la producción de bacteriocinas en cepas del género *Streptomyces*. Se demostró que el medio específico YEME fue mejor para la producción de posibles bacteriocinas, teniendo buenos resultados en ambas temperaturas utilizadas (28°C y 37°C), mientras que el caldo de soya tripticaseína mostró un mayor crecimiento celular pero menos actividad y el medio mínimo mostró poco crecimiento y actividad. Los extractos crudos se fraccionaron con sulfato de amonio; las mejores concentraciones para obtener más actividad antimicrobiana fueron 50 y 60%. Estos precipitados mostraron buena estabilidad a temperatura y rangos de pH, pero se detectó pérdida de actividad tras tratamientos con enzimas proteolíticas.

Palabras clave: *Streptomyces*, péptidos antimicrobianos, bacteriocinas, metabolitos secundarios.

ABSTRACT:

Streptomyces is a genus of Gram-positive bacteria available to produce compounds called secondary metabolites. The greater production of these occurs in the deceleration and stationary phase of the bacteria. Among these are antimicrobial peptides, called bacteriocins when they are produced by bacteria, and are defense peptides with a varying number of amino acids in their structure. They are involved in mechanisms of action against the pathogen. Its use represents an alternative with advantages over other compounds in several areas of interest. Here we present a study of how growth conditions such as different media and temperatures can affect the production of bacteriocins from different strains of *Streptomyces*. It was demonstrated that the specific YEME medium was better for the production of bacteriocins-like substances, having good results in both temperatures used (28°C and 37°C), while trypticase soy broth was shown to produce higher cell growth but less activity and the minimal medium showed little growth and activity. The crude extracts were fractionated with ammonium sulfate; the best concentrations for obtaining more antimicrobial activity were 50 and 60%. These precipitates showed good stability at temperature and pH ranges, but loss of activity was detected after proteolytic enzyme treatments.

Keywords: *Streptomyces*, antimicrobial peptides, bacteriocins, secondary metabolites.

INTRODUCCIÓN

Streptomyces es un género de bacterias Gram-positivas capaces de crecer en diversos ambientes, con una forma similar a la mostrada por hongos filamentosos (Ōmura y col., 2001); La propiedad más interesante e importante de las cepas de *Streptomyces* es su capacidad para producir metabolitos secundarios tales como compuestos antifúngicos, antivirales, antitumorales y antihipertensivos, además también producen una gran cantidad de enzimas extracelulares de interés en el área industrial (Demain, 1999 Li y Townsend, 2006). El mayor número de estos compuestos se produce por el metabolismo secundario, que es un proceso en el que no se forman productos esenciales para el organismo productor. Sin embargo, los productos a menudo originan ventajas ecológicas y por lo tanto confieren mayor competitividad biológica, y se expresan principalmente en la fase de deceleración y en la fase estacionaria (Kirk y col., 2000; García, 2010). Algunos de estos metabolitos secundarios son los péptidos antimicrobianos (AMP), que son péptidos catiónicos de defensa del huésped, con un número variable de aminoácidos en su estructura (de cinco a cien), involucrados en mecanismos complejos de acción relacionados con la interacción con el patógeno a través de su membrana, o afectando a objetivos internos (Téllez y Castaño, 2010; Brown y Hancock, 2006). El uso de AMP representa una alternativa con ventajas sobre otros compuestos en varias áreas de interés humano, por ejemplo, se ha propuesto el uso de algunos péptidos como potencial terapéutico en el tratamiento de quemaduras y úlceras (Murphy y col., 1993) Para el control de enfermedades infecciosas como la mastitis en el área veterinaria (Islas-Rodríguez y col., 2009) o su uso como conservantes en la industria alimentaria (Hernández, 2010). Se han desarrollado pocos estudios sobre la producción de AMP (llamados bacteriocinas cuando son producidos específicamente por bacterias) a partir de cepas de *Streptomyces*. Aquí presentamos un estudio de cómo las condiciones de crecimiento, tales como diferentes medios y temperaturas podrían afectar la producción de probables bacteriocinas a partir de diferentes cepas del género *Streptomyces*. Éstos se ensayaron frente a varias bacterias patógenas de interés en la industria alimentaria, cuya actividad se caracterizó parcialmente bajo diferentes condiciones de temperatura (50-120°C), pH y presencia de enzimas proteolíticas. Se demostró que el medio específico YEME (Shepherd y col., 2010) era mejor para la producción de probables bacteriocinas, incluso con buenos resultados en ambas temperaturas utilizadas (28 °C y 37 °C), mientras que el caldo de soya tripticaseína mostró un mayor crecimiento celular pero menos actividad antimicrobiana y en mínimo medio hubo poco crecimiento y poca actividad. Las bacteriocinas semi-purificadas mostraron buena estabilidad a altas temperaturas, pero se detectó pérdida de actividad cuando se realizaron tratamientos con enzimas proteolíticas, demostrando así que los compuestos responsables de la inhibición antibacteriana son de naturaleza proteica, probablemente bacteriocinas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Identificación de especies del género *Streptomyces* con actividad antibacteriana.

Esporas conservadas en glicerol al 10% de diferentes cepas del género *Streptomyces* (*S. bottropensis*, *S. griseus*, *S. violaceoruber*, *S. avermitilis*, *S. nigrescens*, *S. hygroscopicus* y *S. CC48*) fueron cultivadas en medio líquido YEME a 28°C y 200 rpm, por aproximadamente 8 días (Orsaria y col., 1998). Una vez alcanzada esta fase, se centrifugaron a 7000 rpm por 15 min y se conservó el sobrenadante, éste fue probado por el ensayo de difusión de pozos (Barboza y col., 2007) contra diferentes bacterias patógenas a manera de bacterias indiciadoras (*Micrococcus luteus*, *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*, *Streptococcus pyogenes*,

Shigella sonnei, *Salmonella spp.*, *Proteus vulgaris*, *Shigella flexneri*, *Bacillus cereus*, *Enterobacter cloacae*, *Listeria monocytogenes*, *Listeria innocua* y *Staphylococcus xylosum*).

Análisis de las condiciones óptimas para la producción de compuestos antimicrobianos.

Se realizaron curvas de crecimiento bajo diferentes condiciones, las cuales se explican en la Tabla I. Cada 24 h se tomaron muestras por duplicado, una para monitorear la densidad óptica a 600 nm y la otra para ser centrifugada a 13,000 rpm por 2 min y el sobrenadante probado en pozos contra *S. flexneri* como bacteria indicadora para conocer la actividad; posteriormente se calculó la actividad específica tras cuantificar la concentración de proteína en los sobrenadantes.

Tabla I. Condiciones de cultivo empleadas en las curvas de crecimiento			
	Medio de cultivo	Temperatura (°C)	Velocidad de agitación (rpm)
A	YEME ¹	28	200
B	TSB ²	28	200
C	NMMP ³	28	200
D	YEME	37	200
E	TSB	37	200

¹**YEME:** Medio específico para el género *Streptomyces*.
²**TSB:** Caldo soja tripticaseína.
³**NMMP:** Medio mínimo para el género *Streptomyces*.

Fraccionamiento con sulfato de amonio.

Las cepas *Streptomyces* fueron cultivadas bajo las mejores condiciones determinadas por el ensayo de análisis de las condiciones para producción de compuestos antimicrobianos. Los cultivos fueron luego centrifugados a 5000 rpm por 15 min, para conservar el sobrenadante y desechar la pastilla.

El fraccionamiento se comenzó con una saturación de sulfato de amonio del 30%. Se dejó precipitando a temperatura ambiente por 2 h en agitación, después se centrifugó a 10,000 rpm por 30 min y se resuspendieron las proteínas precipitadas en buffer de fosfatos 100 mM pH 6.8. Posteriormente al sobrenadante se le agregó el sulfato de amonio necesario para alcanzar el 40% de saturación y se repitió el proceso. Lo mismo se hizo para las saturaciones al 50, 60, 70 y 80%. Todas las fracciones que se obtuvieron fueron luego dializadas en buffer de fosfatos 100 mM durante una noche a 4°C, usando membranas con corte de 3 kDa. Finalmente las fracciones fueron cuantificadas por método de Bradford (la cuantificación se llevó a cabo de acuerdo a las especificaciones del fabricante BIO-RAD Quick Start TM Bradford 1x Dye Reagent) y probadas en pozos contra la bacteria indicadora *S. flexneri*.

Concentración mínima de actividad.

A partir del extracto crudo concentrado se realizaron diluciones seriales (1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32) y estas fracciones diluidas fueron probadas por método de difusión de pozos contra la bacteria indicadora *S. flexneri*. Se midió el halo de inhibición y se determinó la concentración

mínima que mostró inhibición tras haber realizado una cuantificación por el método de Bradford.

Tratamiento con enzimas proteolíticas.

Ya que se determinó la concentración mínima, se seleccionó una concentración que nos permitiera ver disminución de la actividad inhibitoria. Se diluyó el extracto crudo a esa concentración y 90 µL de cada extracto diluido fueron tratados con proteinasa K, proteasa, tripsina y quimiotripsina, cada uno a una concentración final de 1 mg/mL. Las reacciones se incubaron a 37°C por 2 h. Las muestras tratadas fueron probadas por ensayo de pozos contra la bacteria indicadora *S. flexneri*, usando como controles las diluciones sin tratar y las soluciones de las enzimas a la misma concentración (Barboza y col., 2007).

Efecto de la temperatura.

Alícuotas de los extractos crudos en dilución 1:2 en base a las concentraciones determinadas anteriormente fueron incubados a diferentes temperaturas (30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100 y 120°C) por 10 min y probadas en prueba de pozos contra *S. flexneri* como bacteria indicadora.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se logró detectar actividad de cuatro de las siete cepas de *Streptomyces* que fueron probadas sobre varias bacterias patógenas; estas fueron *S. bottropensis*, *S. griseus*, *S. violaceruber* y *S. nigrescens*. Esta prueba también permitió seleccionar una bacteria indicadora para usar en posteriores pruebas, siendo seleccionada *S. flexneri* debido a que fue de las bacterias con mayor susceptibilidad y a la vez fue sensible a los sobrenadantes de las cuatro *Streptomyces* activas. Por otro lado, en la optimización de la producción de compuestos antimicrobianos la mejor condición de producción en general sobre las cepas fue la denominada condición A, pues a pesar de que el crecimiento obtenido es más bajo en comparación con algunas otras condiciones como la B y E (datos no mostrados), la actividad específica es más alta (Fig. 1), con excepción de la cepa *S. griseus* donde la mayor actividad se detectó en la condición D. Por su parte la condición C, no muestran ni buen crecimiento ni buena producción de compuestos antimicrobianos. Para su precipitación se determinó que cada una de las cepas requería una saturación de sulfato de amonio determinada, siendo del 40% para *S. bottropensis*, un 50% para *S. griseus* y del 60% para *S. violaceruber* y *S. nigrescens*. A estos precipitados se les determinó una concentración mínima de actividad y se les sometió a tratamientos con diferentes enzimas proteolíticas, tras los que se detectó pérdida de actividad, demostrando su naturaleza proteica. La actividad se conserva tras los tratamientos a altas temperaturas, lo que indica una buena termoestabilidad.

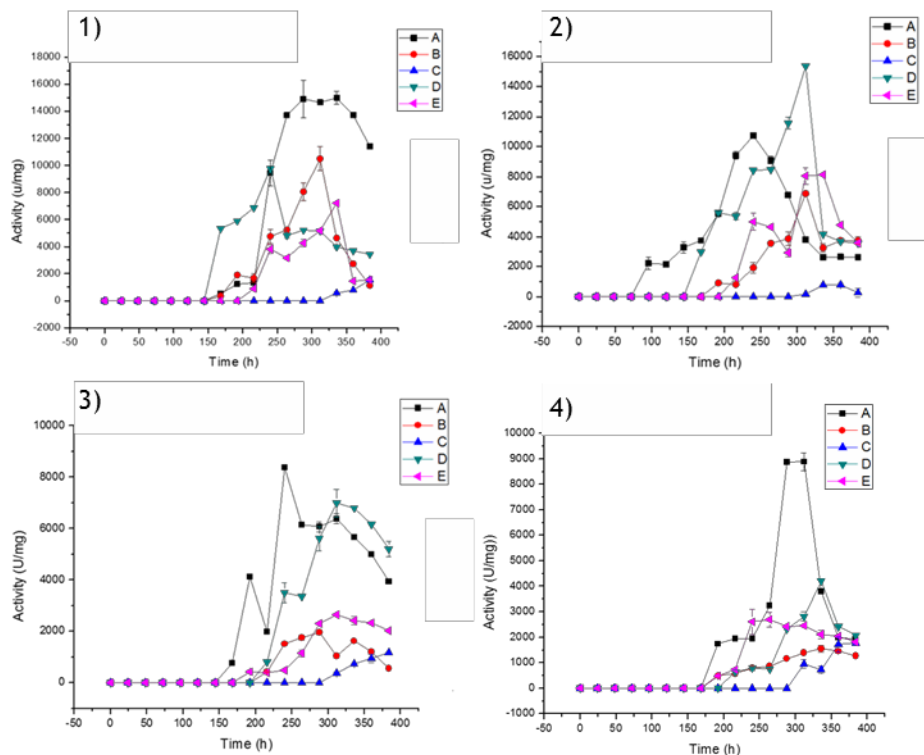


Figura 1. Curvas de actividad específica (U/mg) en relación al tiempo de las diferentes cepas del género *Streptomyces* marcadas como 1) *S. bottropensis*, 2) *S. griseus*, 3) *S. violaceuber* y 4) *S. nigrescens*. Condiciones de cultivo marcadas como A: medio YEME, 28°C y 200 rpm, B: medio TSB, 28°C y 200 rpm, C: medio mínimo NMMP, 28°C y 200 rpm, D: medio YEME, 37°C y 200 rpm, E: medio TSB, 37°C y 200 rpm.

CONCLUSIONES

Se identificaron cepas del genero *Streptomyces* con actividad antimicrobiana; además se determinaron las condiciones de crecimiento que propician una mayor producción de compuestos antimicrobianos para las diferentes cepas (condiciones A y D), cuyo factor común es el uso del medio específico YEME en el cultivo. Así mismo se determinó la naturaleza proteica de dichos compuestos, basados en la inhibición de actividad tras tratamientos enzimáticos, permitiendo así corroborar el objetivo del trabajo. Las bacteriocinas obtenidas demostraron además buena tolerancia a altas temperaturas.

BIBLIOGRAFÍA

Barboza-Corona, J. E., Vázquez-Acosta, H., Bideshi-Dennis, K., & Salcedo-Hernández, R. (2007). Bacteriocin-like inhibitor substances produced by Mexican strains of *Bacillus thuringiensis*. *Archives of Microbiology*, 187, 117–126.

Brown, K. L., & Hancock, R. E. (2006). Cationic host defense (antimicrobial) peptides. *Current Opinion in Immunology*, 18, 24–30.

Demain, A. L. (1999). Pharmaceutically active secondary metabolites of microorganisms.

Applied Microbiology and Biotechnology, 52, 455–463.

García, A. Y. (2010). Sistemas de dos componentes y regulación de la producción de antibióticos en *Streptomyces coelicolor*. Instituto de microbiología bioquímica departamento de microbiología y genética c.s.i.c./Universidad de Salamanca. (Tesis Doctoral).

Hernández, P. E. (2010). Nutrición y Bromatología III. Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense de Madrid (Tesis doctoral).

Islas-Rodríguez, A. E., Marcellini, L., Orioni, B., Barra, D., Stella, L. & Mangoni, M. L. (2009). Esculentin 1–21: a linear antimicrobial peptide from frog skin with inhibitory effect on bovine mastitis-causing bacteria. *Journal of Peptide Science*. 15, 607–614.

Kirk, S., Avignone-Rossa, A. C., Bushell, M. E. (2000). Growth limiting substrate effects antibiotic production and associated metabolic fluxes in *Streptomyces clavuligerus*. *Biotechnology letters*, 22, 1803-1822.

Li, R., & Townsend, C. (2006). Rational strain improvement for enhanced clavulanic acid production by genetic engineering of the glycolytic pathway in *Streptomyces clavuligerus*. *Metabolic engineering*, 8(3), 240-252.

Murphy, C. J., Foster, B. A., Mannis, M. J., Selsted, M. E., & Reid, T. W. (1993). Defensins are mitogenic for epithelial cells and fibroblast, *Journal of cells physiology*. 155, 408- 413.

Ōmura, S., Ikeda, H., Ishikawa, J., Hanamoto, A., Takahashi, C., Shinose, M., & Hattori, M. (2001). Genome sequence of an industrial microorganism *Streptomyces avermitilis*:

Deducing the ability of producing secondary metabolites. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(21), 12215–12220.

Orsaria, L., Paoletti, L., & Gramajo, H. C. (1998). Characterization of stationary-phase proteins in *Streptomyces coelicolor* A3 (2). *FEMS Microbiology Letters*. 162, 275-281.

Shepherd, M. D., Kharel, M. K., Bosserman, M. A., & Rohr, J. (2010). Laboratory

Maintenance of *Streptomyces* species. *Current protocols in microbiology*. doi: 10.1002/9780471729259.mc10e01s18.

Téllez, G. A., & Castaño, J. C. (2010). Péptidos antimicrobianos. *Revista Infectio* 14(1), 55-67.