

Facultad de Ciencias de la Salud
Sección de Farmacia

Departamento de Bioquímica, Microbiología, Biología Celular y
Genética
(Área de Microbiología)

CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA Y CULTIVO DE
BACTERIAS MARINAS

Autora: Rosmery Gómez Francés

Tutor: Dr. José Manuel de la Rosa Reyes
Co-tutora: Dra. Mercedes Cueto Prieto

Grado en Farmacia
La Laguna, julio 2018

AGRADECIMIENTOS

A mi tutor José Manuel de la Rosa Reyes por su gran apoyo, interés, paciencia y sus buenas ideas que han ayudado a la realización de este trabajo de fin de grado.

A mi cotutora Mercedes Cueto Prieto por su disposición y ayuda para llevar a cabo este trabajo.

A mis padres, por estar siempre ahí, apoyándome durante estos cinco años de carrera y por confiar en mí.

También deseo expresar mi agradecimiento al Grupo de Microorganismos Marinos de la sección de Microbiología del Departamento de Bioquímica, Microbiología, Biología Celular y Genética de la Universidad de La Laguna y al Grupo de Química de Productos Marinos del Departamento de Fitoquímica Aplicada y Ecología Química del Instituto de Productos Naturales y Agrobiología del CSIC, por las facilidades prestadas para la realización de este trabajo.

ÍNDICE

ÍNDICE DE ABREVIATURAS	1
ABSTRACT	2
1.1. Los microorganismos marinos como fuente de sustancias de interés farmacéutico.	3
1.2. Identificación bacteriana	3
1.2.1. El 16S rRNA	4
1.2.2. Análisis de las secuencias obtenidas	4
2. OBJETIVOS	6
3. MATERIAL Y MÉTODOS	7
3.1. Microorganismos	7
3.2. Medios y condiciones de cultivo	7
3.3. Tinción de Gram	7
3.4. Extracción de DNA genómico de las cepas para su identificación	9
3.5. Electroforesis de DNA en gel de agarosa	9
3.6. Amplificación del gen 16S rRNA mediante PCR	9
3.7. Purificación del DNA amplificado	11
3.8. Secuenciación y análisis de las secuencias de DNA obtenidas	11
3.9. Fermentación y extracción en medio líquido	12
3.10. Cromatografía en Capa Fina (CCF)	12
3.11. Resonancia Magnética Nuclear (RMN)	12
3.12. Ensayo de actividad antimicrobiana	12
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	13
4.1. Identificación molecular de bacterias obligadamente marinas	13
4.2. Estudio químico de la cepa CB08033	22
5. CONCLUSIONES	25
6. BIBLIOGRAFÍA	26

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

AcOEt: Acetato de etilo

AIA: Actinomycete Isolation Agar

BLAST: Basic Local Alignment Search Tool

DNA: Ácido desoxirribonucleico

Hex: Hexano

IPNA-CSIC: Instituto de Productos Naturales y Agrobiología del Consejo Superior de Investigaciones Científicas

LTP: All-species Living Tree Project

MeOH: Metanol

NCBI: National Center for Biotechnology Information

PM: Peso Molecular

RDP: Ribosomal Database Project

rRNA: Ácido ribonucleico ribosómico

SCA: Starch Casein Agar

SYP: Starch Yeast extract Soy Peptone

TAE: Tampón 0,04 M Tris-acetato, 0,001 M EDTA

TE: Tampón 10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8

UBAF: Cebador 16s universal forward

UBAR: Cebador 16s universal reverse

UV: Ultravioleta

ABSTRACT

Marine microorganisms are a large and relatively unexplored source of bioactive compounds. In order to contribute to its knowledge, in this work we have proceeded to the identification of three bacterial isolates of marine origin, CB08016, CB08035 and CB08036, by sequencing its 16S rDNA genes, which has allowed to establish a preliminary assignation of the cited taxa to the species *Marinobacter litoralis*, *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* and *Roseomonas vinacea*, respectively. This results were corroborated by phylogenetic analysis, using the validated species for each genus. The taxonomic characterisation was consistent with the initial hypothesis, which is, the isolation of obligate marine bacteria. On the other hand, we started the chemical study of a isolated of marine origin, CB08033. The crude extract obtained from the supernatant of this cultured unidentified microorganism showed activity against *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853. This is a promising result as it could justify the approach of a bioguided fractionation of the extract in order to isolate the metabolites responsible for the activity.

RESUMEN

Los microorganismos marinos constituyen una gran y relativamente poco explorada fuente de compuestos bioactivos. Con objeto de contribuir a su conocimiento, en este trabajo se ha procedido a la identificación de tres aislados bacterianos de origen marino, CB08016, CB08035 y CB08036, mediante la secuenciación de sus genes 16S rDNA, lo cual ha permitido establecer una asignación preliminar de los citados taxones a las especies *Marinobacter litoralis*, *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* y *Roseomonas vinacea*, respectivamente. Estos resultados fueron corroborados mediante el análisis filogenético, utilizando las especies validadas para cada género. La caracterización taxonómica realizada es consistente con la hipótesis de partida, esto es, el aislamiento de bacterias obligadamente marinas. Por otro lado, se inició el estudio químico de un aislado de origen marino, CB08033. El extracto crudo obtenido del sobrenadante del cultivo de este microorganismo, aún no identificado, presentó actividad frente a *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853. Este resultado es prometedor ya que podría justificar el abordaje de un fraccionamiento bioguiado del extracto con objeto de llegar a aislar el o los metabolitos responsables de la actividad.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Los microorganismos marinos como fuente de sustancias de interés farmacéutico.

Desde siempre, la naturaleza ha constituido una fuente inagotable de compuestos activos que, desde el punto de vista farmacológico, se han venido utilizando para combatir multitud de enfermedades. Primero fueron las plantas y más tarde los microorganismos de origen terrestre las primeras fuentes de moléculas empleadas como armas para la lucha contra el cáncer y otras dolencias. Tanto es así que, actualmente más de la mitad de las moléculas utilizadas para el tratamiento de múltiples dolencias tienen origen natural.^{1,2,3}

Los océanos son los ambientes de mayor extensión del planeta, cerca de tres cuartas partes de este. Diferentes estudios concluyen en estimar que son varios millones de especies de seres vivos las que viven en él, de las cuales tan sólo una pequeña parte son conocidas. Esta enorme biodiversidad se pone de manifiesto en los 34 filos presentes en los océanos, frente a los 17 que se encuentran representados en los ambientes terrestres.⁴

Los microorganismos marinos, en particular, constituyen una parte dominante de este ecosistema, no solo en biomasa sino también en actividad metabólica.⁵ En el océano, los microorganismos son los que capturan y traducen la energía solar, catalizan las transformaciones biogeoquímicas clave de los nutrientes y elementos traza que soportan la productividad oceánica, participan en la regulación de los gases de efecto invernadero y representan una gran reserva de variabilidad genética.⁶

A pesar de esto, los microorganismos marinos son una fuente, aún hoy, no demasiado explorada. Tan sólo el 1% de ellos han conseguido ser cultivados en el laboratorio, lo que implica que el 99% restante son prácticamente desconocidos.⁷

Por estos motivos, y ante la necesidad de descubrir y desarrollar nuevos productos demandados por la industria, se ha despertado el interés por explorar los microorganismos marinos, basándose en la premisa de que la adaptación de los mismos a las circunstancias del medio marino incluiría el desarrollo de una maquinaria enzimática potencialmente capaz de producir nuevos metabolitos secundarios de los que se puedan obtener sustancias de interés biotecnológico, que por sus actividades sean aplicables por ejemplo, en la industria farmacéutica, cosmética o agroalimentaria.⁸

1.2. Identificación bacteriana

Tradicionalmente, la identificación bacteriana se llevaba a cabo mediante el uso de métodos convencionales basados en el estudio de las características fenotípicas de las células en cultivo: morfología, desarrollo, propiedades bioquímicas, genéticas, metabólicas, etc. En algunos ámbitos como el clínico aún son muy utilizadas, junto a las técnicas serológicas, pues constituyen pruebas rápidas y de bajo coste.⁹

En las últimas décadas, gracias al desarrollo de nuevas técnicas automatizadas, se han sumado nuevos procedimientos, complementarios a los métodos convencionales, los denominados métodos moleculares (genotípicos) de identificación bacteriana.⁵ Dentro de estos métodos moleculares, para la clasificación taxonómica de una bacteria desconocida, la técnica de análisis del 16S rRNA es el más utilizado.¹⁰

No obstante, la clasificación de un taxón desconocido requiere, además, de un mínimo de características de morfología celular, colonial, genéticas (hibridación DNA-DNA, por ejemplo), fisiológicas, bioquímicas, metabólicas, ecológicas, etc., de modo que estas describan las peculiaridades del taxón (especie u otro) que lo definan como único y diferenciable de otros preexistentes.¹¹

1.2.1. El 16S rRNA

El 16S rRNA es un polirribonucleótido codificado por el gen *rrs* o DNA ribosomal, o 16S rDNA, el cual está incluido en la subunidad 30S del ribosoma bacteriano. Reúne una serie de características que lo hacen ideal para los estudios taxonómicos y de evolución.¹² (**Figura 1**)



Figura 1. Características del 16S rRNA.

Por tanto, el análisis de la secuencia obtenida por comparación con las secuencias de las bases de datos, la extracción previa del DNA genómico de la bacteria, la amplificación, la purificación de los fragmentos del 16S rRNA y la secuenciación de este, son factores determinantes en el proceso de identificación bacteriana.⁹ (**Figura 2**)

El criterio general considera que una similitud entre dos secuencias de 16S rRNA de dos taxones igual o superior al 97% indica que ambos pertenecen a la misma especie. Este criterio general, más recientemente, ha sido puesto en cuestión por algunos autores, los cuales proponen establecer el umbral en torno al 98,5%.¹³

1.2.2. Análisis de las secuencias obtenidas

Una parte fundamental en el proceso de clasificación taxonómica es la asignación de taxones y/o identificación de cepas ya que pueden obtenerse diferencias dependiendo de los iniciadores seleccionados o de las regiones comprendidas en el estudio, de las herramientas bioinformáticas utilizadas y de la disponibilidad de secuencias de referencia.¹²

El nivel de desarrollo que han alcanzado los estudios sobre el 16S rRNA y sus aplicaciones han facilitado la elaboración de bases de datos específicas, que constituyen un instrumento fundamental en el proceso de clasificación taxonómica. Debido a que la asignación taxonómica se realiza mediante la comparación de secuencias, los utensilios de búsqueda, las estrategias de comparación y las bases de datos donde se encuentran almacenadas estas secuencias resultan esenciales para una buena asignación de taxones como se ha expuesto anteriormente.¹⁴



Figura 2. Etapas en el proceso de identificación bacteriana mediante la secuenciación del 16S rRNA. Una vez secuenciado el amplicón, el primer paso para el análisis de la secuencia lo constituye la observación del electroferograma, su edición (resolución de posibles errores), el ensamblaje en el caso de tener secuencias parciales solapantes (*contigs*) y, por último, la búsqueda de similitudes de la secuencia obtenida con aquellas depositadas previamente en las bases de datos. Finalmente, se pueden elaborar árboles filogenéticos (dendrogramas) utilizando los alineamientos con otros taxones generados.

Actualmente, existen algunas bases de datos públicas con acceso libre a través de internet y otras privadas (**Tabla 1**). También existen bases de datos generales como el NCBI¹⁵ que sirve como referencia para la búsqueda y comparación de secuencias de nucleótidos a través del algoritmo BLAST¹⁶ y dentro de las bases de datos específicas, que solo contienen secuencias 16S validadas, encontramos, entre otras, a SILVA.¹⁷ Éste es un portal que contiene secuencias de rRNA tanto 16S/18S como 23S/28S para los dominios Bacteria, Archaea y Eukarya, y destaca por la calidad y tamaño de sus secuencias.

TABLA 1. BASES DE DATOS

PÚBLICAS		PRIVADAS
RDP	GenBank	MicroSeq (Applied Biosystems)
NCBI		SmartGene IDNS
EMBL	RIDOM	

2. OBJETIVOS

Este trabajo se enmarca dentro de un proyecto de investigación financiado que se lleva a cabo actualmente por el grupo de Química de Productos Marinos del Instituto de Productos Naturales y Agrobiología (IPNA-CSIC). La idea central del proyecto es el estudio de una colección de aislados bacterianos marinos que sólo pueden crecer en medios de cultivo que contienen agua de mar (bacterias obligadamente marinas), como productores de moléculas con potencial terapéutico, antimicrobiano (antibacteriano o antifúngico), mediante la identificación y caracterización de extractos e hidrolizados proteicos con potencial antimicrobiano para su posterior aplicación, en el sector agroalimentario. El fin último del proyecto sería la creación de una “librería” de extractos o quimioteca conteniendo una colección de moléculas químicas o extractos naturales, almacenados, catalogados y caracterizados según su estructura y actividad antimicrobiana frente a microorganismos diana.

Los objetivos específicos de este TFG son:

1. Por una parte, la clasificación taxonómica de algunos aislados de bacterias obligadamente marinas, mediante la secuenciación de sus genes 16S rRNA, de la colección disponible para el desarrollo del proyecto. Este planteamiento podría facilitar el diseño posterior de unas condiciones de cultivo específicas para un organismo y posibilitaría la obtención de un tipo concreto de metabolitos.
2. Cultivo de una bacteria obligadamente marina sin identificar y la obtención de un extracto crudo para el análisis de su actividad biológica. Este planteamiento pondría de relieve el interés de la cepa elegida si se obtiene un resultado positivo de actividad biológica.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. Microorganismos

El grupo de Química de Productos Marinos del IPNA-CSIC cuenta con una colección de bacterias obligadamente marinas. De esta colección, se seleccionaron 10 aislados. (**Tabla 3**)

Estas cepas han sido identificadas mediante un código de colección para facilitar su almacenamiento, ordenación y reconocimiento.

año de muestreo
CB08002
 colección de bacterias nº del aislado

Las cepas se encontraban criopreservadas a -80°C en viales en una solución de glicerol al 20%.¹⁸

Las bacterias fueron reavivadas mediante su descongelación y siembra en los medios de aislamiento e incubación posterior a la temperatura de crecimiento y transcurrido este período, los cultivos se conservaron a 4°C .

3.2. Medios y condiciones de cultivo

Se emplearon tanto medios líquidos como sólidos y ambos fueron esterilizados en autoclave (1 kg/cm^2 , 20 min, 121°C). La preparación de los medios líquidos se llevó a cabo resolviendo sus componentes en agua de mar artificial, elaborada con sales marinas, Sigma S9883. A los medios sólidos se agregó agar hasta una concentración de 2 g/L en la composición del medio correspondiente antes de su esterilización (excepto AIA) (**Tabla 4**). Éstos últimos, fueron dispensados en placas de Petri ($\approx 25\text{ ml/placa}$) tras haber enfriado ($\approx 45^{\circ}\text{C}$).

Para la manipulación de los medios de cultivo y microorganismos se utilizó una campana de flujo laminar, de diseño vertical (Crumair 9005FL), evitando de esta manera los problemas de contaminación microbiológica.

Las bacterias fueron incubadas a la temperatura de 25°C . Los cultivos en medio líquido se iniciaron a partir de precultivos en placas de Petri conservadas a 4°C . Para la siembra en placas se utilizó el método de siembra por agotamiento (en estrías) que facilitó la obtención de colonias aisladas. Los cultivos en medio líquido se realizaron en agitación en un agitador orbital a 150 rpm (**Figura 3**). Para éstas, se partió de colonias de un cultivo puro en placa de Petri.

3.3. Tinción de Gram

La tinción de Gram es una tinción diferencial que permite clasificar a las bacterias en dos grupos: gram negativas (rojas) y gram positivas (púrpuras o violetas). Se emplearon diferentes sustancias (**Tabla 2**) y para la visualización se utilizó un microscopio óptico Leica CME equipado con objetivo de inmersión 100X.



Figura 3. Crecimiento de la cepa CB08033 en medio SYP.

TABLA 2. Protocolo tinción de Gram.

SUSTANCIAS	TIEMPO
Cristal violeta	2 min
Safranina	2 min
Lugol	1 min
Alcohol acetona (decolorante)	---

Tabla 3. Lista de los microorganismos empleados en este trabajo, mostrando los principales datos conocidos.

Nombre	Procedencia	Tipo de muestra	Medio de aislamiento	Crecimiento		Microscopía		
				ASW	DW	Colonias	Tipo celular	KOH 3%*
CB08002	Egipto	Sedimento E4	SCA	Sí	No	cremosa beige, halo		ND
CB08007	Egipto	Sedimento E5	SCA	Sí	No	cremosa, halo		-
CB08012	Egipto	Sedimento E6	SYPA	Sí	No	cremosa, halo blanco		-
CB08016	Egipto	Sedimento E6	SYPA	Sí	No	mucosa	bacilo	-
CB08019	Egipto	Sedimento E1	SYPA	Sí	No	mucosa, beige, bordes brillantes		+
CB08033	Egipto	Sedimento E6	AIA	Sí	No	mucosa beige		-
CB08035	Egipto	Sedimento E6	SYPA	Sí	No	mucosa blanquecina	bacilo	-
CB08036	Egipto	Sedimento E1	SCA	Sí	No	mucosa rosa pálido	bacilo	-
CB08042	Egipto	Sedimento E2	SCA	Sí	No	mucosa, beige		ND
CB08044	Egipto	Sedimento E2	AIA	ND	ND			-

* Determinación indirecta del carácter gram¹⁹; ND, no determinado; ASW: *artificial sea water* (sal marina, Sigma S9883); DW: *distilled water*.

Tabla 4. Composición de los medios SYP, AIA y SCA respectivamente (g/L). Para hacer el correspondiente medio sólido se añadió agar 2 g/L (excepto AIA, el cual contiene agar).

SYP		AIA		SCA	
Componente	Cantidad	Componente	Cantidad	Componente	Cantidad
Extracto de levadura	4,0 g	Medio actinos	22 g	Caseína	1,0 g
Peptona de soja	2,0 g	Glicerol 20%	25 ml	Almidón	10 g
Almidón	10 g	Agua	1000 ml	Agua	1000 ml
Agua	1000 ml				

3.4. Extracción de DNA genómico de las cepas para su identificación

La extracción de DNA se realizó llevando a cabo el procedimiento de Liu et al,²⁰ en el que el DNA se extrajo directamente a partir de colonias crecidas en placas de Petri.

El DNA se resuspendió en 30 µl de TE pH 8 y fue visualizado tras su separación electroforética y teñido con bromuro de etidio, conservándose a 4°C hasta el momento de su utilización.

3.5. Electroforesis de DNA en gel de agarosa

La separación de fragmentos de DNA se realizó mediante electroforesis en geles de agarosa (0,7-1%) en tampón TAE. Las electroforesis se realizaron usando cubetas horizontales en geles sumergidos de grosor y tamaño variable dependiendo del número de muestras, su volumen y el tipo de experimento.

Se agregó al gel bromuro de etidio (0,2 µg/ml) para visualizar el DNA, tras su exposición a la luz (340 nm) en un transiluminador UV.

Las muestras de DNA se prepararon en una solución que contenía azul de bromofenol (0,25%), xileno-cianol (0,25%) y sacarosa (40%), en una proporción 5:1, la cual actúa de frente para indicar el progreso de la electroforesis.

Las electroforesis se desarrollaron a voltaje constante (5 voltios/cm de separación de electrodos).

La cuantificación del DNA fue estimada por comparación con la fluorescencia emitida por las bandas de DNA de marcadores de PM de referencia. Los marcadores empleados se muestran en la **Figura 4**.

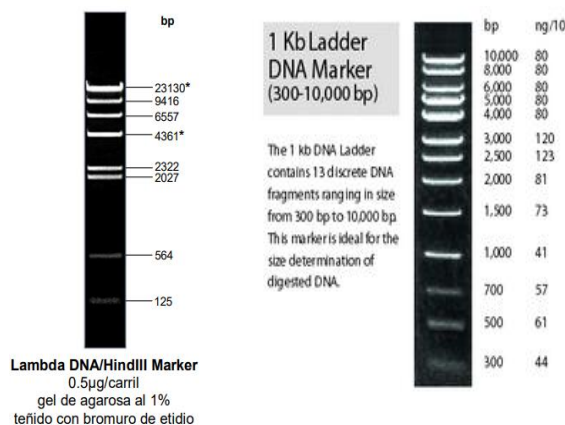


Figura 4. Marcadores de peso molecular: Lambda Hind III y 1 Kb Ladder.

3.6. Amplificación del gen 16S rRNA mediante PCR

La PCR es una técnica empleada para amplificar DNA, es decir, permite generar una gran cantidad de copias a partir de un DNA molde.

En este trabajo, las reacciones de PCR se llevaron a cabo utilizando la enzima BioTAQ™ DNA Polymerase siguiendo las indicaciones del fabricante. El tubo de reacción contenía la mezcla indicada en la **Tabla 5**. En la preparación de la mezcla de amplificación se utilizó agua bidestilada, grado de biología molecular (Fluka).

Los fragmentos amplificados fueron conservados a 4°C.

Tabla 5. Cócteles de amplificación para las reacciones de PCR.

Componentes	Concentración del stock	Concentración final en la reacción	Volumen ×1 (por reacción)
H ₂ O (bidestilada)	-----	-----	6,5 µl
Tampón de reacción (NH ₄ buffer)	10X	1X	5,0 µl
MgCl ₂	50 mM	3 mM	3 µl
dNTPs	10 mM	1 mM	5,0 µl
Oligonucleótido (UBAf)	10 µM (10 pmoles/µl)	0,5 µM (25 pmoles)	2,5 µl
Oligonucleótido (UBAr)	10 µM (10 pmoles/µl)	0,5 µM (25 pmoles)	2,5 µl
BioTAQ	5 unidades/ µl	2,5 unidades	0,5 µl
			25 µl
DNA molde		50-100 ng	25 µl
			50 µl (Volumen final)

Los cebadores utilizados, diseñados para amplificar el gen ribosómico 16S prácticamente completo (aproximadamente 1500 pb), fueron UBAF y UBAr (**Tabla 6**). Las posiciones de unión de estos cebadores serían 10-29 y 1527-1543, respectivamente, para *Escherichia coli* K-12 C3026 (*accession number* CP014272).

Los ciclos de amplificación programados en el termociclador fueron los indicados en la **Tabla 7**.

Los resultados se analizaron mediante electroforesis en geles de agarosa.

Tabla 6. Cebadores utilizados en este trabajo.

Primer	Secuencia 5'-3'	Diseñado para	T _m (°C)	Referencia
UBAF (fD1)	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG	Eubacterias	54,3	Weisburg et al ²¹
UBAR (rD1)	AAGGAGGTGATCCAGCC	Eubacterias	54,1	Weisburg et al ²¹

Tabla 7. Etapas del proceso de amplificación (PCR).

Pasos	Temperatura	Tiempo
Desnaturalización inicial	95°C	4 minutos
Ciclos (X30)	94°C	30 segundos
	52°C	40 segundos
	72°C	1,5 minutos
	72°C	10 minutos
Extensión final	72°C	10 minutos
Mantenimiento	4°C	∞

3.7. Purificación del DNA amplificado

Los bloques de agarosa conteniendo los fragmentos de interés, se cortaron con bisturí y se transfirieron a tubos eppendorf para ser purificados con el kit comercial Clean Spin Kit (Real Laboratory) siguiendo las instrucciones del fabricante. Básicamente el procedimiento consiste, en primer lugar, en la disolución de agarosa seguido por una cromatografía de adsorción a pequeña escala con una mini-columna precargada con una matriz de sílice, donde el DNA queda adherido. Finalmente, éste fue liberado de la matriz, resuspendido en agua bidestilada estéril (30 µl) y cuantificado mediante electroforesis en gel de agarosa.

3.8. Secuenciación y análisis de las secuencias de DNA obtenidas

La determinación de la secuencia nucleotídica del DNA se llevó a cabo en el Servicio de Genómica de la ULL.

Para el análisis de las secuencias obtenidas se utilizaron las siguientes herramientas bioinformáticas (software, bases de datos y recursos web). (Tabla 8)

TABLA 8. HERRAMIENTAS BIOINFORMÁTICAS

HERRAMIENTA	FUNCIÓN	REFERENCIA
DNA BASER v4	Paquete de software que permite la manipulación de los cromatogramas de la secuenciación (edición), ensamblaje (<i>contigs</i>) y alineamiento de las secuencias de DNA.	DNA Sequence Assembler v4 ²²
BLAST	Algoritmo de búsqueda local que se utilizó para realizar la búsqueda preliminar de homologías entre las secuencias problema y las secuencias depositadas en las bases de datos de GenBank perteneciente al NCBI o la base de datos del proyecto LTP de SILVA (Este último recurso se utilizó a través de una búsqueda local en un servidor de la ULL)	Altschul et al ¹⁶
CLUSTAL OMEGA	Herramienta utilizada para generar los alineamientos múltiples requeridos para llevar a cabo el estudio filogenético.	Sievers et al ²³
MEGA v7	Paquete de software utilizado en este trabajo para construir los dendrogramas y el análisis filogenético.	Kumar et al ²⁴

3.9. Fermentación y extracción en medio líquido

El cultivo en medio líquido se inició a partir de un precultivo en placa de Petri. En un pequeño volumen del medio SYP se resuspendieron con ayuda de un asa de siembra unas cuantas colonias de la placa y seguidamente se inocularon los Erlenmeyer con la suspensión. El cultivo se incubó y creció bajo las condiciones mencionadas en el apartado 3.2 de material y métodos. (Figura 3)

El caldo se separó de la masa celular mediante filtración y se llevó a cabo la extracción con AcOEt, renovando el disolvente hasta un total de tres veces. Las fases orgánicas reunidas fueron tratadas con un agente desecante, el sulfato de sodio anhidro, filtradas y el disolvente orgánico eliminado por rotaevaporación, empleando un rotavapor Buchi (Waterbath B-480). De esta forma se obtuvo un extracto crudo. (Figura 16)

3.10. Cromatografía en Capa Fina (CCF)

Las fases de las CCF se muestran en la Tabla 9.

TABLA 9. Fases de la Cromatografía en Capa Fina

FASE ESTACIONARIA	Cromatofolios (20×20 cm) del gel de sílice Silicagel 60 F254 con base de aluminio (Merck, 105554).
FASE MÓVIL	Mezcla de Hexano: AcOEt (1:1) o una mezcla de CH ₂ Cl ₂ : MeOH (9:1)
REVELADO	<i>Oleum</i> : pulverización con una disolución H ₂ SO ₄ :H ₂ O:AcOH (1:4:20) y posterior calentamiento.
	Detección por fluorescencia empleando una lámpara UV Vilbert Lourmat a una longitud de onda de 254 nm.

3.11. Resonancia Magnética Nuclear (RMN)

El espectro de RMN se realizó en un espectrómetro Bruker Avance 400 (400 MHz para ¹H).

Para la adquisición de los datos se empleó cloroformo deuterado como disolvente y cloroformo como patrón de referencia interna (δ_H 7.25 ppm). Los valores de desplazamiento químico (δ) se expresan en partes por millón (ppm), en relación al disolvente (cloroformo). La información espectroscópica fue procesada utilizando el programa MestReNova²⁵ (versión 11.0), Mestrelab Research S. L. 2017.

3.12. Ensayo de actividad antimicrobiana

El ensayo de actividad antimicrobiana fue llevado a cabo por el Servicio de Actividad Biológica del IPNA-CSIC. Se determinó la actividad antimicrobiana frente a diferentes cepas. (Tabla 10)

TABLA 10. Cepas indicadoras para el ensayo de actividad antimicrobiana

<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213	<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	<i>Campylobacter jejuni</i> ATCC 33560
---------------------------------------	---	--	--	---

Se trata de una prueba cualitativa que se manifiesta a través de la presencia de un halo de inhibición. El protocolo es una adaptación del descrito por Matuschek et al.²⁶

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Identificación molecular de bacterias obligadamente marinas

En primer lugar, se llevó a cabo una tinción de Gram para confirmar la identidad de las cepas crecidas. En la Figura 5 se muestra la tinción de Gram de la cepa CB08007 (Gram -) y CB07044 (Gram +) a modo ilustrativo.

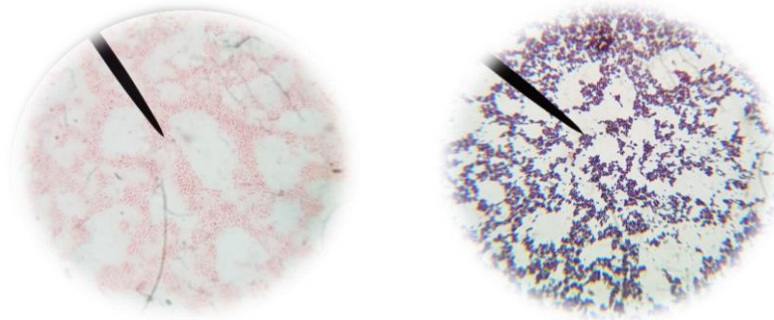


Figura 5. Tinción de Gram de las cepas CB08007 y CB07044.

Seguidamente, se abordó la extracción de DNA genómico de cada uno de las cepas. La electroforesis posterior de los DNA genómicos extraídos, teñidos con bromuro de etidio, permitió verificar el proceso de extracción y cuantificar de manera aproximada las concentraciones de DNA por comparación con los marcadores de PM de concentración conocida (**Figura 4**). Como se puede observar en la **Figura 6**, el rendimiento de la extracción fue muy dispar, lo cual podría ser debido, entre otros factores, a la diferente biomasa celular recogida, ya que las colonias de las distintas cepas poseían diferente consistencia, desde cremosas, mucosas, etc., más fáciles de recolectar, hasta de consistencia más seca y dura, etc., que dificultó mucho la recogida con el asa de siembra. Se pudo ver también en las muestras, la presencia de distintas bandas correspondientes a los rRNAs, ya que el RNA es el ácido nucleico más abundante de la célula bacteriana y co-precipita en la preparación.

Dado que se necesita un mínimo de 50 ng de DNA molde para llevar a cabo la amplificación por PCR de los 16S rRNA, se decidió descartar aquellos DNAs de concentración más baja (los correspondientes a las cepas CB08012, CB08042 y CB08044) y se llevó a cabo la reacción de PCR con el resto de cepas. La composición de las reacciones de amplificación se muestran en la **Tabla 5** de material y métodos.

En la **Figura 7** se muestra la electroforesis de una parte de los amplificadores correspondientes a las cepas CB08016, CB08035 y CB08036 respectivamente.

No se obtuvo amplificación en el caso de la cepa CB08002 (pocillo 2), mientras que en el caso de CB08007 y CB08019 (pocillos 3 y 5 respectivamente), se obtuvieron varias bandas cuyo tamaño no se correspondió con el esperado, por lo que fueron descartados.

Se procedió a continuación, con la purificación de los fragmentos amplificados de las cepas CB08016, CB08035 y CB08036, a partir de la separación efectuada en una nueva electroforesis de agarosa (**Figura 8**). Los bloques de agarosa conteniendo las bandas correspondientes a los fragmentos de aproximadamente 1500 pb fueron cortados del gel, transferidos a viales, purificados y cuantificados, siguiendo los procedimientos descritos en material y métodos.

Los fragmentos purificados y cuantificados (**Figura 8**) fueron remitidos al Servicio de Genómica para la determinación de su secuencia de nucleótidos.

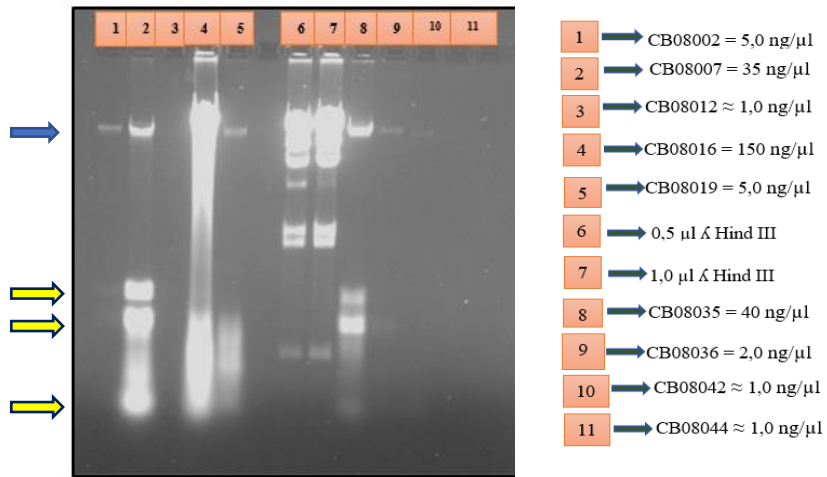


Figura 6. Electroforesis del DNA genómico extraído de las cepas. Flecha azul, banda correspondiente al DNA genómico; Flechas amarillas, bandas correspondientes a los RNAs ribosomales (23S, 16S, 5S).

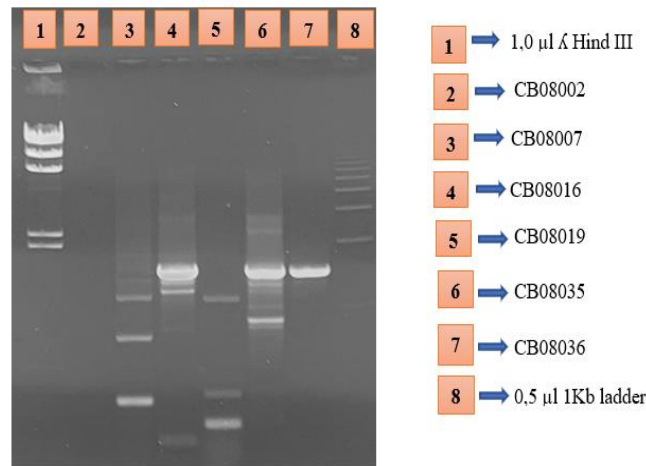


Figura 7. Electroforesis del DNA amplificado de las cepas seleccionadas. Se obtuvo una banda mayoritaria del tamaño suficiente para contener el gen completo 16S rRNA (≈ 1500 pb) en los pocillos 4, 6 y 7, los cuales corresponden a los amplificados de las cepas CB08016, CB08035 y CB08036 respectivamente.

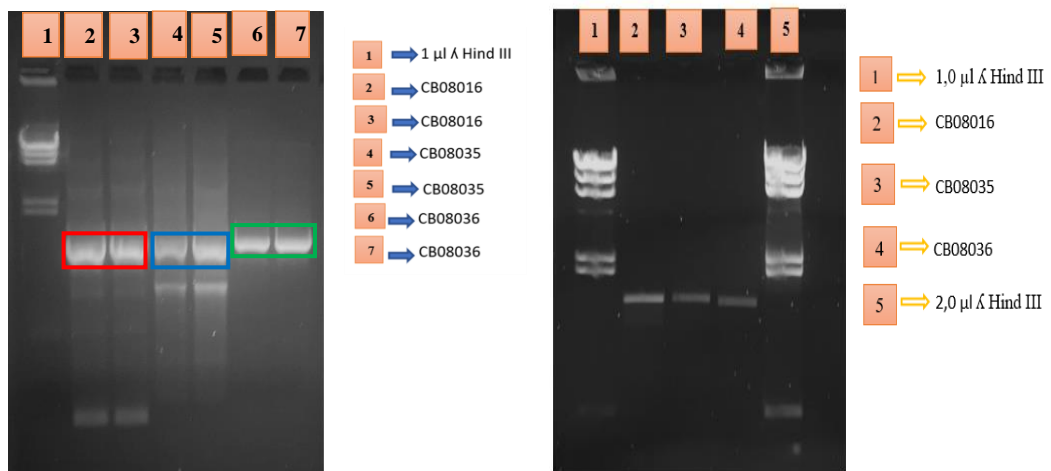


Figura 8. Electroforesis de los fragmentos de DNA purificados de las cepas CB08016, CB08035 y CB08036 (se recuadran en colores las bandas extraídas).

El análisis inicial de las secuencias se dirigió a evaluar la calidad de las mismas, para lo cual, se revisaron, en busca de errores, los cromatogramas (electroferogramas) recibidos por el Servicio de Secuenciación utilizando la suite DNA Baser v.4.3.²²(**Figura 9**)

Se alinearon los pares de secuencias, de las secuencias forward y reverse de cada cepa, para construir los fragmentos de longitud completa. Para ello, se utilizó la herramienta DNA Baser Assembler, del mismo paquete de software y finalmente, las secuencias fueron archivadas en formato FASTA.

Así, se obtuvieron las secuencias de nucleótidos correspondientes a los genes 16S rRNA de las cepas CB08016, CB08035 y CB08036, respectivamente. (**Figura 10**)

La identificación preliminar de las cepas se realizó mediante la búsqueda de similitudes en la base de datos de GenBank²⁷ utilizando el algoritmo BLAST¹⁶ y dentro de él, el módulo BLASTn.

En la **Figura 11**, se muestra un resumen de los listados obtenidos al introducir las secuencias de los genes 16S problema. Se obtuvieron similitudes muy altas, superiores al 98,5%, lo que nos permitió inferir la asignación de las cepas CB08016 y CB08035 al género *Marinobacter*, y de CB08036 al género *Roseomonas*. En la **Tabla 11** se muestran las principales características de estos géneros y su interés biotecnológico.

En este trabajo, se recurrió a la base de datos SILVA¹⁷ y se llevó a cabo nuevamente una búsqueda en BLAST¹⁶ pero, en esta ocasión, contra las secuencias de la base de datos de SILVA,¹⁷ las cuales habían sido descargadas en un servidor local.²⁸ (**Figura 12**)

Con objeto de hacer un estudio filogenético inicial se seleccionaron las secuencias pertenecientes a los géneros *Marinobacter* y *Roseomonas* y, con éstas, se generaron los alineamientos múltiples respectivos, utilizando el programa Clustal Omega.²³

Los alineamientos múltiples generados en Clustal Omega²³ se procesaron en MEGA v7²⁴, para generar los árboles filogenéticos. Los dendrogramas consenso obtenidos fueron robustos y presentaron buena concordancia con la identidad de los aislados establecida previamente. (**Figuras 14 y 15**)

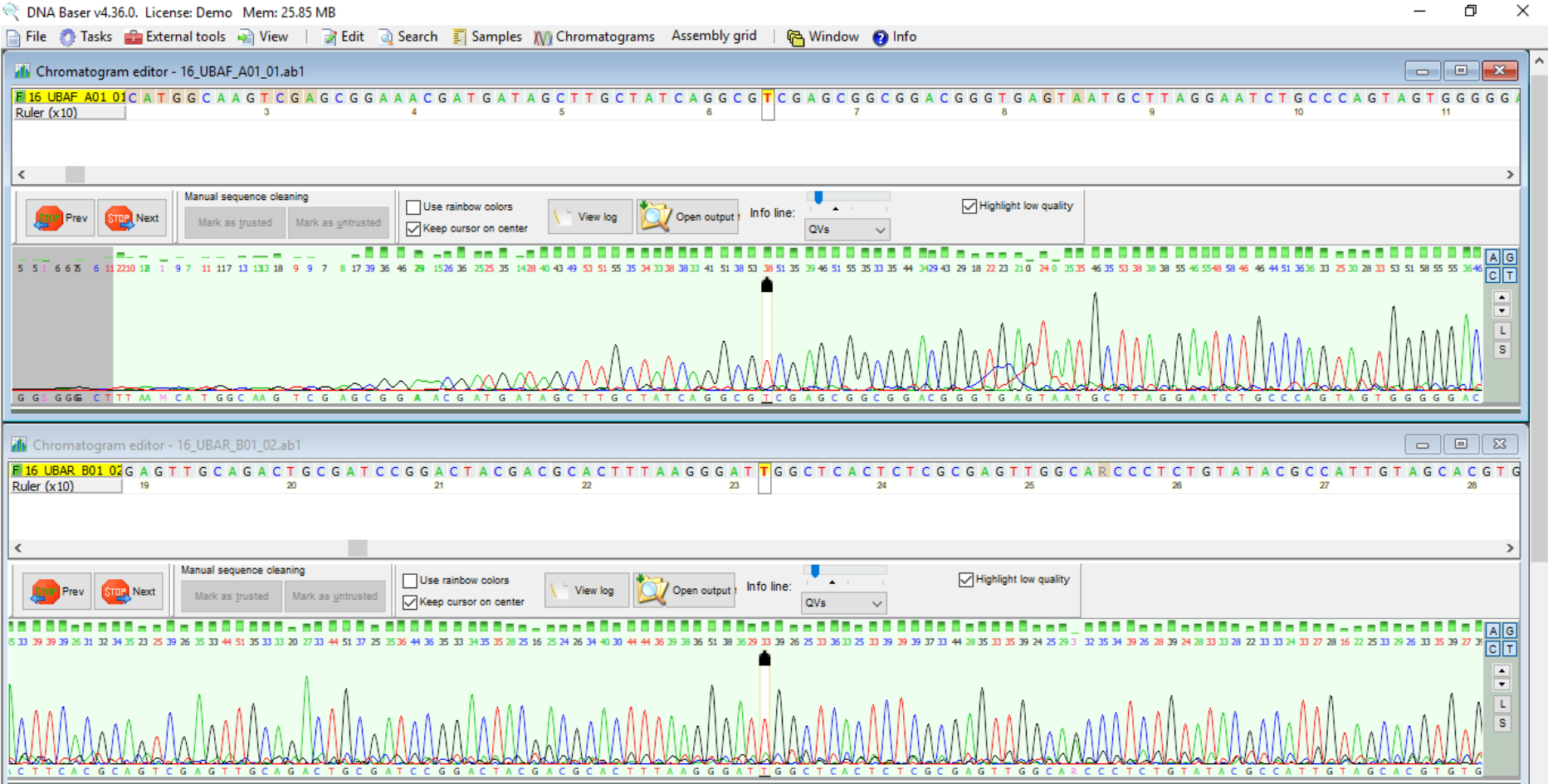


Figura 9. Captura de pantalla del procesamiento de los cromatogramas resultado de la secuenciación de la cepa CB08016. Con ayuda de este programa, se recortaron los extremos de cada secuencia, eliminando así las bases de peor calidad, y se corrigieron manualmente las ambigüedades e indeterminaciones, es decir, aquellas posiciones en las que el secuenciador automático no recibe una señal lo suficientemente clara como para asignar, con un alto porcentaje de fiabilidad, uno de los cuatro nucleótidos. En la parte superior se muestra el cromatograma obtenido con el oligonucleótido forward y en la inferior con el reverse.

>CB08016 (1409 nt)

CGGAAACGATGATAGCTTGCATACAGGCGTCGAGCGGGACGGGTGAGTAATGCTTAGGAATCTGCCAGTAGTGGGGGACAACAG
 TCGGAAACGGCTGCTAATACCGCATACGCCCTACGGGGGAAAGCAGGGGATCTTCGGACCTTGCCTATTGGATGAGCCTAAGTCGG
 ATTAGCTAGTTGGTGAGGTAAAGGCTCACCAAGGCCACGATCCGTAGCTGGTTTGAGAGGATGATCAGCCACATCGGGACTGAGACA
 CGGCCCGAACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGAATATTGGACAATGGGGGCAACCCTGATCCAGCCATGCCCGTGTGTGAAGAAG
 GCTTTCGGGTTGTAAGCACTTTCAGCGAGGAGGAAGGCTCTAAAGTTAATACCTTTAGGGATTGACGTTACTCGCAGAAGAAGCAC
 CGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCCGGTAATACGGAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCGCTAGGTGGTT
 GAGTAAGCGAGATGTGAAAGCCCCGGGCTTAACCTGGGAACGGCATTTCGAACCTGCTCGGCTAGAGTGTGGTAGAGGGTAGTGGAA
 TTCTGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATAGGAAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTACCTGGACCAACTGACACTGAGGTGC
 GAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGTCAACTAGCCGTTGGGGATCTTGAATCCTT
 AGTGGCGCAGCTAACGCACTAAGTTGACCGCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAAACCTCAAATGAATTGACGGGGGCCCGACAA
 GCGGTGGAGCATGTGGTTTAAATTCGACGCAACGCGAAGAACCTTACCTGGCCTTGACATGCAGAGAACTTCCAGAGATGGATTGGT
 GCCTTCGGGAAGCTTGACACAGGTGCTGCATGCCGTCGTGAGCTCGTGTGCTGAGATGTTGGTTAAGTCCCGTAACGAGCGCAAC
 CCTATCCTTGGTTGCTAGCAGGTAATGCTGAGAATCCAGGGAGACTGCCGTTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAGG
 TCATCATGGCCCTTACGGCCAGGGCTACACACGTGCTACAATGGCGTATACAGAGGGCTGCCAACTCGCGAGAGTGAGCCAATCCTT
 TAAAGTGCCTCGTAGTCCGGATCGCAGTCTGCAACTCGACTGCGTGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGCGAATCAGAATGTCCGGT
 GAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTACACCATGGGAGTGGATTGCACCAGAAGTGGTTAGTCTAACCTTCGGGAGGA
 CGATCACACCGGTGTGG

>CB08035 (1406 nt)

GGGGAAGCTTGCTTCCCGCTGACGAGCGGGACGGGTGAGTAATGCTTAGGAATCTGCCAGTAGTGGGGATAGCCCGGGGAAAC
 CCGGATTAATACCGCATACGTCCTACGGGAGAAAGCAGGGGATCTTCGGACCTTGCCTATTGGATGAGCCTAAGTCGGATTAGCTA
 GTTGGTGGGTTAAAGGCCATACCAAGCGACGATCCGTAGCTGGTTTGAGAGGATGATCAGCCACATCGGGACTGAGACACGGCCCA
 ACTCCTACGGGAGCGAGCATGGGGAATATTGGACAATGGGGCAACCCTGATCCAGCCATGCCCGTGTGTGAAGAAGGCTTTCGG
 GTTGTAAAGCACTTTCAGTAGGGAGGAAAACCTTATGGCTAATACCCATGAGCCTTGACGTTACTACAGAAGAAGCACCGGCTAAC
 TCCGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGGAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCGCTAGGTGGTTTGGTAAGC
 GAGATGTGAAAGCCCCGGCTTAACCTGGGAACGGCATTTCGAACTGTCAGACTAGAGTGTGGTAGAGGGTAGTGGAAATTTCTGTG
 TAGCGGTGAAATGCGTAGATATAGGAAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTACCTGGACCAACTGACACTGAGGTGCGAAAGCGT
 GGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGTCAACTAGCCGTTGGGACTCTTGAAGTCTTAGTGGCGC
 AGCTAACGCACTAAGTTGACCGCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAAACCTCAAATGAATTGACGGGGGCCCGACAAGCGGTGGA
 GCATGTGGTTAATTCGACGCAACGCGAAGAACCTTACCTGGCCTTGACATCCAGAGAATTTCCAGAGATGGATTGGTGCCTTCGG
 GAACTCTGAGACAGGTGCTGCATGGCCGTCGTGAGCTCGTGTGCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGTAACGAGCGCAACCCCTATCC
 CTGGTTGCTAGCAGGTAATGCTGAGAATCCAGGGAGACTGCCGTTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAGGTGATCATG
 GCCCTTACGGCCAGGGCTACACACGTGCTACAATGGCGCGTACAGAGGGCTGCCAACTCGCGAGAGTGAGCCAATCCCTTAAAACGC
 GTCGTAGTCCGGATCGGAGTCTGCAACTCGACTCCGTGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGCGAATCAGAATGTCCGGTGAATACGT
 TCCCGGGCTTGTACACACCGCCCGTACACCATGGGAGTGGATTGCACCAGAAGTAGTTAGT-
 CTAACCTTCGGGAGGACGATTACCACGGTGTGGTTCA

>CB08036 (1380 nt)

GTCGCACGGGCACTTTCGGGTGTCAGTGGCGGACGGGTGAGTAACGCGTAGGAACATGTCCAGGGTGGGGGATAACCGTGGGAAA
 CTGGCGCTAATACCGCATGTGAGCTGAGGCTCAAAGCCGCGAGGCGCCTTTGGAGTGGCCTGCGTCCGATTAGCTTGTGGTGGGGT
 AATGGCTTACCAAGGCTTCGATCGGTAGCTGGTCTGAGAGGACGACCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGG
 AGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGCAAGCCTGATCCAGCAATGCCCGTGGGTGAAGAAGGCTTTCGGATCGTAAAGCC
 CTTTCGACGGGACGATGATGACGGTACCCGTAGAAGAAGCCCCGGCTAACTTCGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGAAGGGGGCTA
 GCGTTGCTCGGAATTACTGGGCGTAAAGGGCGGTAGGCGGTCATTTTAGTCAGGCGTGAATTTCCGGGCTTAACCTGGGGACTGC
 GCTTGATACTGGGTGACTAGAGGGTGAAGAGGGTCTGGAATTTCCAGTGTAGAGGTGAATTCGTAGATATTGGGAAGAACACCG
 GTGGCGAAGCGGCGACCTGGTCCATTACTGACGCTGAGGCGGACAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCAC
 GCCGTAACGATGTGCGCTGGATGTTGGGTGACCTAGTCACTCAGTGTGCTAGCCAACGCGGTAAGCGCACCGCCTGGGGAGTACGG
 CCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAAATTCGAAGCAACGCGCAGAACCTT
 ACCAGCTCTTGACATGGACAGGACCGGTGTGGAGACACACTTTCGCCGCAAGGGCCTGTTGCACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTC
 GCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTCGCCACTAGTTGCCAGCACGTTTGGGTGGGCACTCTAGT
 GGAACCTCCGGTGACAAGCCGAGGAAGGTGGGGATGACGTCGAACTCCTGACCTTATGGGCTGGGCTACACACGTGCTACAAT
 GCGGCTGACAGTGGGAAGCCAGGTGCGGAGGCGGAGCCGATCCCCAAAAGCCGCTCAGTTTCGATTGCACCCTGCAACTCGGGTGC
 ATGAAGGTGGAATCGCTAGTAATCGTGGATCAGCAGCCACGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTACACCATG
 GGAGTTGGTTCTACCTAAGTGGCTGCGCTAACCGCAAGGGGGCAGGTACCCACGGTAGGGTACGCGACTGGGGT

Figura 10. Secuencias de nucleótidos de los genes 16S rRNA obtenidas.

CB08016

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<input type="checkbox"/> Marinobacter sp. ADBR partial 16S rRNA gene, isolate ADBR	2603	2603	100%	0.0	100%	HF562859.1
<input type="checkbox"/> Marinobacter sp. EK6E gene for 16S ribosomal RNA, partial sequence	2597	2597	100%	0.0	99%	LC053421.1
<input type="checkbox"/> Marinobacter sp. EK6D gene for 16S ribosomal RNA, partial sequence	2597	2597	100%	0.0	99%	LC053420.1
<input type="checkbox"/> Marinobacter littoralis gene for 16S ribosomal RNA, partial sequence, strain: KU17C	2597	2597	100%	0.0	99%	AB985579.1
<input type="checkbox"/> Marinobacter sp. FO-NAM5 partial 16S rRNA gene, strain FO-NAM5	2597	2597	100%	0.0	99%	FR716539.1
<input type="checkbox"/> Marinobacter sp. EMB6 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2597	2597	100%	0.0	99%	GU059907.1
<input type="checkbox"/> Marinobacter sp. H3(2009) 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2597	2597	100%	0.0	99%	FJ903190.1
<input type="checkbox"/> Marinobacter sp. EMB5 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2597	2597	100%	0.0	99%	FJ525429.1
<input type="checkbox"/> Marinobacter littoralis strain SW-45 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2597	2597	100%	0.0	99%	NR_028841.1
<input type="checkbox"/> Marinobacter sp. BWDY-54 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2597	2597	100%	0.0	99%	DQ328954.1

CB08035

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<input type="checkbox"/> Marinobacter sp. H054 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2595	2595	100%	0.0	100%	KJ577049.1
<input type="checkbox"/> Uncultured bacterium clone DLKU-65 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2595	2595	100%	0.0	100%	KF146595.1
<input type="checkbox"/> Uncultured Marinobacter sp. clone HB_109 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2595	2595	100%	0.0	100%	KF859652.1
<input type="checkbox"/> Marinobacter hydrocarbonoclasticus strain ATCC 49840 16S ribosomal RNA, partial sequence	2595	2595	100%	0.0	100%	NR_074619.1
<input type="checkbox"/> Marinobacter hydrocarbonoclasticus strain K-W47 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2595	2595	100%	0.0	100%	JQ799097.1
<input type="checkbox"/> Marinobacter sp. BJGMM-B37 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2595	2595	100%	0.0	100%	JQ716242.1
<input type="checkbox"/> Marinobacter hydrocarbonoclasticus str. ATCC 49840 chromosome, complete genome	2595	7786	100%	0.0	100%	FO203363.1
<input type="checkbox"/> Marinobacter hydrocarbonoclasticus strain ss28 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2595	2595	100%	0.0	100%	JN160769.1
<input type="checkbox"/> Marinobacter hydrocarbonoclasticus strain ss27 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2595	2595	100%	0.0	100%	JN160768.1
<input type="checkbox"/> Marinobacter hydrocarbonoclasticus strain ss26 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2595	2595	100%	0.0	100%	JN160767.1

CB08036

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<input type="checkbox"/> Roseomonas sp. T104-41 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2542	2542	100%	0.0	99%	HM204475.1
<input type="checkbox"/> Roseomonas nepalensis strain G-3-5 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2531	2531	100%	0.0	99%	KX129819.1
<input type="checkbox"/> Uncultured alpha proteobacterium clone cher6_1B_2 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	2492	2492	98%	0.0	99%	JN020182.1
<input type="checkbox"/> Roseomonas sp. BZ31r 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2481	2481	100%	0.0	99%	HQ588841.1
<input type="checkbox"/> Uncultured bacterium clone G18-sp-M22 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2468	2468	100%	0.0	99%	GQ130033.1
<input type="checkbox"/> Uncultured alpha proteobacterium clone A2_1A_3B_117 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	2464	2464	96%	0.0	99%	JQ627531.1
<input type="checkbox"/> Uncultured alpha proteobacterium clone B1_6_1B_115 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	2462	2462	97%	0.0	99%	JQ627530.1
<input type="checkbox"/> Roseomonas sp. ZSGR23 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2416	2416	100%	0.0	98%	KC577573.1
<input type="checkbox"/> Roseomonas sp. H12B-00351 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2409	2409	98%	0.0	99%	KC589292.1
<input type="checkbox"/> Roseomonas sp. L2B03 partial 16S rRNA gene, isolate L2B03	2407	2407	97%	0.0	99%	LN614685.1

Figura 11. Resultado de la búsqueda de homología con BLAST¹⁶, el cual compara la secuencia de nucleótidos problema contra una gran cantidad de secuencias de nucleótidos (cientos de millones) depositadas en las bases de datos. Estas secuencias no están todas validadas por lo que BLAST¹⁶ suele utilizarse para búsquedas amplias, no restringidas a ningún tipo de secuencia en particular. Se muestran solo las diez similitudes más altas.

CB08016

						Score	E
Sequences producing significant alignments:						(Bits)	Value
AF479689	1	1496	1496bp	rna	Marinobacter litoralis Alteromonadaceae	2597	0.0
AY180101	1	1536	1536bp	rna	Marinobacter excellens Alteromonadaceae	2392	0.0
DQ235263	1	1505	1505bp	rna	Marinobacter vinifirmus Alteromonada...	2375	0.0
FJ196022	1	1506	1506bp	rna	Marinobacter antarcticus Alteromonad...	2298	0.0
AJ704395	1	1487	1487bp	rna	Marinobacter maritimus Alteromonadaceae	2266	0.0

CB08035

						Score	E
Sequences producing significant alignments:						(Bits)	Value
X67022	1	1483	1483bp	rna	Marinobacter hydrocarbonoclasticus Alt...	2470	0.0
HQ433441	1	1465	1465bp	rna	Marinobacter persicus Alteromonadaceae	2399	0.0
DQ235263	1	1505	1505bp	rna	Marinobacter vinifirmus Alteromonada...	2390	0.0
AY517633	1	1496	1496bp	rna	Marinobacter daepoensis Alteromonada...	2388	0.0
FJ897726	1	1464	1464bp	rna	Marinobacter oulmenensis Alteromonad...	2350	0.0

CB08036

						Score	E
Sequences producing significant alignments:						(Bits)	Value
EF368368	1	1421	1421bp	rna	Roseomonas vinacea Acetobacteraceae	2398	0.0
GU168019	1	1441	1441bp	rna	Roseomonas pecuniae Acetobacteraceae	2259	0.0
EF661571	1	1354	1354bp	rna	Roseomonas aerilata Acetobacteraceae	2255	0.0
AY150045	1	1482	1482bp	rna	Roseomonas gilardii subsp. gilardii ...	2159	0.0
AY220740	1	1485	1485bp	rna	Roseomonas gilardii subsp. rosea Ace...	2145	0.0

Figura 12. Principales similitudes encontradas utilizando el algoritmo BLAST¹⁶ entre las secuencias problema (CB08016, CB08035 Y CB08036) y las secuencias de los 16S rDNA depositadas en SILVA¹⁷, la cual contiene secuencias del proyecto LTP, un proyecto encaminado a seleccionar secuencias filtradas o “curadas” de genes ribosomales, es decir, secuencias “tipo” validadas, incrementando la proporción de secuencias de longitud completa, asociadas a su registro en GenBank²⁷, con datos sobre su taxonomía, alineamiento de secuencias múltiples, tipo de cepa y última nomenclatura válida. Por ello, las secuencias de SILVA¹⁷ son de mayor calidad y se utilizan habitualmente para estudios más finos sobre taxonomía.

CB08016 presentó un 99% de identidad con *Marinobacter litoralis* (AF479689), CB08035 fue 98% idéntica a *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* (X67022) y la cepa CB08036 resultó un 98% idéntica a *Roseomonas vinacea* (EF368368).

En base a los resultados obtenidos, se propuso una asignación taxonómica preliminar mostrada en la **Figura 13**.

<p>Superkingdom: Bacteria Phylum: Proteobacteria Class: <u>Gammaproteobacteria</u> Order: <u>Alteromonadales</u> Family: <u>Alteromonadaceae</u> Genus: <u>Marinobacter</u> Specie: <i>Marinobacter litoralis</i> (CB08016) <i>Marinobacter hydrocarbonoclasticus</i> (CB08035)</p>	<p>Superkingdom: Bacteria Phylum: Proteobacteria Class: <u>Alphaproteobacteria</u> Order: <u>Rhodospirillales</u> Family: <u>Acetobacteraceae</u> Genus: <u>Roseomonas</u> Specie: <i>Roseomonas vinacea</i> (CB08036)</p>
--	--

Figura 13. Asignación taxonómica preliminar de los aislados CB08016, CB08035 y CB08036.

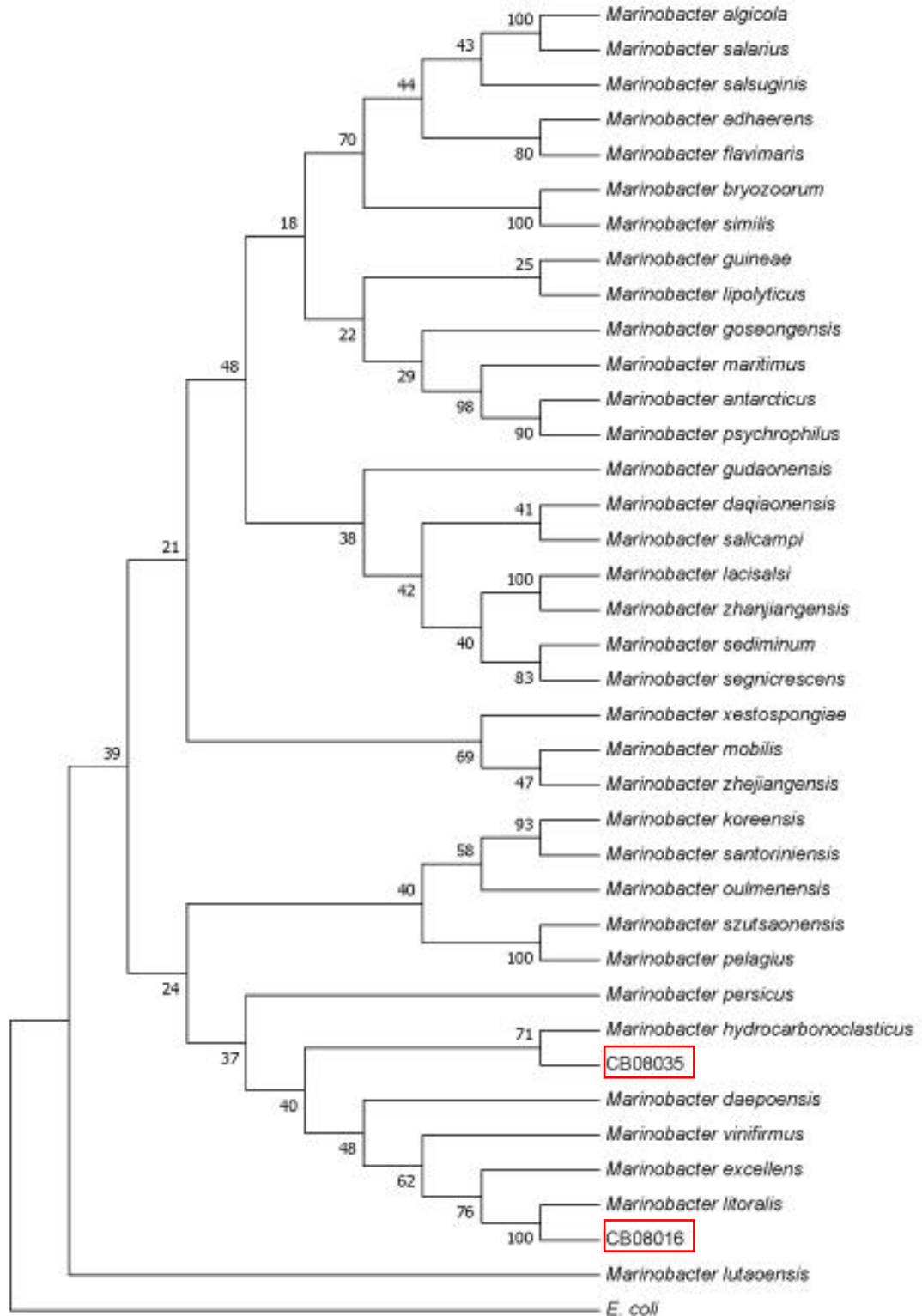


Figura 14. Análisis filogenético de las especies del género *Marinobacter* mostrando la posición de las cepas CB08016 y CB08035. Este análisis fue llevado a cabo con el programa MEGA v7.²⁴ La filogenia fue inferida utilizando el método de máxima verosimilitud (Maximum Likelihood,) basado en el modelo de Tamura-Nei.³³ Se muestra el árbol consenso inferido a partir de 100 réplicas.³⁴ Sobre las ramas se muestran los porcentajes de los árboles en los que se asocian juntos los cluster mostrados. El árbol se dibujó a escala, la longitud de las ramas se relaciona al número de cambios en la secuencia de nucleótidos. Sólo se consideraron los nodos con una representatividad >50%. Se incluyó como grupo externo o *outgroup*, a la secuencia del 16S rDNA de *E. coli* (Z83204) para producir los alineamientos múltiples. Ésta es una cepa relacionada de forma distante con el grupo que se pretende analizar filogenéticamente, que permite el enraizamiento de los árboles resultantes.

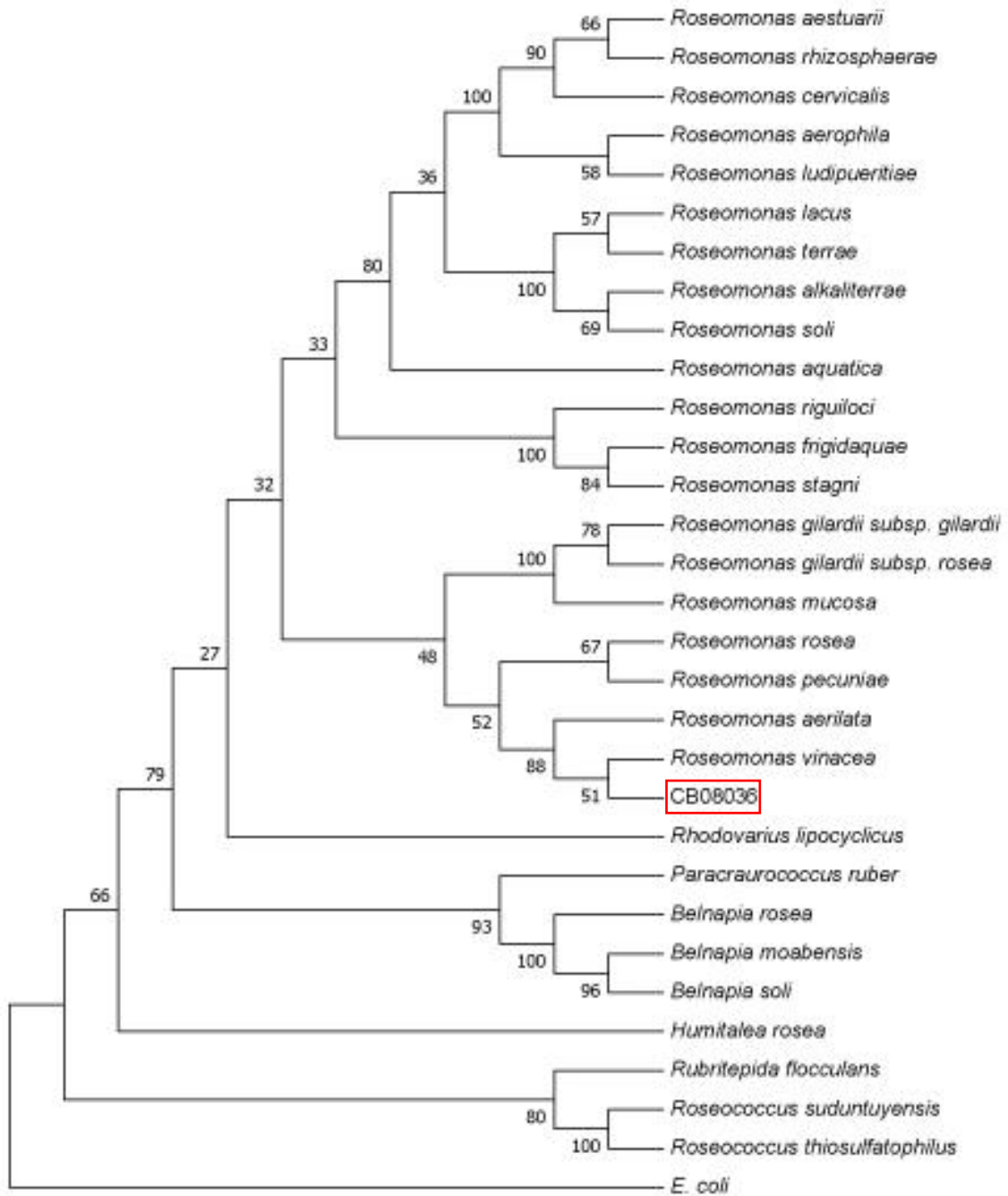


Figura 15. Análisis filogenético de las especies del género *Roseomonas* mostrando la posición de la cepa CB08036. Este análisis se realizó con el programa MEGA v7²⁴. La filogenia fue inferida utilizando el método de máxima verosimilitud (Maximum Likelihood,) basado en el modelo de Tamura-Nei.³³ Se muestra el árbol consenso inferido a partir de 100 réplicas.³⁴Sobre las ramas se muestran los porcentajes de los árboles en los que se asocian juntos los cluster mostrados. El árbol se dibujó a escala, la longitud de las ramas se relaciona al número de cambios en la secuencia de nucleótidos. Sólo se consideraron los nodos con una representatividad >50%. Se incluyó como grupo externo o *outgroup*, a la secuencia del 16S rDNA de *E. coli* (Z83204) para producir los alineamientos múltiples. Ésta es una cepa relacionada de forma distante con el grupo que se pretende analizar filogenéticamente, que permite el enraizamiento de los árboles resultantes.

TABLA 11. Características e interés de los géneros *Roseomonas* y *Marinobacter*.

ESPECIE	CARACTERÍSTICAS	INTERÉS BIOTECNOLÓGICO	REFERENCIA
<i>Roseomonas vinacea</i>	<p>Clase Alphaproteobacteria Cocobacilos gram negativos de alto contenido en G+C (>60%) Metabolismo oxidativo Colonias con pigmentación rosa Colonias que crecen a concentraciones de 0-4% de NaCl.</p>	-----	Yan et al ²⁹
<i>Marinobacter litoralis</i>	<p>Clase Gammaproteobacterias Bacilos gram negativos halotolerantes (2-7% NaCl) Producción de lipopolisacáridos (LPS) capaz de inhibir la motilidad, la producción de pirocianina (factor de virulencia) y la formación de <i>biofilm</i> de <i>Pseudomonas aeruginosa</i></p>	Posible aplicación frente a infecciones por <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .	Sardar et al ³⁰
<i>Marinobacter hydrocarbonoclasticus</i>	<p>Clase Gammaproteobacterias Bacilos gram negativos halotolerantes (2-7% NaCl) Degradación de hidrocarburos (alcanos, ácidos grasos, triglicéridos, etc) debido a su capacidad para formar <i>biofilms</i>.</p>	Interés en estudios de biorremediación de ambientes marinos contaminados, entre otras aplicaciones.	Mounier et al ³¹ Zenati et al ³²

4.2. Estudio químico de la cepa CB08033

El aislado CB08033 (**Tabla 3**) se cultivó en medio líquido. Su extracción con AcOEt, tal y como se indicó en material y métodos, produjo un extracto crudo de 328.4 mg.

Para analizar la complejidad de este extracto se realizaron cromatografías en capa fina y RMN de ¹H. (**Figura 17 y 18**)

Para las CCF se utilizaron dos eluyentes diferentes: Hex:AcOEt 1:1 y CH₂Cl₂:MeOH 9:1 (**Figura 17, A y B** respectivamente).



Figura 16. Proceso de extracción con embudo de decantación.

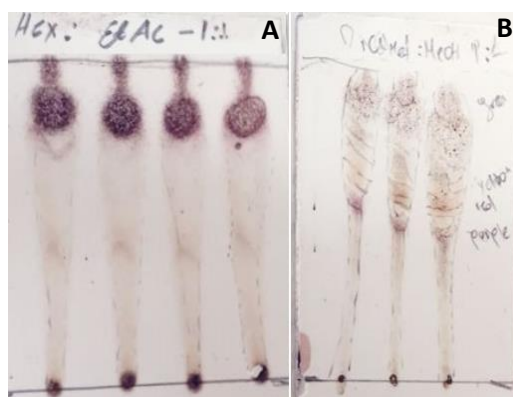


Figura 17. CCF del extracto de CB08033 en Hexano: AcOEt 1:1 (A) y Diclorometano: MeOH 1:1 (B).



Figura 18. Espectro de RMN de ^1H del extracto químico de la cepa CB08033 en CDCl_3 mostrando los principales tipos de compuestos observados. El espectro de RMN de ^1H del extracto crudo indicó la presencia de dicetopiperacinas, además de ácidos grasos y compuestos aromáticos. Las dicetopiperacinas son péptidos cíclicos de pequeño tamaño producidos por bacterias, principalmente gram negativas, y hongos. Debido a que se han descrito múltiples actividades para este tipo de moléculas (antiviral, antitumoral, antifúngica, antibacteriana, etc.)³⁵ su estudio resulta de gran interés.

Por último, el extracto químico de CB08033 fue sometido a un screening para actividad antibacteriana frente a un panel de bacterias gram positivas y negativas (**Tabla 10**). Como se observa en la **Figura 19 (A)**, se obtuvo un halo de inhibición con $1 \mu\text{l}$ de extracto, conteniendo $27 \mu\text{g}$ de crudo, frente a *Pseudomonas aeruginosa*.

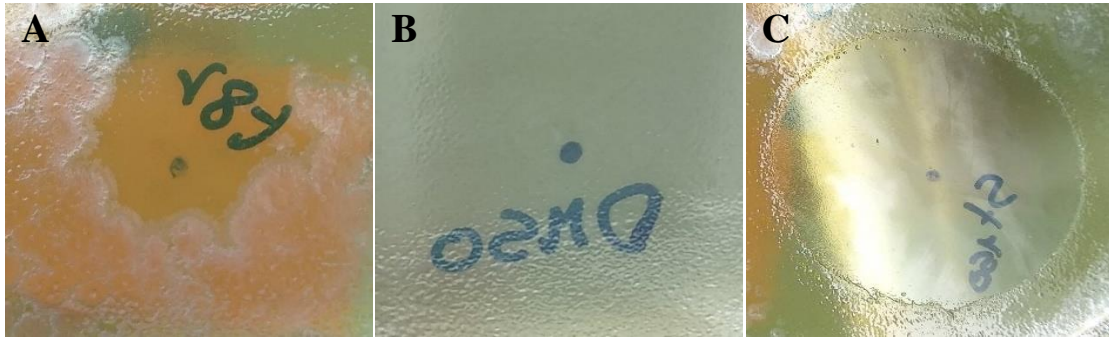


Figura 19. Halo de inhibición producido por 1 μ l del extracto crudo de CB08033 (27 μ g) frente a *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 (A) comparado con el halo producido por 150 μ g del antibiótico control, estreptomicina (C). En B se muestra el efecto, sin halo, del disolvente DMSO.

5. CONCLUSIONES

En este trabajo se han llevado a cabo diferentes técnicas de investigación que han demostrado ser adecuadas para:

1. La identificación de los aislados bacterianos, CB08016, CB08035 y CB08036, mediante la secuenciación de sus genes 16S rDNA, y la asignación preliminar de los citados taxones a las especies *Marinobacter litoralis*, *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* y *Roseomonas vinacea*, respectivamente. Estos resultados se corroboraron mediante su análisis filogenético, utilizando las especies validadas para cada género. La caracterización taxonómica realizada es consistente con la hipótesis de partida, es decir, el aislamiento de bacterias obligadamente marinas.

2. La obtención de un extracto químico de una cepa obligadamente marina no identificada, CB08033, que resultó activo en un ensayo de susceptibilidad antibiótica frente a *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853. Este resultado justificaría el abordaje de la identificación del microorganismo, así como el fraccionamiento bioguiado del mismo para llegar hasta la o las moléculas responsables de la actividad.

3. El trabajo llevado a cabo ha utilizado dos enfoques diferentes encaminados a la búsqueda de metabolitos con una posible aplicación biotecnológica y ha puesto de manifiesto que ambos son complementarios, no excluyentes, e igualmente válidos.

6. BIBLIOGRAFÍA

1. Newma JD and Cragg MG. Natural Products as Sources of New Drugs from 1981 to 2014. *J. Nat. Prod.* 2016; 79: 629-661.
2. Corinaldesi C, Barone G, Marcellini F, Dell'Anno A and Danovaro R. Marine Microbial-Derived Molecules and Their Potential Use in Cosmeceutical and Cosmetic Products. *Mar. Drugs.* 2017; 15 (4):118.
3. Majik M, Parvatkar R., Tilvi S and Gawas S. *Studies in Natural Products Chemistry.* Vol 47. 1st Edition. Chicago. Elsevier; 2016.
4. Boeuf G. Marine biodiversity characteristics. *C. R. Biol.* 2011; 334: 435-440.
5. Fuhrman AJ, Cram AJ and Needham MD. Marine microbial community dynamics and their ecological interpretation. *Nature Rev. Microbiol.* 2015; 13:133-146.
6. Karl MD and Church JM. Microbial oceanography and the Hawaii Ocean time-series programme. *Nature Rev. Microbiol.* 2014; 12: 699-713.
7. Rodríguez González J. Mirando a nuestro entorno productos naturales de origen marino, una perspectiva en el descubrimiento de nuevos fármacos [internet]. Consultado 8 de abril de 2018. *Anales de la Real Sociedad Española de Química.* 2003. Disponible en: [file:///C:/Users/User/Downloads/Dialnet-MirandoANuestroEntorno 637466%20.pdf](file:///C:/Users/User/Downloads/Dialnet-MirandoANuestroEntorno%20.pdf)
8. Letzel AC, Pidot SJ and Hertweck C. A genomic approach to the cryptic secondary metabolome of the anaerobic world. *Nat. Prod. Rep.* 2013; 30: 392-428.
9. Bou G, Fernández-Olmos A, García C, Sáez-Nieto J.A, Valdezate S. Métodos de identificación bacteriana en el laboratorio de microbiología. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2011; 29(8): 601-608.
10. Pace RN, Stahl AD, Lane JD and Olsen JG. *Advances in Microbial Ecology.* 1st Edition. Springer, Boston: Board;1986.
11. Schleifer Heinz K. Classification of Bacteria and Archaea: past, present and future. *Syst Appl Microbiol.* 2009; 32: 533-542.
12. Valenzuela-González F, Casillas-Hernández R, Villalpando E y Vargas-Albores F. The 16S rRNA gene in the study of marine microbial communities. *Ciencias Marinas.* 2015; 41(4): 297-313.
13. Kim M, Oh H-S, Park S-C and Chun J. Towards a taxonomic coherence between average nucleotide identity and 16S rRNA gene sequence similarity for species demarcation of prokaryotes. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2014; 64: 346–351.
14. Chun J and Rainey AF. Integrating genomics into the taxonomy and systematics of the Bacteria and Archaea. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2014; 64: 316-324.
15. Pepper C. The NCBI BioSystems database [base de datos en Internet]. Bethesda (USA): National Library of Medicine, 4 de noviembre de 1988, [n.d; consultado 18 de abril de 2018]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>
16. Altschul S, Madden T, Schäffer A, Zhang J, Zheng Zhang, Webb Miller and Lipman D. Basic local alignment search tool (BLAST) [programa bioinformático]. Bethesda (USA): National Center for Biotechnology Information, 1997, [n.d; consultado 21 de abril de 2018]. Disponible en: <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>
17. Quast C, Pruesse E, Yilmaz P, Gerken J, Schweer T, Yarza P, Peplies J and Glöckner FO. The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools [base de datos en Internet]. *Nucleic Acids Res.* 2013, [n.d; consultado 25 de abril de 2018]. Disponible en: <http://www.arb-silva.de/>
18. Sánchez Leal C.L y Corrales Ramírez L.C. Congelación bacteriana: factores que intervienen en el proceso. *NOVA.* 2005; 3(3): 109-113.
19. Buck JD. Nonstaining (KOH) method for determination of gram reactions of marine bacteria. *Appl Environ Microbiol.* 1982; 44(4): 992-993.
20. Liu D, Coloe S, Baird R and Pedersen J. Rapi Mini- Preparation of Fungal DNA for PCR. *J Clin Microbiol.* 2000; 38(1): 471.
21. Weisburg GW, Barns MS, Pelletier AD and Lane JD. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *J Bacteriol.* J1. 1991; 173(2): 697-703.

22. DNA Sequence Assembler v4. Heracle BioSoft (Germany). [Programa bioinformático]. 2013. Consultado 29 de abril de 2018. Disponible en: <http://www.dnabaser.com/index.html>
23. Sievers F, Wilm A, Dineen D, Gibson TJ, Karplus K, Li W, Lopez R, McWilliam H, Remmert M, Söding J, Thompson JD and Higgins DG. Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega [Programa bioinformático]. *Mol Syst Biol.* 2011 [n.d; consultado 2 de mayo de 2018]. Disponible en: <https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>
24. Kumar S, Stecher G, and Tamura K. Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets (MEGA7) [Programa bioinformático]. *Mol Biol Evol.* julio 2016 [n.d; consultado 4 de mayo de 2018]. Disponible en: <https://www.megasoftware.net/home>
25. Barrera F. MestRe Nova. [Software informático]. *J. AM. CHEM. SOC.* 2009. [n.d; consultado 29 de mayo de 2018]. Disponible en: <http://www.mestrelab.com>.
26. Matuschek E, Brown D.F.J and Kahlmeter G. Development of the EUCAST disk diffusion antimicrobial susceptibility testing method and its implementation in routine microbiology laboratories. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2014; 20(4): 255-266.
27. Benson D, Karsch-Mizrachi I, Lipman D, Ostell J and Wheeler D. GenBank [base de datos en Internet]. Bethesda (USA): National Center for Biotechnology Information, enero 2005, [n.d; consultado 10 de mayo de 2018]. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>
28. Servidor de la ULL. [Internet]. González J.M. Secuencias actualizadas a febrero de 2017. Consultado 15 de mayo de 2018. Disponible en: <http://fresita.microbiologia.ull.es/blastrrna.html>
29. Yan Z-F, Lin P, Li C-T, Kook M, Wang Q-J and Yi T-H. *Roseomonas hibiscisoli* sp. nov., isolated from the rhizosphere of Mugunghwa (*Hibiscus syriacus*). *Int J Syst Evol Microbiol.* 2017; 67(8): 2873-2878.
30. Sardar Raj K, Kavita K, and Jha B. Lipopolysaccharide of *Marinobacter litoralis* inhibits swarming motility and biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa* PA01. *Carbohydr Polym.* 2015; 123: 468-475.
31. Mounier J, Camus A, Mitteau I, Vayse P-J, Goulas P, Grimaud R and Sivadon P. The marine bacterium *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* SP17 degrades a wide range of lipids and hydrocarbons through the formation of oleolytic biofilms with distinct gene expression profiles. *FEMS Microbiol Ecol.* 2014; 90: 816-831.
32. Zenati B, Chebbi A, Badis A, Eddouaouda K, Boutoumi H, El Hattab M et al. A non-toxic microbial surfactant from *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* SdK644 for crude oil solubilization enhancement. *Ecotoxicol Environ Saf.* 2018; 154: 100-107.
33. Tamura K and Nei M. Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Mol Biol Evol.* 1993; 10(3):512-526.
34. Felsenstein J. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution.* 1985; 39(4):783-791.
35. Martins-Teixeira M and Carvalho I. Diketopiperazines: Biological Activity and Synthesis. *Tetrahedron.* 2007; 63:9923-9932.