

# ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE LAS BACTERIAS DEL GÉNERO *PSEUDOALTEROMONAS*

Fernando Mesías Recamán.

e- mail: fernando\_bio\_91@hotmail.com

## Resumen

Trabajo Fin de Grado

Tutora:

- Carmen Siero Vázquez

Departamento de Biología

Funcional y Ciencias de la Salud

Facultad de Biología

Universidad de Vigo.

En este trabajo se revisa la capacidad de las bacterias del medio marino para sintetizar nuevos productos bioactivos. En particular, se estudia la facultad de las especies del género *Pseudoalteromonas* para producir nuevos compuestos antimicrobianos, haciendo especial hincapié en la actividad antifúngica de la especie *P. tunicata*. Dicha actividad se relaciona con la producción de enzimas quitinolíticas cuyas características y posibles aplicaciones se incluyen en la última parte del trabajo.

**Palabras clave:** *Pseudoalteromonas*, productos bioactivos, quitinasas, actividad antifúngica

## INTRODUCCIÓN

### Búsqueda de nuevos compuestos bioactivos.

Actualmente, existe la necesidad de encontrar nuevos principios activos que nos ayuden a solucionar muchas de las enfermedades que hoy se consideran incurables (León *et al.*, 2010). Para lograr este objetivo se está explorando el medio marino, ya que es conocido por albergar una enorme diversidad de comunidades microbianas (Ballestrero *et al.*, 2010) que se consideran fuente de numerosos metabolitos bioactivos, pero que todavía no han sido estudiados en su totalidad. Esta enorme diversidad de microorganismos productores de sustancias bioactivas comprende a bacterias, hongos, fitoplancton, algas mayores y algunos invertebrados (León *et al.*, 2010).

Otro problema que se podría solucionar encontrando nuevos compuestos bioactivos es el que comprende a bacterias resistentes a antibióticos. Hasta la actualidad, estas bacterias podían ser eliminadas de nuestro organismo utilizando los antibióticos actualmente conocidos, pero a causa de su uso indiscriminado, algunos microorganismos se han vuelto resistentes, por lo que surge la necesidad de encontrar nuevos medicamentos que las eliminen. Debido a la aparición de enfermedades emergentes o reemergentes que necesitan un tratamiento, también se hace patente la necesidad de encontrar nuevos compuestos bioactivos (León *et al.*, 2010). Las personas inmunocomprometidas pueden ser víctimas de patógenos oportunistas, ya que son más sensibles frente a infecciones, por lo que también necesitan un tratamiento eficaz (León *et al.*, 2010).

Los posibles nuevos compuestos podrían ser utilizados además como parte de complementos nutricionales, en cosméticos, como biocatalizadores, en la industria química o en agroquímica (León *et al.*, 2010).

Los microorganismos marinos, muchos de ellos todavía desconocidos (Rappe & Giovannoni 2003) son buscados en el agua de mar, en los sedimentos y como epibiontes de hospedadores eucariotas tales como peces, algas pluricelulares e invertebrados marinos como esponjas, tunicados, moluscos, cnidarios, crustáceos y protocordados (Holmström & Kjelleberg 1999; León *et al.* 2010).

Muchas de estas bacterias marinas son especies del género *Vibrio*, *Pseudomonas*, *Flavobacterium*, *Bacillus*, *Micrococcus*, *Cytophaga*, (León *et al.* 2010) y/o *Pseudoalteromonas* (Holmström *et al.*, 2002), además de hongos como *Penicillium* (Gómez-Guiñán *et al.*, 2003).

Las especies del género *Pseudoalteromonas* son especialmente interesantes, ya que muchos estudios indican la producción de compuestos extracelulares bioactivos (Holmström & Kjelleberg, 1999) capaces de producir sustancias antibacterianas, antiincrustantes, antifúngicas y/o algicidas con diversas aplicaciones (León *et al.*, 2010).

**Bacterias del género *Pseudoalteromonas* como productoras de compuestos bioactivos.**

Las bacterias marinas del género *Pseudoalteromonas* son de gran interés porque producen una gran cantidad de compuestos que les ayudan en la competencia por nutrientes y en la colonización de superficies, siendo así una característica poco usual y preponderante de estas bacterias (Holmström & Kjelleberg, 1999).

Las actuales especies de *Pseudoalteromonas* estaban incluidas dentro del género *Alteromonas*, pero dicha clasificación fue revisada tomando como base el trabajo de Gauthier *et al.*, 1995, de manera que *Alteromonas* se dividió en dos géneros: *Alteromonas* y el nuevo género *Pseudoalteromonas*.

Son bacterias únicamente marinas que se han aislado en muchos lugares del mundo, encontrándose por lo tanto ampliamente distribuidas en este medio (Skovhus *et al.*, 2004). Sus principales hospedadores son eucariotas como mejillones (Ivanova *et al.*, 1998), vieiras (Coton, 2013), peces globo, tunicados (Holmström *et al.*, 1999), esponjas (Ivanova *et al.*, 1998) y gran cantidad de algas marinas (Akagama-Matsushita *et al.*, 1992; Yoshikawa *et al.*, 1997). Su amplia distribución por las aguas de todo el mundo induce a pensar que presentan numerosas y diferentes adaptaciones muy eficientes. Tanto es así, que para competir por los nutrientes, por el espacio y como defensa contra sus depredadores poseen actividad bacteriolítica, antifúngica, antiincrustante y algicida (Holmström and Kjelleberg, 1999). Todos los compuestos responsables de estas actividades son posiblemente sintetizados para desplazar a los demás microorganismos que forman parte del biofilm, que es la estructura en la que viven mayoritariamente las bacterias marinas (Mai-Prochnow *et al.*, 2004).

Las reacciones mutualistas también existen en este género, en donde *Pseudoalteromonas* produce sustancias para el beneficio de los organismos a los que coloniza. Muchos de estos organismos son algas como *Ulva lactuca* o *Enteromorpha intestinalis* o cordados como *Ciona tunicata*, que por sí mismos no producen ninguna sustancia antiincrustante, pero gracias a la acción de estas y otras bacterias epibiontes que habitan en su superficie sí adquieren esta propiedad (Holmström *et al.*, 2002).

*Pseudoalteromonas* presenta alrededor de treinta especies diferentes que tienen como características distintivas principales el ser bacterias encontradas en asociación con eucariotas marinos y el ser productoras de gran cantidad de metabolitos con diversas funciones, las cuales se muestran en la siguiente tabla (Tabla 1) (Holmström & Kjelleberg, 1999).

**Tabla 1.** Actividades de interés aplicado de diferentes especies del género *Pseudoalteromonas*

Actividad	Bacterias
<b>Antibacteriana</b>	<i>P. tunicata</i> <i>P. luteoviolacea</i> <i>P. rubra</i>
<b>Agarolítica</b>	<i>P. agarolyticus</i> <i>P. atlantica</i> <i>P. antartica</i>
<b>Algicida</b>	<i>Pseudoalteromonas sp.</i>
<b>Antiincrustante</b>	<i>P. tunicata</i>
<b>Antifúngica</b>	<i>P. tunicata</i>

El genoma de distintas cepas de *Pseudoalteromonas* ya ha sido total o parcialmente secuenciado (Holmström & Kjelleberg, 1999), aunque son todavía pocos los genes de esta bacteria que se han estudiado.

De entre todas las bacterias de este género, *P. tunicata* es una de las especies con mayor potencial antimicrobiano (Holmström et al., 2002) y es por ello que es objeto de numerosos estudios.

***Pseudoalteromonas tunicata***

*Pseudoalteromonas tunicata* es una de las especies que produce más metabolitos secundarios/compuestos bioactivos y, por tanto, posiblemente la que más propiedades antimicrobianas presenta.

*P. tunicata*, como las demás *Pseudoalteromonas*, es una bacteria marina gram negativa, flagelada, heterotrófica y no fermentativas (Holmström & Kjelleberg, 1999). Ha sido aislada en las costas de Suecia cuyo hábitat era la superficie de un tunicado que vivía a 10 m de profundidad (Holmström & Kjelleberg, 1999). Además de vivir como epibionte de tunicados, también lo es de muchos otros organismos superiores (Skovhus et al., 2004).

Esta bacteria se caracteriza por producir un pigmento de color marrón verdoso (Figura 1) que le confiere un color característico a sus colonias, aunque ocasionalmente es susceptible de sufrir mutaciones que son detectadas por el color blanco de las mismas.



Figura 1. Cultivo en placa en medio agar marino de una cepa de *P. tunicata*

Las mutaciones responsables de este cambio de color parecen estar relacionadas con la actividad antifúngica de esta bacteria (Egan et al., 2002).

En *P. tunicata* se habían caracterizado ya algunas moléculas efectivas frente a algas, larvas, bacterias y en menor medida frente a hongos (Holmström et al., 2002). Sin embargo, más recientemente (Sivasubramanian et al., 2011) se ha demostrado que diversas especies del género *Pseudoalteromonas* inhiben el crecimiento de diferentes hongos. Este efecto se pudo observar en un experimento de antagonismo microbiano en donde se enfrentó una cepa de la especie *P. tunicata* con el hongo *Aspergillus niger*. En la Figura 2 se aprecia claramente como *P. tunicata* inhibe el desarrollo del hongo objeto de estudio (A) si lo comparamos con la placa control (B) en la que este se desarrolla en ausencia de la bacteria.

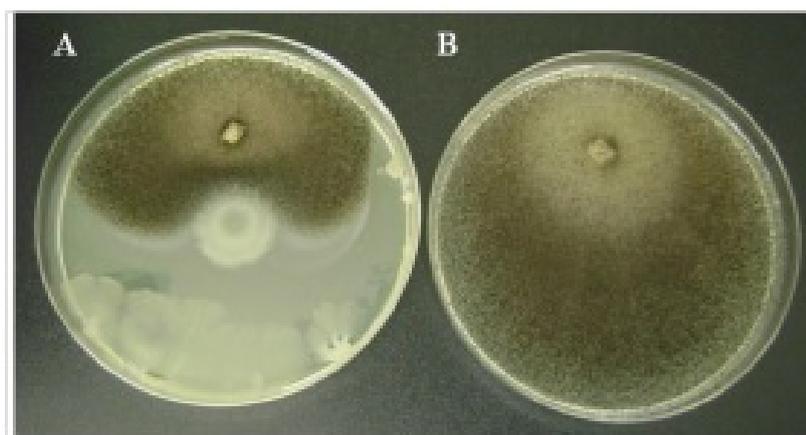


Figura 2. Ensayo de antagonismo microbiano entre *A. niger* y *P. tunicata*. (A): Inhibición de *A. niger* por *P. tunicata*. (B): Control mostrando el crecimiento de *A. niger* en ausencia de la bacteria.

La inhibición observada sobre el crecimiento de los hongos puede deberse, en gran medida, a la producción de diversas enzimas quitinolíticas por parte de *P. tunicata*. De hecho, el análisis de su genoma, ha puesto de manifiesto la presencia de varias secuencias que podrían codificar distintas quitinasas.

### Aplicaciones de las enzimas quitinolíticas: quitinasas como antifúngicos

Las quitinasas (EC 3.2.1.14) son enzimas capaces de hidrolizar los enlaces glucosídicos  $\beta$ -1,4 del polisacárido quitina, dando lugar a oligómeros y/o monómeros estructurales de  $\beta$ -1,4 N-acetil-D-glucosamina. Están presentes en gran variedad de organismos, tales como bacterias, hongos, plantas, insectos, mamíferos y virus (Shirai, 2006).

El sustrato sobre el que actúan es la quitina (Figura 3) que es un polisacárido formado por monómeros de N-acetil-D-glucosamina unidos por enlaces glucosídicos  $\beta$ -1,4 de carácter covalente y ampliamente distribuida en la naturaleza, siendo el segundo biopolímero más abundante después de la celulosa.

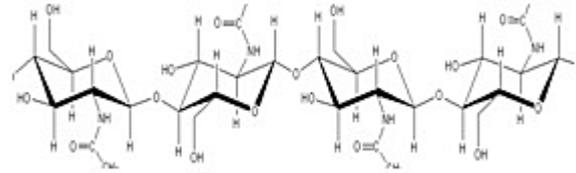


Figura 3. Estructura molecular del biopolímero de quitina

Está presente en el exoesqueleto de artrópodos, en nematodos, anélidos, en los caparzones de crustáceos, braquiópodos y en la pared celular de muchos hongos como ascomicetos, basidiomicetos, fomicetos e imperfectos. También está presente en algas clorofíceas, diatomeas y algunos tunicados (Shirai, 2006).

#### Clasificación de las quitinasas

Las quitinasas se incluyen dentro de dos familias de glicosilhidrolasas: familia 18 y familia 19, clasificación realizada por Henrissat y Bairoch (Henrissat & Bairoch, 1993). Las quitinasas de la familia 18 poseen un dominio común formado por ocho  $\alpha$ -hélices y ocho láminas plegadas  $\beta$ . Su amplia distribución comprende a bacterias, hongos, virus, mamíferos, insectos y plantas (Shirai, 2006). Su modo de acción se caracteriza por romper los enlaces glucosídicos  $\beta$ -1,4 (Shirai, 2006), hidrolizando concretamente los enlaces GlcNAc-GlcNAc y GlcNAc-GlcN (Watanabe *et al.*, 1999). Son sensibles a la alosamidina, sustancia análoga de la quitina y potencialmente inhibidora de estas quitinasas (Shirai, 2006).

Las quitinasas de la familia 19 son menos comunes, encontrándose en plantas, en algunas cepas del género *Streptomyces* (Shirai, 2006), *Vibrio*, *Aeromonas* (Kojima *et al.*, 2005) y en *Pseudoalteromonas*, entre otras especies. Estas enzimas se parecen a lisozimas y a quitosanasas, en donde su dominio catalítico presenta ocho  $\alpha$ -hélices (Shirai, 2006). Hidrolizan los enlaces GlcNAc-GlcNAc y GlcN-GlcNAc (Watanabe *et al.*, 1999) y no son sensibles a la alosamidina (Shirai, 2006).

Las quitinasas también son clasificadas en función del lugar en el que ejercen su acción hidrolítica dentro de la cadena polisacárida de quitina, pudiendo ser endoquitinasas y exoquitinasas. Las endoquitinasas (EC 3.2.1.14) cortan la quitina en zonas interiores del polisacárido, generando oligómeros de N-acetilglucosamina de bajo peso molecular (Shirai 2006). Las exoquitinasas, se pueden dividir a su vez en quitobiosidasas (EC 3.2.1.29) que liberan diacetilquitobiosa del extremo no reductor de la cadena de quitina, y en  $\beta$ -(1,4) N acetilglucosaminidasas (EC 3.2.1.30) que liberan productos oligoméricos de N-acetilglucosamina (Dahiya *et al.*, 2006). Algunas quitinasas también poseen actividad lisozima (EC 3.2.1.17) (Shirai, 2006) de forma que son capaces de romper la pared de peptidoglucano de las bacterias.

#### Funciones de las quitinasas en la naturaleza

En la naturaleza las quitinasas tienen funciones variadas. Los microorganismos del medio marino las utilizan para obtener alimento a partir de la quitina del zooplancton y de los exoesqueletos de animales, porque el medio marino es deficiente en fosfato y limitado en carbono y nitrógeno, por lo que necesitaron desarrollar algún mecanismo para obtener alimento. Debido a esta necesidad, los microorganismos degradan la quitina con una eficacia mucho mayor que animales y plantas. Además, son utilizadas para inhibir el desarrollo de hongos y de microorganismos en los biofilms, lo que les atribuye gran ventaja a los microorganismos que las poseen. Otras funciones que las quitinasas tienen en la naturaleza son estar implicadas en el crecimiento de hifas, como mecanismos de defensa frente a patógenos o al estrés

abiótico, además de que son utilizadas como mecanismo de parasitación de otros organismos. En muchas plantas las quitinasas inhiben el desarrollo de hongos y actúan en las semillas, estambres, flores y tubérculos, en donde son sintetizadas para defenderse contra el ataque de fitopatógenos. En los insectos, cuyo exoesqueleto es de quitina, las quitinasas son de gran utilidad para la ecdisis (Shirai, 2006).

### Aplicaciones de las quitinasas

Una vez conocida la utilidad de las quitinasas en los seres vivos se observó que estas enzimas tienen gran cantidad de aplicaciones (Duo-Chuan, 2006), destacando entre ellas la capacidad de degradar la pared celular de los hongos, ya que está compuesta por quitina (Felse *et al.*, 1999). Esta característica es muy importante para impedir el desarrollo de hongos patógenos productores de graves problemas de salud, para los cuales no siempre hay medicamentos eficaces. Dentro de esta línea también podría ser importante su uso en agricultura, para fabricar biopesticidas e impedir el desarrollo de hongos fitopatógenos que provocan enfermedades a plantas, a veces incurables. Otra de sus aplicaciones es impedir la propagación de enfermedades cuyos vectores son insectos, porque las quitinasas actúan sobre el exoesqueleto de sus huevos, impidiendo su desarrollo (Holmes *et al.*, 1965).

La rotura de la quitina por estas enzimas genera gran variedad de quitoooligosacáridos bioactivos con aplicación en medicina, farmacia, cosmética y en la industria química (Dahiya *et al.*, 2006). También se utilizan para la bioconversión de quitina en SPC útil para la industria alimentaria, para el tratamiento de enfermedades en acuicultura, para el aislamiento de protoplastos fúngicos importantes en investigación, (Dahiya *et al.*, 2006) para tecnologías de antiincrustación, para impedir el desarrollo de blooms fitoplanctónicos que generen toxicidad (Holmström & Kjelleberg, 1999) y para reforzar las defensas de las plantas (Shirai, 2006).

## BIBLIOGRAFÍA

- AKAGAWA-AKAGAWA-MATSUSHITA, M., Matsuo, M., Koga, Y., Yamasato, K. (1992). ALTEROMONAS ATLÁNTICA SP. NOV. and Alteromonas caraageenovora sp. nov., bacteria that compose algal polysaccharides. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 42: 621-627.
- Ballestriero, F., Thomas, T., Burke, C., Egan, S., Kjelleberg, S. (2010). Identification of Compounds with Bioactivity against the Nematode *Caenorhabditis elegans* by Screen Base don the Functional Genomics of de Marine Bacterium *Pseudoalteromonas tunicata* D2. *Appl Environ Microbiol.* 17: 5710-5717.
- Coton, M., Joffraud, J.J., Mekhtiche, L., Lerio, F., Coton, E. de (2013). Biodiversity and dynamics of the bacterial community of packaged king scallop (*Pecten maximus*) meat during cold storage. *Food Microbiol.* 35(2): 99-107
- Dahiya, N., Tewari, R., Hoondal, G.S. (2006). Biotechnological aspects of chitinolytic enzymes: a review. *Appl Microbiol Biotechnol.* 71: 773-82.
- Duo-Chuan, L. (2006). Review of fungal chitinases. *Mycopathol* 161: 345-360.
- Felse, P.A., Panda, T. (1999). Regulation and cloning of microbial chitinase genes. *Appl Microbiol Biotechnol.* 51: 141-151.
- Gauthier, G., Gauthier, M. Christen, R. (1995). Phylogenetic analysis of the genera *Alteromonas*, *Shewanella* and *Moritella* using genes coding for small-subunit rRNA sequences and división of the genus *Alteromonas* into two genera, *Alteromonas* (emended) and *Pseudoalteromonas* gen. Nov., and proposal of twelve new species combinations. *Int. J. Syst-Bacteriol.* 45: 755-761.
- Gómez-Guiñán, Y., Hidalgo, J., Jiménez, M., Salcedo, J. (2003). Obtención de extractos orgánicos con actividad antimicrobiana a partir de *Penicillium* sp. (Moniliales) aislado de la esponja *Ircinia felix* (porífera: Demospongiae). *Rev Biol Trop.* 51: 141-147.
- Holmes, P.K., Dundas, I.E., Halvorson, H.O. (1965). *J. Bacteriol.* 90: 1159-1160.

- Holmström, C., Kjelleberg, S. (1999). Marine Pseudoalteromonas species are associated with higher organisms and produce biologically active extracellular agents. *Microbiol Ecol.* 30: 285-293.
- Holmström, C., Egan, S., Franks, A., McCloy, S., Kjelleberg, S. (2002). Antifouling activities expressed by marine surface associated Pseudoalteromonas species. *Microbiol Ecol.* 41: 47-58.
- Henrissat, B.I., Bairoch, A. (1993). New families in the classification of glycosyl hydrolases base don amino acid secuencia similarities. *Biochem J.* 293: 781-788.
- Ivanova, E., Kiprianova, E., Mikhailov, V., Levanova, G., Garagulya, A., Gorschkova, N., Vysotskii, M., Nicolau, D., Yumoto, N., Taguchi, T. Yoshikawa, S. (1998). Phenotypic diversity of Pseudoalteromonas citrea from different marine hábitats and emendation of the description. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 48: 247-256.
- Kojima, M., Yoshikawa, T., Ueda, M., Nonomura, T., Matsuda, Y., Toyoda, H., Miyatake, K., Arai, M., Fukamizo, T. (2005). Family 19 Chitinase from Aeromonas sp. No.10S-24: Role of Chitin-Binding Domain in the Enzymatic Activity. *J. Biochem.* 137: 235-242.
- León, J., Liza, L., Soto, Isela., Torres, M., Orosco, A. (2010) Bacterias productoras de compuestos antibacterianos aisladas a partir de invertebrados intermareales. *Rev Perú Med Exp Salud Pública.* 27: 215-221.
- Mai-Prochnow, A., Evans, F., Dalisay-Saludes, D., Stelzer, S., Egan, S., James, S., Webb, J.S., Kjelleberg, S. (2004). Biofilm Development and Cell Death in the Marine Bacterium Pseudoalteromonas tunicata. *Appl and Environ Microbiol.* 70: 3232-3238.
- Rappe, M., Giovannoni, S. (2003). The uncultured microbial majority. (2003). The uncultured microbial majority. *Annu Rev Microbiol.* 57: 369-394.
- Sivasubramanian, K., Ravichandran, S., Vijayapriya, M. (2011). Antagonistic activity of marine bacteria Pseudoalteromonas tunicata against microbial pathogens. *Afric J. Microbiol.* 5: 562-567.
- Shirai, K. (2006). Fungal chitinases. In: Gerardo, R., Torres, I. (Eds). *Advances in Agricultural and Food Biotechnology*. Kerala: Research Signpost, pp. 289-304.
- Skovhus, T., Ramsing, N., Holmström, C., Kjelleberg, S., Dahllöf, I. (2004). Real-time quantitative PCR for assessment of abundance of Pseudoalteromonas species in marine samples. *Appl Environ Microbiol.* 70: 2373-2382.
- Watanabe, T., Kanai, R., Kawase, T., Tanabe, T., Mitsutomi, M., Sakuda, S., Miyashita, K. (1999). Family 19 chitinases of Streptomyces species: characterization and distribution. *Microbiol.* 145: 3353-3363.
- Yoshikawa, K., Takadera, T., Adachi, Nishijima, M., Sano, H. (1997). Koromicin, a novel antibiotic specifically active against marine Gram-negative bacteria, produced by a marine bacterium. *J Antibiot.* 50: 949-953.