

Informe final publicable de proyecto

Búsqueda de actividades de interés agrícola a partir de cepas de *Streptomyces* spp. aisladas en Uruguay.

Código de proyecto ANII: FCE_3_2018_1_148941

31/01/2022

CROCE PAULLIER, Valentina María (Responsable Técnico - Científico)

MOYNA BORTHAGARAY, Guillermo (Investigador)

PIANZZOLA ALVAREZ, María Julia (Investigador)

SALINAS GRECCO, Gustavo (Investigador)

SIRI TOMÁS, María Inés (Investigador)

FERRANDO MAGNABOSCO, Lucía (Investigador)

LAPAZ EUGUI, María Inés (Investigador)

UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA. FACULTAD DE QUÍMICA (Institución Proponente) \\
FACULTAD DE QUÍMICA. FUNDACIÓN PARA EL PROGRESO DE LA QUÍMICA \\
INSTITUTO PASTEUR DE MONTEVIDEO \\
UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA. CENTRO UNIVERSITARIO REGIÓN LITORAL NORTE

Resumen del proyecto

El presente proyecto permitió la caracterización de una colección de cepas de *Streptomyces* aisladas en Uruguay en cuanto a su potencial de producción de metabolitos bioactivos. El género *Streptomyces* viene siendo estudiado desde hace ya varias décadas debido a su reconocida versatilidad metabólica y capacidad de producción de enzimas y metabolitos con diversas actividades de interés. En este proyecto, se optimizaron nuevas metodologías de screening de actividades como lo son la actividad nematocida y de promoción de crecimiento vegetal. Se identificaron 17 cepas uruguayas locales con actividad nematocida y se profundizó en la identificación de los metabolitos responsables en algunas de estas cepas abordando los enfoques genómico y metabolómico. Los estudios metabolómicos implicaron el uso de bases de datos que permitieron identificar compuestos ya reportados. Los resultados obtenidos permitieron contar con listas de compuestos conocidos relacionados con los producidos por nuestras cepas y además revelaron una alta proporción de estructuras químicas desconocidas. En cuanto a los estudios de minería genómica, se encontraron varios BGCs de diversos tipos entre las cepas analizadas, donde la mayoría presentan nula o muy baja similitud con otros BGCs reportados, evidenciando la existencia BGCs desconocidos. Por su parte, también se identificaron varias cepas con propiedades de actividad promotora de crecimiento vegetal, como lo son la producción de compuestos que solubilizan el fósforo, la producción de sideróforos y la producción de hormonas vegetales. La ejecución de este proyecto fue clave para la optimización de nuevos métodos de screening de actividad realizados, los cuales serán de gran utilidad para futuros proyectos. Además, se cuenta con un repertorio de cepas con actividad, y se plantea la hipótesis de la existencia de nuevos metabolitos producidos por cepas locales. Como perspectiva, se plantea trabajar en la búsqueda de nuevos metabolitos microbianos implicados en las actividades encontradas.

Ciencias Agrícolas / Biotecnología Agropecuaria / Biotecnología Agrícola y Biotecnología Alimentaria / Microbiología

Palabras clave: *Streptomyces* / Metabolitos secundarios bioactivos / promoción de crecimiento vegetal /

Introducción

Antecedentes

Desde el año 2009 nuestro grupo estudia el género bacteriano *Streptomyces*, habiendo generado una colección de 235 cepas de este género aisladas en Uruguay a partir de suelo y tubérculos de papa. A partir de esta colección se identificaron 85 cepas patógenas de papa responsables de la enfermedad conocida como sarna común (Lapaz, 2014; Lapaz et al., 2017). La MSc. María Inés Lapaz realizó su tesis doctoral, enfocada en la identificación de los determinantes de patogenicidad en las especies patógenas identificadas. Debido al reconocido potencial de producción de compuestos bioactivos del género *Streptomyces*, fue muy relevante iniciar estudios en esta temática, abarcando el resto de la colección de cepas previamente generada. En el período 2017-2019 nuestro grupo tuvo en marcha el Proyecto CSIC "Integración de la minería genómica y la metabolómica para descifrar el potencial de metabolitos bioactivos en cepas de *Streptomyces* de Uruguay" (responsable Dra. María Julia Pianzola). Este proyecto permitió dar paso inicial en el estudio de esta temática abarcando dos enfoques bastante actuales y complementarios (minería genómica y metabolómica) para investigar el potencial de producción de compuestos bioactivos en la colección de cepas de *Streptomyces* disponible. El presente proyecto permitió continuar las investigaciones en esta temática, en el marco de la Tesis de doctorado de la responsable científica del mismo.

En primer lugar, se trabajó en colaboración con el Dr. Guillermo Moyna del Departamento de Química del Litoral de Paysandú para la determinación de los perfiles metabolómicos por RMN de los sobrenadantes de cultivo de las cepas de *Streptomyces* de la colección. Como uno de los resultados, estos estudios nos han permitido confirmar la diferenciación entre las cepas de *Streptomyces* patógenas y las que no lo son. De las 235 cepas de la colección, 150 fueron clasificadas como no patógenas y fueron las cepas utilizadas en este proyecto como punto de partida (Croce et al., 2021). Además, previamente y en el marco de las Tesis de Maestría en Química del QF. Martín Pérez, las mismas fueron caracterizadas en base a su actividad antimicrobiana contra diversos microorganismos patógenos humanos y de plantas. Se utilizaron como bacterias indicadoras de patogenicidad en humanos cepas de referencia de *E. coli*, *P. aeruginosa*, y *S. aureus*; y de patogenicidad en plantas *C. michiganensis*, *X. vesicatoria*, y *R. solanacearum*); y en cuanto a los hongos, se utilizó la levadura *C. albicans*, y los hongos fitopatógenos *A. alternata*, *A. carbonarius* y *F. graminearum*. Como resultados de este

screening (sobre el total de la colección) se han encontrado 172 cepas con actividad antagonista frente al menos una de las bacterias indicadoras, lo que representa el 73 % de la colección. Los datos de actividad antifúngica obtenidos en el screening de la colección mostraron que 86 cepas de *Streptomyces* tienen actividad frente al menos uno de los hongos evaluados, lo que corresponde a un 36% del total de cepas de la colección (Tesis Martín Pérez, en preparación).

Abordaje y descripción del proyecto

El objetivo general de este Proyecto fue evaluar el potencial de producción de metabolitos bioactivos a partir de una colección de cepas del género *Streptomyces* aisladas de campos uruguayos. Los resultados obtenidos como consecuencia del screening de actividad antimicrobiana junto con el reconocido potencial de las cepas de *Streptomyces* como agentes agrobiológicos de importancia constituyeron el punto de partida del presente Proyecto. En esta propuesta, se ampliaron las actividades evaluadas, incluyendo la actividad nematicida y de promoción de crecimiento vegetal para la caracterización de las cepas de *Streptomyces* de nuestra colección. A través de este Proyecto se apuntó a desarrollar herramientas y capacidades de investigación que permitan abordar el estudio del género *Streptomyces* con una visión más amplia.

Está demostrado que este género bacteriano representa una valiosa fuente de metabolitos secundarios bioactivos con aplicaciones muy diversas. Desde el descubrimiento de la estreptomina, se han reportado muchos antibióticos y sustancias bioactivas obtenidas a partir de cultivos de *Streptomyces* spp.; muchos de ellos juegan un importante rol en salud humana, y también en el área industrial y agraria. El género *Streptomyces* produce compuestos con diversas actividades biológicas tales como: agentes antagonistas (antibacterianos, antifúngicos, antiprotazoarios y antivirales), agentes agrobiológicos (insecticidas, pesticidas y herbicidas) y compuestos con actividades reguladoras (factores de crecimiento, sideróforos o agentes morfogenéticos) (García et al., 2000; Nunes et al., 2005). Dada su reconocida capacidad de sobrevivir y competir exitosamente a nivel del suelo y de la rizósfera de las plantas, las bacterias del género *Streptomyces* también son utilizadas como agentes biocontroladores en varios cultivos de interés agrícola (Tamreihao et al., 2016). Esto se atribuye a su gran capacidad de secretar una variedad de enzimas degradadoras de la pared vegetal de hongos y de exoesqueletos de insectos, y promover interacciones simbióticas con plantas. En este campo, la protección de los cultivos contra insectos y nematodos es una importante área para explorar. Se han descrito al menos 20 compuestos que poseen actividad insecticida (Kaur y Manhas, 2014) o nematicida (Rashad et al., 2015; Yang et al., 2013). Sin embargo, la identificación de estos compuestos activos ha sido descuidada debido en cierta medida a que no son atractivos para la investigación farmacéutica (Rey y Dumas, 2017).

Actualmente, existen 4 cepas de *Streptomyces* (*S. lydicus* WYEC108, *S. violaceusniger* YCED9, *S. griseoviridis* K61, and *S. saraceticus* KH400) que constituyen 6 preparaciones comerciales para el control de enfermedades de suelo (Sasikumar et al., 2013). Entre ellas se encuentran los productos Actino-vate® (*S. lydicus* WYEC 108) y Mycostop® (*S. griseoviridis* K61) restringidos a tratamientos de suelo. A su vez, también existen 3 metabolitos puros sintetizados por cepas de *Streptomyces* (polioxina D, estreptomina, y kasugamicina) que son actualmente distribuidos como fungicidas y bactericidas foliares (Rey y Dumas, 2017).

Varios metabolitos microbianos incluyendo las familias de avermectinas y milbemicinas han sido probados como potentes compuestos preventivos sobre varias plagas como insectos y parásitos (Yang et al., 2013). Por ejemplo, Yang et al (2013) describieron compuestos derivados de la nemadectina, obtenidos a partir de cultivos de *Streptomyces microflavus* con actividad acaricida y nematicida. La ivermectina fue introducida como antihelmíntico en la década de 1980 por Merck. Es un derivado semisintético de la avermectina, una lactona macro-cíclica que es producto de fermentación de la especie *Streptomyces avermitilis*. Su descubrimiento entusiasmó a las empresas para invertir en desarrollo de ivermectinas análogas, incluyendo moxidectina, doramectina, selamectina, abamectina y eprinomectina (Holden-Dye y Walker, 2007). Los gusanos parásitos, además de infectar humanos, infectan tanto al ganado como a cultivos, afectando la producción de alimentos con un claro impacto económico. Todas las especies del Filo Nemátoda, exhiben similitudes a pesar de vivir en hábitats muy distintos (Holden-Dye y Walker, 2007). El nemátodo de vida libre *Caenorhabditis elegans*, puede ser utilizado en la búsqueda por ejemplo, de nuevas lactonas macrocíclicas con actividad similar a la ivermectina (Haber et al., 1991). Asimismo, la diversidad metabólica del género *Streptomyces* podría permitir identificar nuevas moléculas nematicidas sintetizadas por las cepas de la colección que disponemos. Es importante destacar que bacterias de este género bacteriano y muchos nematodos (entre ellos patógenos) comparten al suelo como nicho ecológico pudiendo existir metabolitos producidos por ellas que eviten ser alimento de estos nematodos. Estos antecedentes despertaron el interés para realizar la evaluación de actividad nematicida sobre las cepas de la colección. Para ello, se llevó a cabo un ensayo

para evaluar la actividad contra nematodos parásitos mediante el vínculo con el Dr. Gustavo Salinas en el Institut Pasteur de Montevideo. De esta manera se planteó buscar cepas de *Streptomyces* que produzcan compuestos con potencial actividad nematocida, utilizando *C. elegans*, un nematodo de vida libre que suele encontrarse en el suelo y es ampliamente utilizado como modelo experimental. Además, se profundizó en la caracterización e identificación de el/los compuestos bioactivos responsables de dicha actividad, que a su vez pueden ser evaluados como potentes antihelmínticos en salud humana y animal.

Por su parte, el género *Streptomyces* ha sido utilizado para el control de enfermedades de suelo y de semilla (Rosales and Mew, 1997). A pesar de esto, sólo existen algunos reportes sobre su capacidad de promoción de crecimiento vegetal, como la habilidad de solubilizar fosfato, de producir ácido indol-acético (IAA), sideróforos y enzimas degradadoras de la pared celular como quitinasas, glucanasas y proteasas (Tamreihao et al., 2016). Muchas bacterias de este género han sido bastante estudiadas como agentes biocontroladores de hongos patógenos transmitidos por el suelo debido a su intensa actividad antagónica dada por la producción de diversos metabolitos antifúngicos. Estas observaciones, y su característica de estar presentes en suelo, vuelve a los *Streptomyces* candidatos promisorios para la selección y desarrollo de productos de protección vegetal y biofertilizantes (Kunova et al., 2016). La promoción de crecimiento y el control biológico son dos componentes distintos pero relacionados que están asociados a interacciones benéficas planta-microorganismo y pueden compartir los mismos mecanismos moleculares. En este sentido, en este proyecto se evaluaron diferentes propiedades en cuanto a la capacidad de promoción de crecimiento vegetal (PCV) de las cepas de *Streptomyces* de la colección, partiendo de una selección de cepas con actividad antagonista frente a fitopatógenos. Esto se llevó a cabo mediante la realización de diversos ensayos como la capacidad de producir ácido indol acético (una hormona vegetal), la capacidad de producir sideróforos (compuestos que facilitan la adquisición de hierro por parte de la planta), y la capacidad para producir compuestos que solubilizan el fósforo, otro nutriente esencial para las plantas. Para ello, se trabajó en colaboración con la Dra. Lucía Ferrando, del Laboratorio de Ecología Microbiana Medioambiental de la Facultad de Química, y también con el Dr. Federico Battistoni del Departamento de Bioquímica y Genómica Microbianas (BIOGEM) del IIBCE.

Resultados esperados

Como resultado general, se espera contar con un repertorio de cepas capaces de generar algún beneficio sobre los cultivos y puedan ser utilizadas en aplicaciones en el área agraria. En particular, contar con cepas productoras de compuestos con actividad nematocida y la caracterización y/o identificación de dichos compuestos. Por otro lado, se espera contar con cepas caracterizadas en base a sus propiedades de PCV (ya mencionadas). Por último, en este proyecto también se realizó la identificación taxonómica de las cepas más promisorias.

Metodología/diseño del estudio

OE 1. Seleccionar cepas de *Streptomyces* productoras de metabolitos con actividad nematocida

Para llevar a cabo el screening de actividad nematocida se utilizó el gusano de vida libre *C. elegans* el cual es comúnmente utilizado como modelo para la búsqueda de nuevos agentes antiparasitarios. Los experimentos se llevaron a cabo en el Laboratorio de Biología de gusanos del Institut Pasteur de Montevideo bajo la supervisión del Dr. Gustavo Salinas. En primer lugar, se realizaron varios ensayos de optimización, donde se probaron diferentes medios de cultivo y tiempos de incubación. A su vez también fueron optimizadas las condiciones y la cantidad de gusanos a ser utilizada en el ensayo, que consistió en enfrentar gusanos en estadio de joven adulto contra los sobrenadantes de 150 cepas de *Streptomyces*. A partir de los resultados obtenidos de los ensayos de optimización se seleccionaron las condiciones de incubación óptimas para la evaluación de actividad nematocida, y posteriormente se analizaron los sobrenadantes de todas las cepas generados bajo las condiciones seleccionadas.

El ensayo consistió en colocar una suspensión de gusanos (50-80) y las muestras a evaluar en placas de microtitulación de 96 pocillos. Una vez sembradas ambas, se agitó la placa suavemente para que los gusanos entren en contacto con la muestra. Luego se midió la motilidad de *C. elegans* durante 18 horas, utilizando el equipo WMicrotracker, el cual mide de forma rápida, sencilla y reproducible el movimiento de *C. elegans* mediante sensores infrarrojos. Además, las placas fueron inspeccionadas mediante lupa a las 24 y 48 hs. Se utilizaron dos parámetros para evaluar si la muestra es activa o no frente a los gusanos: la motilidad y la producción de larvas. Para estas pruebas, se utilizaron pocillos con controles negativos (DMSO 2%) y positivos (ivermectina). Este ensayo es rápido, de buena reproducibilidad y adecuado para el análisis de un gran número de muestras simultáneamente.

OE 2. Purificar e identificar los compuestos responsables de actividad nematocida

A partir de los sobrenadantes que mostraron actividad, se realizaron extracciones orgánicas con acetato de etilo (1:1) sobre los sobrenadantes de las cepas seleccionadas (17) que luego se concentraron por evaporación al vacío. A estos extractos se les realizó la prueba de bioactividad contra *C. elegans*, y se verificó la actividad en cinco de los extractos. Estas cepas entonces fueron seleccionadas para realizar estudios a nivel genómico y a nivel metabólico.

En el marco de esta actividad, fue que se realizó una pasantía en el laboratorio del Dr. Ryan Seipke de la Universidad de Leeds (Reino Unido). Durante esta pasantía se prepararon extractos orgánicos a partir de estas 5 cepas con actividad nematocida en 4 medios de cultivo diferentes, con el objetivo de identificar los compuestos responsables de la actividad en diferentes condiciones. Dichos extractos fueron evaluados mediante espectrometría de masas LC-MS/MS, y los resultados obtenidos fueron comparados con una base de datos (GNPS - Global Natural Product Social Molecular Networking,) con el objetivo de identificar los compuestos responsables de la actividad mencionada (Wang et al., 2016).

OE 3. Seleccionar cepas de *Streptomyces* con propiedades de promoción del crecimiento vegetal (PCV)

Se partió del antecedente de trabajo de nuestro grupo de investigación en el cual se encontraron varias cepas con actividad antagonista frente a microorganismos fitopatógenos. En primer lugar, se seleccionaron 10 cepas que presentaron los mayores niveles de actividad antimicrobiana y nematocida con el objetivo de optimizar las diferentes metodologías de evaluación de propiedades PCV. Una vez optimizadas las metodologías, se amplió el screening para un total de 25 cepas. Las propiedades utilizadas en el screening de actividad PCV fueron: la producción de fitohormonas, en particular ácido indol-acético (IAA), la producción de sideróforos y la capacidad de solubilizar fosfatos. Para llevar a cabo dichos experimentos, en primer lugar, se ajustaron las condiciones de cultivo establecidas en cada uno de los ensayos, para lo cual se contó con la colaboración del Dr. Federico Battistoni del Departamento de Bioquímica y Genómica Microbiana del Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable.

Producción de fitohormonas:

A partir de una placa esporulada de cada cepa a evaluar, se realizó un cultivo en tubos conteniendo medio TSB con triptófano (10 g/L) ya que este es precursor de la vía metabólica del IAA. Se incubó a 28°C en agitación por 5 días, luego se centrifugó para obtener los sobrenadantes y se filtraron. Como control positivo se utilizó una cepa de *Azospirillum brasilense* y como control negativo el medio de cultivo sin inocular. Estos sobrenadantes fueron utilizados para evaluar la producción de auxinas (indoles totales) mediante el método colorimétrico utilizando el reactivo de Salkowski y la producción de IAA mediante el método analítico por HPLC.

Para llevar a cabo el método colorimétrico, se partió de 1ml del sobrenadante, al cual se le agregó 1 ml del reactivo de Salkowski (cloruro férrico 0.5 M + ácido perclórico 70%) y se incubó 30 min en la oscuridad (Tamreinho et al., 2016). Posteriormente, se observó la aparición de una coloración rosada en las muestras positivas y se midió la absorbancia a 540 nm. Paralelamente se construyó una curva de calibración a partir de un estándar de IAA a diferentes concentraciones para calcular la concentración de indoles totales presentes en las muestras.

Para detectar y cuantificar específicamente la producción de IAA en las cepas de *Streptomyces*, se optimizó el método analítico por HPLC según Castillo et al., 2014. El análisis se llevó a cabo en un Sistema HPLC Shimadzu Prominence equipado con una columna C18 de fase reversa Phenomenex. El sistema de detección UV visible fue seteado a 280 nm y el flujo de la bomba se fijó en 0,8 ml/min durante toda la separación. Se utilizó una fase móvil de solvente A de 0.1% ácido fórmico (p/v) en agua mQ y solvente B de 0.1 % ácido fórmico (p/v) en metanol en una relación 50:50 y a temperatura ambiente. En primer lugar, se realizó la corrida del estándar de IAA de 100 ppm con el objetivo de identificar su tiempo de retención y así poder determinar en qué muestras se encontraba presente la fitohormona. El pico de IAA salió con un tiempo de retención de 6 min +/- 0.2. A partir de las diluciones de este estándar se construyó una curva de calibración, la cual fue utilizada para cuantificar la cantidad de IAA en las muestras positivas. Pevio a analizar las muestras, se ajustó el pH de los sobrenadantes a analizar a 2,8 con el objetivo de favorecer la extracción de ácidos. A partir de los mismos, se realizaron extracciones orgánicas con acetato de etilo en relación 1:1 y los extractos fueron solubilizados en 1ml de la fase móvil.

Solubilización de fosfatos:

Se utilizó el medio NBRIP el cual tiene fosfato de calcio como única fuente de fósforo (Li et al., 2019). Para llevar a cabo el método, se inocularon 10 ul de una suspensión de esporas de las diferentes cepas previamente preparadas a partir de una placa crecida "tipo manto" en SFM. Se analizaron 4 cepas por placa, las cuales se incubaron a 28°C y a los 11 días se evaluó la presencia de halos de solubilización alrededor de las colonias (Tamreinho et al., 2016). Se utilizó como control positivo del método una cepa de *Pseudomonas aeruginosa* solubilizadora de fosfatos, la cual presentó un halo de solubilización a los 11 días de incubación, validando el método utilizado. Además, debido a que el fosfato se encuentra mayoritariamente en forma orgánica en el suelo, formando parte de fitatos, también se realizó la optimización del método

sustituyendo el fosfato de calcio por ácido fítico en el medio NBRIP. Se llevó a cabo al screening tal como se mencionó anteriormente. Para informar los resultados se calculó un índice: diámetro del halo / diámetro de la colonia.

Producción de sideróforos:

Este ensayo se llevó a cabo según el método de Schwyn and Neilands (1997) modificado por Milagres (1999), utilizando el medio de cultivo CAS-AGAR. Debido a que este medio presenta un compuesto (CTAB) que es tóxico para muchas bacterias como es el caso de los actinomicetos (entre ellos *Streptomyces* spp.) se realizó la optimización del método de forma tal que las cepas bacterianas evaluadas no entren en contacto con dicho compuesto. Para ello, se preparó el medio CAS por un lado y por otro, el medio de cultivo YME óptimo para el crecimiento de *Streptomyces*. Se prepararon placas de Petri de manera tal que las placas quedaran divididas a la mitad, conteniendo el medio YME en una mitad y el medio CAS en la otra mitad. La mitad que contiene el medio de cultivo óptimo (YME) se inoculó con 15ul de una suspensión de esporas previamente preparada a modo de gota. Luego de que seca la gota, las placas se incubaron a 30°C durante 7 días. Transcurrido este tiempo, se observó la presencia de halos de color anaranjado alrededor de las colonias positivas para producción de sideróforos. Para informar los resultados se calculó un índice: radio del halo / radio de la colonia.

OE 4. Identificar las cepas de *Streptomyces* seleccionadas a partir de los screenings realizados

La técnica originalmente planteada para realizar la identificación de las cepas más promisorias (MLSA, Multi Locus Sequence Analysis) se consideró que no era necesaria, ya que fue suficiente utilizar un solo gen (*rpoB*) en lugar de 5 genes para obtener una aproximación taxonómica de las cepas seleccionadas en base a su actividad nematocida. Dichas cepas, fueron identificadas mediante análisis filogenético del gen *rpoB*, un marcador molecular muy utilizado en la identificación de diversos géneros bacterianos. Además, posteriormente se realizó la secuenciación genómica de las 5 cepas seleccionadas para estudios genómicos y metabólicos.

La secuenciación genómica fue realizada mediante diferentes tecnologías de secuenciación. Las cepas MAI 2213 y MAI 2237, fueron secuenciadas mediante la tecnología PacBio, para lo cual se obtuvo el ADN de buena calidad y fue enviado a MacroGen (Corea). Los genomas de las restantes cepas (MAI 2274, MAI 2300 y MAI 2311) fueron obtenidos mediante ensamblajes híbridos a partir de la secuenciación genómica mediante las tecnologías de Illumina y de Nanopore (Oxford Nanopore Technologies). En el caso de Illumina, los ADNs de buena calidad fueron enviados a secuenciar por la empresa Novogene (California, EE.UU). En el caso de Nanopore, cabe destacar que mediante este proyecto se adquirió el equipo y los kits correspondientes para realizar la secuenciación en nuestro laboratorio. Primero se obtuvo el ADN de buena calidad y luego se utilizó el kit de ligación (SQK-LSK109) para la preparación de las librerías genómicas. Una vez obtenidas las secuencias, se realizaron los análisis bioinformáticos correspondientes que implicaron el ensamblaje y pulido de las secuencias genómicas para obtener el genoma híbrido correspondiente para subsiguientes estudios (entre ellos la identificación de las cepas).

Resultados, análisis y discusión

OE 1. Seleccionar cepas de *Streptomyces* productoras de metabolitos con actividad nematocida

El screening fue realizado con un mismo lote de gusanos en estadio joven adulto, donde se evaluaron los sobrenadantes de 150 cepas de *Streptomyces*. Se observó que luego de la incubación con algunos de los sobrenadantes, los gusanos no producían larvas a diferencia del control que las producía en cantidad, en particular a las 48 horas (Figura 1). Esto sugiere la existencia de compuestos capaces de afectar la reproducción del nemátodo. En total, se observaron 43 cepas en las cuales los gusanos se vieron afectados en cuanto a la producción de larvas y también en su movilidad, ya que se encontraban paralizados como se muestra en la Figura 1b. En todos los casos, las muestras en las que se observaba muy poco o nada de movimiento de los gusanos adultos tampoco se observaron larvas.

Estas 43 cepas fueron seleccionadas para proceder a la repetición del experimento. Se decidió hacer esto para poder sub-seleccionar dentro de este conjunto, las que tuvieran los resultados más importantes de actividad, para poder pasar a la siguiente etapa de identificación de compuestos. En la Figura 2, se muestran los resultados normalizados a partir de los datos del Microtracker, donde se puede ver el porcentaje de "gusanos muertos" (movilidad) a lo largo del tiempo durante 18 hs. En este ensayo, se utilizó el parámetro tiempo de muerte, para sub-seleccionar aquellas cepas que mataron más rápidamente a los gusanos. En la Figura, se muestran solamente las cepas que fueron sub-seleccionadas (17) en base a su movilidad a las 18 horas, con el criterio de que la misma era menor al 10% y tampoco producían larvas.

OE 2. Purificar e identificar los compuestos responsables de actividad nematocida

A partir de este grupo de 17 cepas de *Streptomyces* que presentaban actividad nematocida contra el gusano de vida libre *C. elegans*, se procedió a realizar extracciones orgánicas con Acetato de etilo (1:1) obteniéndose así los extractos crudos correspondientes. A estos extractos se les realizó la prueba de bioactividad contra *C. elegans*, y se verificó la actividad en

cinco de los extractos. Estas cepas entonces fueron seleccionadas para realizar estudios a nivel genómico (para buscar los clusters genéticos responsables de la actividad) y metabolómico para la detección de compuestos mediante LC-MS/MS.

Análisis genómicos:

Se cuenta con la secuencia completa del genoma de estas 5 cepas. Debido a que en el marco de este proyecto se adquirió el secuenciador MiniION de Oxford Nanopore Technologies, previo a secuenciar estos genomas, se optimizó y se puso a punto el equipo y todo lo relacionado con la extracción de ADN, preparación de librerías, cargado de celdas, etc. Una vez puesto a punto el equipo, se realizaron las corridas de secuenciación de ADN con las cepas de *Streptomyces* seleccionadas. Una vez obtenidos los genomas ensamblados, se realizaron los análisis de minería genómica correspondientes. Se utilizó el programa ANTIsmash (ANTIbiotics & Secondary Metabolite Analysis Shell), para la búsqueda de los clusters de metabolitos secundarios (BGCs) presentes en las 5 cepas (Blin et al., 2019). Se han identificado entre 25 y 33 BGCs dentro de los cuales hay terpenos, butirolactonas, poliquétido sintasas (PKS), sintasas de péptidos no ribosomales (NRPS), bacteriocinas, sideróforos, lantipéptidos, entre otros. Sin embargo, más del 50 % de los BGCs detectados por ANTIsmash para estas 5 cepas presentan muy baja o nula similitud con otros BGCs reportados, lo que lleva a pensar en la existencia de nuevos BGCs, y sostiene la idea de la gran diversidad de metabolitos que presenta este género que aún no han sido descubiertos. Estos resultados dieron lugar al uso de nuevas herramientas bioinformáticas como BIG-SCAPE y CORASON (Navarro-Muñoz et al., 2020) los cuales permiten explorar la diversidad de BGCs sobre varios genomas agrupándolos en familias y sobre las cuales se trabaja actualmente.

Uno de los BGCs identificados fue la antimicina, la cual actúa inhibiendo la respiración mitocondrial por lo que resulta un compuesto altamente tóxico, que ha sido usado como fungicida, insecticida y acaricida. Estos resultados, llevaron a que durante la estancia de investigación en Leeds se realizara la construcción del mutante del tipo knock-out de esta vía metabólica utilizando la metodología de CRISPR/Cas. Brevemente, el mecanismo de construcción de la cepa mutante implicó realizar las modificaciones correspondientes sobre el plásmido pCRISPomyces-2 (Cobb et al., 2014), para que el corte sea realizado específicamente en la región de interés. En este caso, el diseño se realizó para que el corte sea sobre el gen *antC*, el cual codifica para una enzima esencial en la vía metabólica de la antimicina. Una vez obtenido este plásmido específico, el mismo fue introducido en la cepa de *Streptomyces* MAI2237 mediante conjugación bacteriana, donde se obtuvo la cepa "editada", carente del gen *antC*. Si bien esta actividad en particular no estaba prevista originalmente, está enmarcada dentro del proyecto. Posteriormente, se realizó el análisis funcional de esta cepa observándose que la misma aún presenta actividad contra *C. elegans*. Estos resultados nos han llevado a la hipótesis de que dicha cepa MAI 2237 presenta también otros compuestos responsables de la actividad nematocida y por ello aún se analizan otros posibles BGCs.

Análisis metabolómico:

Se prepararon extractos orgánicos a partir de estas 5 cepas con actividad nematocida en 4 medios de cultivo diferentes, con el objetivo de identificar los compuestos responsables de la actividad en diferentes condiciones. Dichos extractos fueron evaluados mediante espectrometría de masas LC-MS/MS, y los resultados obtenidos fueron comparados con una base de datos (GNPS) con el objetivo de identificar los compuestos responsables de la actividad mencionada. Como resultado de este análisis comparativo se han identificado algunos compuestos candidatos para cada una de las cepas. Estos candidatos se seleccionaron en base a su mecanismo de acción el cual estaría relacionado con una posible actividad antihelmíntica, por ejemplo, algunos de ellos actúan sobre los receptores nicotínicos como inhibidores de la acetilcolina, o están reportados como neurotóxicos. Algunos de los compuestos candidatos identificados, además de la antimicina producida por la cepa MAI 2237, son: cyanolide A y cytisine producido por la cepa MAI 2311, galanthamina producida por la cepa MAI 2213, hoiamida A producida por las cepas MAI 2213 y MAI 2274, isatina y jamaicamida C producidas por la cepa MAI 2300. Estos compuestos han sido identificados como productos naturales producidos por cepas de *Streptomyces*, cianobacterias y/o plantas. Se plantea la posibilidad de que algunos de estos compuestos sean responsables de la actividad nematocida. Sin embargo, también se apoya la hipótesis de que algunas de estas cepas no produzcan ninguno de los metabolitos reportados e identificados mediante estas herramientas y que sean fuente de nuevos metabolitos.

OE 3. Seleccionar cepas de *Streptomyces* con propiedades de promoción del crecimiento vegetal (PCV)

En primer lugar, se realizó la optimización de cada una de las metodologías en base a bibliografía. Para llevar a cabo la optimización se seleccionaron algunas cepas de *Streptomyces* de la colección y además se utilizaron los controles adecuados para cada método. Las metodologías que fueron optimizadas fueron: la solubilización de fosfatos (orgánico e

inorgánico), la producción de fitohormonas y la producción de sideróforos. Utilizando las metodologías optimizadas se realizó el screening con 25 cepas de *Streptomyces* seleccionadas en base a su actividad antibacteriana y antifúngica previamente reportada por nuestro grupo (Tesis de Maestría de Martín Pérez)

Los resultados obtenidos en cuanto a las propiedades PCV, se encuentran resumidos en la Tabla 1 (Anexo II). En cuanto a la producción de fitohormonas, se identificaron 11 cepas capaces de producir auxinas (método colorimétrico) en concentraciones que van de 10,09 a 52,89 µg/ml. Sin embargo, el método analítico basado en HPLC, el cual permite la detección y cuantificación de una fitohormona particular (el IAA) permitió su detección en 7 cepas. Las concentraciones de IAA obtenidas a partir de la curva de calibración fueron de 5,3 a 41,7 µg/ml, siendo la cepa de mayor concentración de IAA la MAI 2256. En lo que refiere a la solubilización de fósforo, tanto utilizando fosfato de calcio (inorgánico) como ácido fítico (orgánico) como única fuente de fósforo en el medio de cultivo, los halos de solubilización se observaron a los 11 días de incubación, detectándose 12 cepas capaces de solubilizar fósforo inorgánico y también 12 cepas capaces de solubilizar fósforo orgánico, las cuales no necesariamente coincidieron (Figura 3, Tabla 1; Anexos I y II). Las cepas que presentaron los mayores halos de solubilización y con ambas fuentes de fósforo fueron MAI 2208 y MAI 2222. La propiedad de producción de sideróforos fue evaluada mediante observación de un medio halo anaranjado sobre el medio CAS (debido a que la cepa creció en la otra mitad de la placa) a los 7 días de incubación. Esta propiedad fue detectada en casi todas las cepas analizadas, contándose un total de 19 cepas productoras de sideróforos (Figura 4, Tabla 1).

En resumen, las cepas que presentaron los resultados de PCV más promisorios y las cuales serán seleccionadas para futuros estudios son MAI 2208, MAI 2213, MAI 2222, MAI 2237, MAI 2238, MAI 2256, MAI 2274, MAI 2300, MAI 2311 y MAI 2327. Cinco de estas cepas ya se encuentran secuenciadas y se plantea realizar la secuenciación de las restantes para luego explorar los BGCs correspondientes utilizando las herramientas bioinformáticas como BIGSCAPE y CORASON.

OE 4. Identificar las cepas de *Streptomyces* seleccionadas a partir de los screenings realizados

Las cepas de *Streptomyces* caracterizadas hasta el momento en base a su actividad nematocida, fueron identificadas mediante análisis filogenético del gen *rpoB*, un marcador molecular muy utilizado en la identificación de diversos géneros bacterianos. Los resultados de esta identificación fueron publicados en un artículo científico en febrero de 2021: "An Integrative Approach for the Characterization of Plant-Pathogenic *Streptomyces* spp. Strains Based on Metabolomic, Bioactivity, and Phylogenetic Analysis" <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.643792>.

Las 5 cepas cuyos genomas han sido secuenciados se identificaron en base a análisis filogenómicos por comparación con la base de datos de cepas tipo disponible en <https://tygs.dsmz.de/>. Únicamente la cepa MAI 2213 ha sido identificada como una especie previamente reportada: *S. misionensis*. Las restantes cepas se han agrupado según sus relaciones filogenómicas con otras especies: MAI 2237 con *S. chartreusis*, MAI 2274 con *S. bungoensis*, MAI 2300 con *S. pseudovenezuelae*, y MAI 2311 con *S. humidus*.

Conclusiones y recomendaciones

- Se ha optimizado una metodología de screening de actividad nematocida contra el gusano de vida libre *C. elegans* a partir de sobrenadantes de cultivo de cepas de *Streptomyces*.
- Como resultado del análisis de actividad de 150 cepas de nuestra colección se han encontrado 43 cepas que afectan la motilidad y/o reproducción de *C. elegans*, de las cuales se han subseleccionado 17 que mostraron mayores niveles de afectación en los gusanos.
- A partir de 5 cepas se realizaron los análisis metabolómicos mediante LC-MS/MS durante una pasantía de investigación en el laboratorio del Dr. Ryan Seipke (Leeds, Reino Unido). La comparación de estos datos espectrales con bases de datos y su análisis mediante la plataforma GNPS, han permitido tener una lista de compuestos candidatos a ser responsables de la actividad nematocida encontrada. Sin embargo, también se plantea la hipótesis de la existencia de nuevos metabolitos microbianos asociados a esta actividad.
- Se realizó la secuenciación genómica de 5 cepas de *Streptomyces* mediante distintas plataformas de secuenciación (Illumina, PacBio y Nanopore). En particular, en el marco de este proyecto y gracias a su apoyo financiero, se obtuvo el equipo MiniION de Oxford Nanopore Technologies, el cual se puso a punto su uso para secuenciación de genomas bacterianos, así como el análisis bioinformático de las secuencias para obtener los genomas ensamblados.
- Se realizó la identificación molecular de las cepas seleccionadas con actividad nematocida mediante análisis filogenético del gen *rpoB*. En el caso de las cepas secuenciadas, la identificación se realizó a partir de los genomas.
- Los análisis genómicos han permitido la identificación de entre 25 y 33 BGCs dentro de los cuales hay terpenos, butirolactonas, poliquétido sintasas (PKS), sintasas de péptidos no ribosomales (NRPS), bacteriocinas, sideróforos, lantipéptidos, entre otros. Sin embargo, más del 50 % de los BGCs detectados por ANTIsmash para estas 5 cepas presentan muy baja o nula similitud con otros BGCs reportados, lo que lleva a pensar en la existencia de nuevos BGCs, y

apoyando la idea de la gran diversidad de metabolitos que presenta este género que aún no han sido descubiertos.

- El análisis genómico de una de las cepas reveló la presencia de antimicina, un compuesto que podría ser responsable de dicha actividad. Se llevaron a cabo ensayos de ingeniería genética para la edición molecular de esta cepa y se obtuvo la cepa mutante, carente de dicho gen. El ensayo de actividad sobre esta cepa mutante, llevó a que la misma aún presenta actividad, lo cual lleva a pensar en la existencia de otros metabolitos con actividad nematocida en esta cepa.

- Se han optimizado tres metodologías de screening de actividad PCV que previamente no habían sido realizadas en nuestro laboratorio. Se optimizaron los ensayos correspondientes a algunas propiedades PCV relevantes como la solubilización de fósforo (orgánico e inorgánico), la producción de sideróforos y la producción de fitohormonas, como el ácido indol acético.

- Como resultado del screening de actividad PCV se cuenta hasta el momento con 12 cepas solubilizadoras de fosfato orgánico y 12 cepas solubilizadoras de fosfato inorgánico, 11 cepas productoras de auxinas, dentro de las cuales 7 son productoras de IAA; y 19 cepas productoras de sideróforos.

- En cuanto a la actividad PCV se seleccionaron un total de 10 cepas que presentaron los resultados más promisorios que serán utilizadas para futuros estudios.

Referencias bibliográficas

- Blin K., S. Shaw, K. Steinke, R. Villebro, N. Ziemert, S. Yup Lee, M. H Medema, & T. Weber. 2019. AntiSMASH 5.0: updates to the secondary metabolite genome mining pipeline *Nucleic Acids Research*. doi: 10.1093/nar/gkz310.
- Cobb R. E., Wang Y., and Zhao H. 2014. High-Efficiency Multiplex Genome Editing of *Streptomyces* Species Using an Engineered CRISPR/Cas System. *ACS Synthetic biology* 4, 723-728.
- Croce V., López-Radencó A., Lapaz M.I., Pianzola M.J., Moyna G. and Siri M.I. 2021. An Integrative Approach for the Characterization of Plant-Pathogenic *Streptomyces* spp. Strains Based on Metabolomic, Bioactivity, and Phylogenetic Analysis. *Front. Microbiol.* 12: 643792. doi: 10.3389/fmicb.2021.643792.
- Garcia, I; Job, D; Matringe, M. (2000) Inhibition of p-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase by the diketonitrile of isoxaflutole: a case of half-site reactivity. *Biochemistry* 39:7501–7507
- Haber, C.L.; Heckaman, C.L.; Li, G.P.; Thompson, D.P.; Whaley, H.A. y Wiley, V.H. (1991). Development of a mechanism of action-based screen for anthelmintic microbial metabolites with avermectin-like activity and isolation of milbemycin-producing *Streptomyces* strains. *Antimicrob. Agents Chemother.* 35, 1811–1817
- Holden-Dye, L. y Walker, R.J. 2007. Anthelmintic drugs, *WormBook*, ed. The *C. elegans* Research Community, *WormBook*, doi/10.1895/wormbook.1.143.1.
- Kaur, T. y Manhas, R.K. (2014) Antifungal, insecticidal, and plant growth promoting potential of *Streptomyces hydrogenans* DH16. *J. Basic Microbiol.* 54, 1175–1185
- Kunova, A; Bonaldi M., Saracchi, M.; Pizzatti, C; Chen, X.; y Cortesi P. (2016). Selection of *Streptomyces* against soil borne fungal pathogens by a standardized dual culture assay and evaluation of their effects on seed germination and plant growth. *BMC Microbiology*, 16:272
- Lapaz, M. I. (2014). Estudio de las cepas de *Streptomyces* spp. causantes de sarna común en la papa en Uruguay. Tesis de Maestría.
- Lapaz, M.I.; Hugué-Tapia, J.C.; Siri, M.I.; Verdier, E., Loria R. y Pianzola M. J. (2017) Genotypic and Phenotypic Characterization of *Streptomyces* Species Causing Potato Common Scab in Uruguay. *Plant Disease*, 101(8), 1362-1372.
- Li Y., Zhang J., Zhang J, Xu W. and Mou Z. 2019. Characteristics of Inorganic Phosphate-Solubilizing Bacteria from the Sediments of a Eutrophic Lake. *Int J. of Environ. Res. and Public Health* 16, 2141; doi:10.3390/ijerph16122141
- Milagres A. M. F., Machuca A., Napoleao D. 1999. Detection of siderophore production from several fungi and bacteria by a modification of chrome azurol S (CAS) agar plate assay. *Journal of Microbiological Methods* 37, 1-6.
- Navarro-Muñoz J.C., Selem-Mojica N., M. W. Mallowney, S. A. Kautsar, J. H. Tryon, E. I. Parkinson, E. L. C. De Los Santos, M. Yeong, P. Cruz-Morales, S. Abubucker, A. Roeters, W. Lokhorst, A. Fernandez-Guerra, L. T. Dias Cappelini, A. W. Goering, R. J. Thomson, W. W. Metcalf, N. L. Kelleher, F. Barona-Gomez and M. H. Medema. 2020. A computational framework to explore large-scale biosynthetic diversity. *Nature chemical biology* 16, 1 60-68.
- Nunes, LR. et al. (2005) Transcriptome analysis of *Paracoccidioides brasiliensis* cells undergoing mycelium-to-yeast transition. *Eukaryot Cell* 4:2115–2128
- Rashad, F. M.; Fathy, H. M.; El-Zayat, A. S.; Elghonaimy A.M. (2015) Isolation and characterization of multifunctional *Streptomyces* species with antimicrobial, nematicidal and phytohormone activities from marine environments in Egypt. *Microbiological Research* 175, 34–47.
- Rey T. y Dumas B. (2017) Plenty Is No Plague: *Streptomyces* Symbiosis with Crops. *Trends in Plant Science*, Vol. 22, No. 1.
- Rosales, A.M. y Mew, T.W. (1997) Suppression of *Fusarium moniliforme* in rice by rice-associated antagonistic bacteria. *Plant Dis.* 81, 49–52
- Sasikumar, A. et al. (2013) Effects of actinobacteria on plant disease suppression and growth promotion. *Appl. Microbiol. Bio-technol.* 97, 9621–9636.
- Schwyn, B., Neilands, J.B., 1997. Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. *Anal. Biochem.* 160, 46–56.
- Tamreihao, K.; Ningthoujama, D.S.; Nimaichanda, S.; Shanta Singha, E.; Reenac, P.; Herojeet Singh, S. y Nongthomba. (2016) Biocontrol and plant growth promoting activities of a *Streptomyces corchorusii* strain UCR3-16 and preparation of powder formulation for application as biofertilizer agents for rice plant. *Microbiological Research* 192, 260–270.
- Wang M., Carver J. J., Phelan V. V., Sanchez L. M., Garg N., Peng Y., Nguyen D. D. et al. "Sharing and community curation of mass spectrometry data with Global Natural Products Social Molecular Networking." *Nature biotechnology* 34, no. 8 (2016): 828. PMID: 27504778
- Yang, L.Y. Wang, J.D.; Zhang, J.; Xue, C.Y.; Zhang, H.; Wang, X.J. y Xiang, W.S. (2013) New nemadectin congeners with

acaricidal and nematocidal activity from *Streptomyces microflavus* neu3 Y- 3. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 23, 5710–5713.

Licenciamiento

Reconocimiento-SinObraDerivada 4.0 Internacional. (CC BY-ND)