

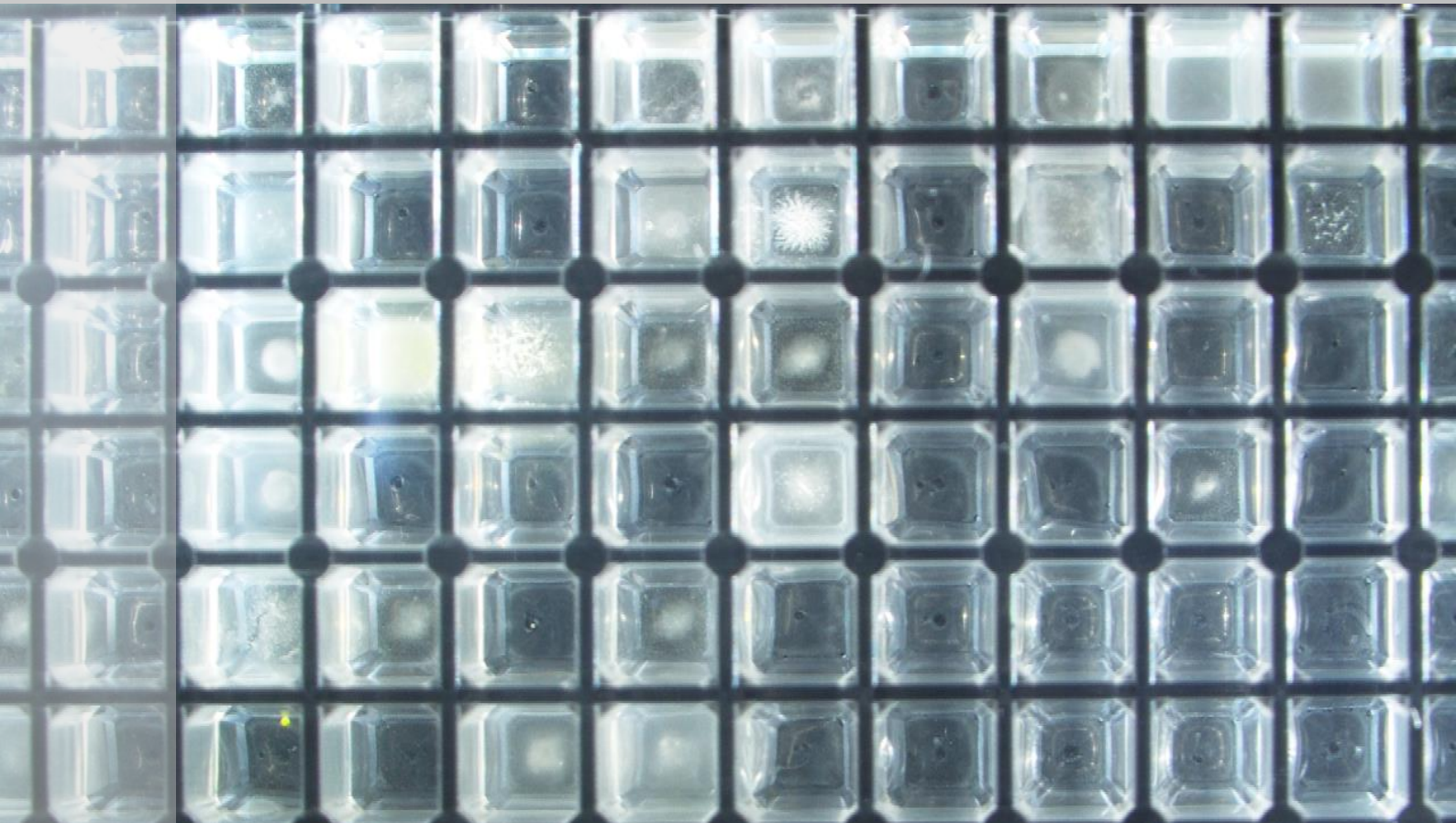
UAM

Universidad Autónoma
de Madrid

*Pharma
Mar*



**Desarrollo de una plataforma
automatizada de aislamiento mediante
Dilución a Extinción para el cribado de
bacterias no filamentosas productoras de
compuestos con actividad antitumoral**



Tesis Doctoral
Xulio Benítez González
Madrid, 2021

Departamento de Biología Molecular

Facultad de Ciencias

Universidad Autónoma de Madrid



Universidad Autónoma
de Madrid

Desarrollo de una plataforma automatizada de aislamiento mediante Dilución a Extinción para el cribado de bacterias no filamentosas productoras de compuestos con actividad antitumoral

Doctorando: Xulio Benítez González

Directores: Fernando de la Calle Verdú

Elena G. González Jiménez

PharmaMar (Madrid, ESP)

PharmaMar

Av. De los Reyes, 1 – Pol. Ind. La Mina

28770 Colmenar Viejo, Madrid (Spain)



El Dr. **Fernando de la Calle Verdú**, Jefe del Departamento de Microbiología y la Dra. **Elena G. González Jiménez**, Investigadora del Departamento de Microbiología, dependiente del Área de Investigación y Desarrollo de PharmaMar.

CERTIFICAN:

Que la tesis doctoral titulada “**Desarrollo de una plataforma automatizada de aislamiento mediante Dilución a Extinción para el cribado de bacterias no filamentosas productoras de compuestos con actividad antitumoral**” que presenta D. **Xulio Benítez González** para optar al grado de **Doctor por la Universidad Autónoma de Madrid**, ha sido realizada bajo su dirección en el Departamento de Microbiología del Área de Investigación y Desarrollo de PharmaMar y que reúne los requisitos para su presentación a trámite, lectura y defensa.

Para que conste a los efectos oportunos, firman el presente certificado,

Madrid, a ____ de _____ de 2021

Fdo.: Fernando de la Calle Verdú

Fdo.: Elena G. González Jiménez

Na memoria de meu pai

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, me gustaría agradecer a la Dra. Carmen Cuevas, Directora del Área de Investigación y Desarrollo de PharmaMar su apoyo y consejo durante la realización de esta tesis doctoral y el poner a mi disposición todos los recursos necesarios para este proyecto de investigación.

Mostrar mi agradecimiento a mis directores de tesis, el Dr. Fernando de la Calle y la Dra. Elena G. González por dedicar parte de su tiempo a guiarme en este camino, atender a mis preguntas y peticiones y aportar su conocimiento para sacar el mejor resultado posible de esta investigación. Agradecer también a mi tutora, la Dra. M^a Fernández Lobato su esencial labor de supervisión y enlace con la Universidad Autónoma de Madrid.

Quiero agradecer a PharmaMar el poder contar con sus instalaciones y especialmente con su gran equipo humano. A pesar de que esta tesis doctoral ha sido realizada principalmente en el Departamento de Microbiología, debo reconocer la inestimable ayuda que me han brindado los demás departamentos, sin los cuales esta investigación no podría haberse realizado. Debo dar las gracias también a todos los compañeros que de una u otra forma me han ayudado a lo largo de estos años.

La idea de esta tesis doctoral pudo materializarse gracias a la formación y experiencia adquirida en el Departamento de Microbiología de PharmaMar, por lo tanto, tengo que agradecer a mis compañeros Bea, Elena, Fernando, Fernando A., Jesús, Paz y Pilar su aportación a mi formación como investigador.

Quiero dar las gracias especialmente a Jesús García. Has seguido la realización de esta tesis día a día, compartiendo cada uno de los éxitos y fracasos a lo largo de estos años de investigación. Me gustaría que considerases esta tesis tan tuya como mía, ya que sin tu ayuda y consejo no habría sido posible.

En último lugar gustaría agradecer aos meus amigos e familia o seu ánimo e apoio, eles saben da miña vocación pola ciencia dende neno e do esforzo e tamén enorme satisfacción que me supón acadar este soño.

Estas derradeiras liñas van adicadas aos meus pais, xa que de nada serviría o coñecemento sen os valores de honestidade e esforzo que vos me transmitíchedes.

RESUMEN

Las bacterias marinas suponen una extraordinaria fuente de compuestos bioactivos. Sin embargo, el continuo redescubrimiento de las mismas o similares entidades químicas, obliga a realizar cambios de estrategia para poder llegar a compuestos novedosos de interés. Más allá de la elicitación de la biosíntesis de moléculas codificadas por agrupaciones génicas crípticas, otra estrategia de gran interés es la optimización del crecimiento "*in vitro*" de grupos bacterianos de difícil aislamiento mediante métodos clásicos, en un intento de superar el paradigma de lo que se conoce como "*Great Plate Count Anomaly*", y poder aumentar así la fracción de bacterias cultivables. En este trabajo se ha desarrollado por vez primera una plataforma de aislamiento basada en la estrategia de Dilución a Extinción (DTE, de las siglas en inglés "*Dilution to Extinction*") para el aislamiento de bacterias copiotrofas Gram negativas no filamentosas productoras de compuestos con actividad antitumoral. La plataforma integra desde el aislamiento de estos organismos de interés a partir de muestras marinas, hasta el cribado de las cepas para la detección de la actividad antitumoral. Todo el proceso se lleva a cabo de forma automatizada, permitiendo su empleo como sistema de aislamiento y cribado de alto rendimiento. Para el desarrollo del método, fue seleccionada una esponja marina de la que se había obtenido mediante aislamiento en medio sólido una cepa de *Labrenzia alexandrii* productora del novedoso antitumoral labrenzina. Además de permitir fijar los parámetros necesarios, el aislamiento de esta muestra mediante la nueva plataforma sirvió como prueba de concepto al lograr el cultivo de tres nuevas cepas activas pertenecientes al mismo género *Labrenzia*, dos de ellas productoras de labrenzina y una tercera productora de otro compuesto antitumoral, la sesbanimida. Las nuevas cepas productoras de labrenzina obtenidas, presentaban además una diferente capacidad de acumulación del compuesto labrenzina en el caldo de cultivo. Tras la prueba de concepto, 70 muestras adicionales fueron procesadas mediante DTE, logrando el aislamiento de cepas con actividad antitumoral pertenecientes a 19 géneros distintos e identificando hasta 12 familias de compuestos diferentes. Además, se han aislado nueve bacterias productoras de biomoléculas con actividad citotóxica que no derreplican con ningún compuesto conocido, pudiendo pertenecer a grupos taxonómicos no descritos (similitud de secuencia 16S <97.5%), lo cual las hace especialmente interesantes. Estos resultados respaldan la utilización de este sistema para aislamientos masivos de este tipo de bacterias.

SUMMARY

Marine bacteria are an extraordinary source of bioactive compounds. However, problems such as the continuous rediscovery of the same or similar chemical entities make it necessary to implement changes in strategies and to increase efforts in order to achieve novel and interesting compounds. Beyond the elicitation of the biosynthesis of the molecules encoded by cryptic gene clusters of the isolated microorganisms, achieving “*in vitro*” growth of bacterial strains and groups that have avoided their isolation until now is of vital interest. Starting from the premise of the need to approach the isolation using different methodologies to reduce the well-known “*Great Plate Anomaly*”, this work has developed for the first time a platform based on the dilution-to-extinction (DTE) strategy for the isolation of non-filamentous copiotrophic marine bacteria with the ability to produce antitumor compounds. The platform includes all steps from the isolation of these organisms of interest from marine samples to the screening of the strains for detection of antitumor activity. The entire process is automated, allowing for it to be used as a high-performance isolation and screening system.

For the development of the method, a marine sponge was selected because a *Labrenzia alexandrii* strain producing the novel antitumor compound labrenzin was previously obtained from it by classical solid medium isolation. In addition to allowing the necessary parameters to be established, the isolation of this sample using the new platform served as a proof of concept by achieving the cultivation of three new active strains belonging to the same genus, two of them producing labrenzin and a third one producing another compound, sesbanimide. The study of labrenzin-producing strains verified a greater capacity for synthesis of the compound by one of the new strains, which supports the usefulness of this type of massive isolation method.

After the proof of concept, 70 samples were processed using DTE, achieving the isolation of antitumor strains belonging to 19 different genera and identifying 12 different compound families. In addition, 9 strains did not replicate with any known compound, showing very low 16s rRNA similarity (<97.5 %) to described type species were isolated. This makes them especially interesting for increasing the probability of production of novel bioactive compounds. Other strains are also in the process of discovering the molecules responsible for the activity. These results support the suitability of DTE strategy for a massive isolation of this type of bacteria.

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS.....	9
RESUMEN.....	13
SUMMARY	17
ÍNDICE	21
CLAVE DE ABREVIATURAS.....	27
INTRODUCCIÓN.....	31
1.1 Fármacos de origen natural.....	33
1.2 Cáncer y productos naturales.....	34
1.3 Fármacos de origen marino contra el cáncer.....	36
1.4 Antitumorales de origen bacteriano	39
1.5 Bacterias no filamentosas como fuente de compuestos con actividad antitumoral	40
1.6 Aislamiento de bacterias marinas.....	42
1.7 “The Great Plate Count Anomaly”.....	43
1.8 Métodos de aislamiento.....	44
1.8.1 Aislamiento en medio sólido.....	44
1.8.2 Copiar el medio natural.....	45
1.8.3 Métodos de aislamiento de alto rendimiento	46
1.9 Aislamiento de alto rendimiento orientado a bacterias no filamentosas productoras de compuestos antitumorales	47
1.9.1 Simulación del entorno natural marino	48
1.9.3 Mantenimiento de la comunicación interespecífica y supresión de los fenómenos de competencia e inhibición	48
1.9.4 Identificación taxonómica e individualización a nivel de cepa de los aislados	49
1.9.5 Inducción de la actividad antitumoral	49
1.9.6 Detección de la actividad citotóxica.....	50
1.9.7 De-replicación química de las muestras activas.....	50
1.10 Las bacterias marinas, un arsenal de nuevas moléculas en salud humana.....	50
OBJETIVOS	53
MATERIAL Y MÉTODOS	57
2.1 Colección de muestras marinas	59
2.2 Muestra seleccionada para el desarrollo del método y la prueba de concepto ..	60
2.3 Desarrollo y parámetros del método.....	61
2.3.1 Acondicionamiento de la muestra	62
2.3.2 Determinación de Unidades Formadoras de Colonia (UFC) en las muestras	63

2.3.3 Cálculo de probabilidad y dilución	67
2.3.4 Cultivos para aislamiento	69
Evaporación	70
Agitación	70
Tiempos de incubación	71
2.3.5 Cultivos de inducción	75
2.3.6 Extracción	76
2.3.7 Ensayo de actividad antitumoral	76
2.3.8 De-replicación	77
De-replicación molecular	77
De-replicación química	78
2.3.9 Taxonomía molecular	79
2.3.10 Escalado, aislamiento de compuestos y elucidación estructural	79
2.4 Aislamiento en medio sólido	80
2.5 Cinéticas de producción de labrenzina	81
2.5.1 Fermentación	81
2.5.2 Extracción	82
2.5.3 Cuantificación	82
RESULTADOS	85
TEMA 1: Aislamiento de la cepa de <i>Labrenzia alexandrii</i> productora del compuesto antitumoral labrenzina utilizando DTE	87
3.1.1 Descripción de la muestra seleccionada para la prueba de concepto	87
3.1.2 Aislamiento en medio sólido a partir de la muestra ANN-17-096L	87
3.1.3 Aislamiento por DTE	88
Datos de aislamiento	89
Resultados de actividad antitumoral	90
De-replicación molecular	92
De-replicación química	94
Taxonomía molecular	95
3.1.4 Curvas de producción del compuesto labrenzina	96
Cuantificación de la producción de labrenzina en las distintas cepas aisladas de la muestra ANN-17-096L	96
TEMA 2: Evaluación de la plataforma de aislamiento, aplicabilidad industrial	99
4.1 Aislamientos en paralelo, sólido vs DTE	99
4.1.1 Obtención de cepas con actividad antitumoral	100

4.1.2 Biodiversidad y método de aislamiento	100
4.1.3 Compuestos detectados	101
4.2 Resultados globales de aislamiento	102
4.2.1 Selección de muestras.....	102
4.2.2 Densidad de población bacteriana aislada	104
4.2.3 Evaluación del sistema de cálculo de dilución y su aplicación a otras muestras marinas	106
4.2.4 Abundancia y diversidad de bacterias no filamentosas con actividad antitumoral en muestras marinas.....	108
Abundancia de bacterias activas en función del phylum de origen	108
Biodiversidad de muestras vs. diversidad de cepas aisladas	109
4.2.5 Diversidad química	110
Alteramidas y bromoalteramidas	110
Derivados de quinolina y tubermicina	111
Estreptocidinas.....	112
Labrenzina	113
Lichenisinas	114
Prodigiosinas y serratamolide	115
Pseudopironinas	115
Rhamnolípidos	116
Sesbanimidas.....	116
Surfactinas y pumilacidinas	117
Violaceína	118
4.2.6 Diversidad biológica	118
<i>Acinetobacter</i>	120
<i>Aquimarina</i>	120
<i>Bacillus</i>	121
<i>Brevibacillus</i>	122
<i>Chryseobacterium</i>	122
<i>Enterovibrio</i>	123
<i>Halomonas</i>	123
<i>Labrenzia</i>	124
<i>Mesoflavibacter</i>	125
<i>Microbulbifer</i>	125

<i>Ochrobactrum</i>	126
<i>Pseudoalteromonas</i>	126
<i>Pseudomonas</i>	127
<i>Pseudovibrio</i>	128
<i>Ruegeria</i>	129
<i>Serratia</i>	130
<i>Shigella</i>	130
<i>Tropicibacter</i>	131
<i>Zooshikella</i>	131
4.2.7 Posibles nuevos géneros	132
DISCUSIÓN.....	133
5.1 Bacterias marinas y cáncer	135
5.2 Selección del método adecuado para un aislamiento de alto rendimiento	135
5.3 Oligotrofismo vs copiotrofismo.....	138
5.4 Desarrollo de la plataforma.....	139
5.4.1 Optimización del cálculo de dilución.....	139
5.4.2 Incremento del rendimiento.....	141
5.6 Aislamiento de un productor de labrenzina como prueba de concepto de la plataforma de aislamiento	142
5.6.1 Profundidad de aislamiento.....	142
5.6.2 Ensayos de cuantificación de labrenzina	144
5.7 Aislamientos en paralelo, medio sólido vs DTE	144
5.7.1 Biodiversidad	144
5.7.2 Diversidad química	145
5.8 Resultados globales de aislamiento	146
5.8.1 Medio sólido vs medio líquido. Densidad de población aislada	146
5.8.2 Abundancia de bacterias no filamentosas con actividad antitumoral en muestras marinas	146
5.8.3 De-replicación química o de-replicación molecular	147
5.8.4 Diversidad química	147
5.8.5 Hitos relevantes en los aislamientos DTE realizados	149
CONCLUSIONES	151
BIBLIOGRAFÍA.....	155
ANEXO	173

CLAVE DE ABREVIATURAS

μL	Microlitro
16S rRNA	Genes codificantes de la unidad 30S del ribosoma procariota
ADCs	Anticuerpos conjugados
AMS	Ammonium Mineral Salts Medium
BEN ½	Medium Benedict
DTE	Dilución a extinción (Dilution to extinction)
DMEM	Dulbeccio's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimetilsulfóxido
DW	Deep Well
ESIMS	Espectrometría de masas por electrospray
GS	Gran similitud
HPLC	Cromatografía líquida de alta eficacia
IC50	Concentración inhibitoria del 50%
Kb	kilo bases
LC / MS	Cromatografía de líquidos / espectrometría de masas
LC / MSD	Cromatografía líquida / detector selectivo de masas
mL	Mililitro
MS	Espectrometría de masas
NCI60	Protocolo de cribado con células tumorales humanas
NRPS	Sintasa de policétidos no ribosomales
pb	Pares de bases
PKS	Policétido sintasa
rpm	Revoluciones por minuto
TOF	Tiempo de vuelo

UFC	Unidades formadoras de colonia
UFC / μL	Unidades formadoras de colonia por microlitro
UFC / placa	Unidades formadoras de colonias por placa
UPLC	Cromatografía Líquida de alta eficacia

INTRODUCCIÓN

1.1 Fármacos de origen natural

Se considera un producto natural cualquier compuesto químico o sustancia de origen biológico (Editorial, 2007). A pesar de haber sido un recurso indispensable para el ser humano en múltiples actividades desde los orígenes de la propia humanidad (Dias, Urban and Roessner, 2012), su empleo como fármacos ha sido una de sus aplicaciones más destacadas (Newman and Cragg, 2016; Bernardini *et al.*, 2018).

La etnofarmacología recoge la utilización de innumerables plantas como remedio para otras tantas afecciones por parte de las civilizaciones más antiguas (Dias *et al.*, 2012). Desde ese aprovechamiento más o menos directo de los recursos brindados por la naturaleza (Ji *et al.*, 2009), hasta los complejos fármacos desarrollados en la actualidad (Sharifi-rad *et al.*, 2019), miles de productos naturales han tenido un papel de mayor o menor relevancia en la mejora de la calidad de vida de las sociedades humanas (Yuan *et al.*, 2016).

La ciencia ha buscado nuevos y mejores compuestos a lo largo de todo este tiempo. Hasta el siglo XIX, las plantas y sus extractos fueron prácticamente la única fuente de remedios curativos, constituyendo la síntesis del ácido salicílico a partir de la salicina obtenida de la corteza de *Salix alba L.* o el aislamiento de la morfina a partir de *Papaver somniferum*, dos de los más relevantes y tempranos ejemplos de fármacos propiamente dichos (Dias, Urban and Roessner, 2012). Tras estos primeros pasos, el avance de la medicina y de la ciencia en general, impulsaron la búsqueda de nuevos productos naturales con aplicación médica ampliando tanto la variedad de organismos estudiados como los ecosistemas objeto de prospección. Pero fue tras el descubrimiento de la penicilina por Alexandre Fleming en 1928 a partir del hongo *Penicillium notatum* (Dias *et al.*, 2012), cuando los microorganismos pasaron a jugar un papel verdaderamente relevante en el descubrimiento de nuevos fármacos. A la penicilina le sucedieron antibióticos como la estreptomina (*Streptomyces griseus*, 1944), la vancomicina (*Streptomyces orientalis*, 1952) y gran número de derivados de estas y otras familias de nuevos compuestos (Gould, 2016). Sin embargo, tras esta época conocida como *la edad de oro del descubrimiento de antibióticos* (Aminov, 2010), la reducción del número de nuevas estructuras bioactivas descubiertas fue haciéndose cada vez más patente, no solo para los compuestos de origen microbiológico, sino para los productos naturales en general (Pye *et al.*, 2017). La falta de nuevas estructuras, unida al continuo redescubrimiento de las mismas moléculas ya conocidas, llevó a

compañías e investigadores a considerar el agotamiento del medio terrestre como fuente de nuevos fármacos (Jiménez, 2018) y volver la vista al mar.

1.2 Cáncer y productos naturales

Se conoce con el nombre de cáncer a un grupo de enfermedades que tienen en común el crecimiento y división desregulada de las células de diversos tejidos del organismo (<http://www.who.int>). A diferencia de las células normales, las células cancerosas crecen descontroladamente formando tumores, llegando a invadir tejidos y órganos adyacentes o distantes, en el proceso conocido como metástasis (<http://www.cancer.gov>).

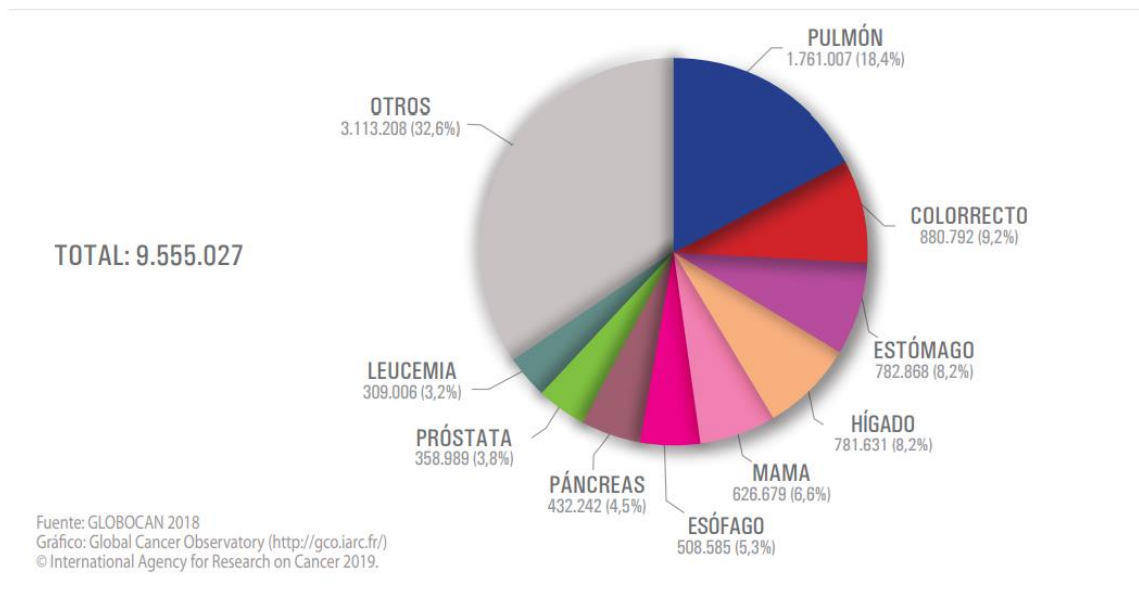


Figura 1.1: Muertes provocadas por los distintos tipos de cáncer durante el año 2018. (Modificado de SEOM, 2020).

El cáncer supone un creciente problema de salud a nivel global siendo el responsable de una de cada seis muertes en el año 2018 y constituyendo generalmente una de las primeras causas de muerte por países (Bray *et al.*, 2018). Los tipos de cáncer que provocan un mayor número de fallecimientos en hombres son el pulmonar, el

prostático el colorrectal, el gástrico y el hepático, mientras que el cáncer mamario, el colorrectal, el pulmonar, el de útero y el de tiroides son los más comunes entre las mujeres (<http://www.who.int>).

Su tratamiento puede abordarse desde distintos enfoques como la cirugía, la radioterapia, la inmunología, la quimioterapia o mediante la combinación de varios de ellos (Falzone, Salomone and Libra, 2018). La quimioterapia, combate el cáncer y sus síntomas mediante la administración de fármacos a los pacientes. Actualmente, más de un 60% de las moléculas que dotan de actividad antineoplásica a dichos fármacos provienen directa o indirectamente de productos naturales (Jimenez, Wilke and Costa-Lotufo, 2018), como puede apreciarse en la **Figura 1.2**.

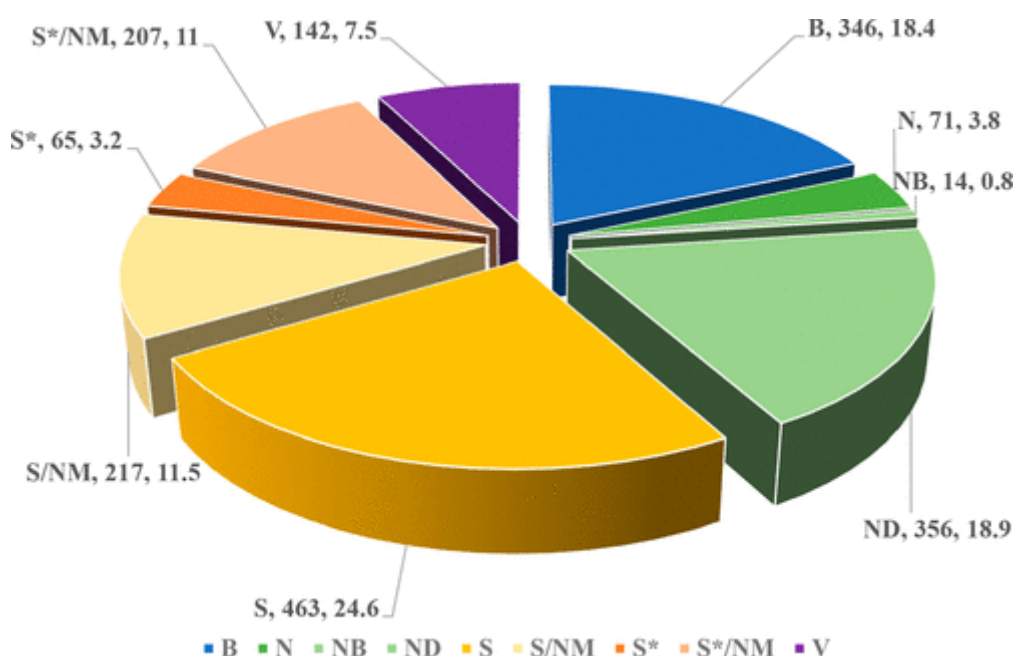


Figura 1.2: Origen de los fármacos anticancerígenos. Molécula biológica (B), Producto Natural (N), Basado en producto natural (NB), Derivado de producto natural (ND), Sintético (S) Sintético de inspiración natural (S/NM), Sintético/farmacóforo de producto natural (S*) Sintético/farmacóforo de producto natural/de inspiración natural (S*/NM), Vacuna (V). (Modificado de Newman and Cragg, 2020).

La diversidad química creada por la naturaleza no es simplemente una fuente de nuevos productos naturales sino que también sirve de inspiración para la síntesis de nuevos compuestos basados en estructuras halladas en la naturaleza (Montaser and Luesch, 2011).

1.3 Fármacos de origen marino contra el cáncer

A finales de los años 60 del siglo XX, la exploración sistemática del medio terrestre en busca de nuevos fármacos parecía llegar a su fin. Tras la explosión de nuevos antibióticos que había tenido lugar durante los 20 años anteriores (Aminov, 2010), los programas de cribado de muestras parecían arrojar una y otra vez los mismos compuestos (Bhatnagar and Kim, 2010). Es en ese momento cuando se produce un cambio de paradigma. Los océanos, hasta ese momento considerados poco más que un desierto sumergido, comienzan a atraer el interés de los investigadores, que gracias al desarrollo tecnológico que había tenido lugar durante las décadas anteriores podrían explorar un ambiente hostil para el ser humano como es el marino (Dias, Urban and Roessner, 2012).

Los océanos constituyen el mayor ecosistema terrestre, cubriendo más del 70% de la superficie del planeta y albergando hasta el 80% de su biodiversidad. De los 35 filos animales descritos taxonómicamente, 34 de ellos habitan en el medio marino (Jiménez, 2018). Margulis y Chapman afirmaban en su libro de 2009 *“An Illustrated Guide to the Phyla of Life on Earth”* que en los océanos se podían encontrar hasta 15 filos animales en exclusividad. Las condiciones diversas (pH, salinidad, presión, etc.) a las que se ven sometidos los organismos, así como la lucha entre ellos por el espacio y recursos disponibles (**Figura 1.3**), han provocado durante cientos de millones de años una gran presión evolutiva que ha propiciado la enorme diversidad de filos exclusivos de origen marino que habita los océanos. Algunas de estas formas de vida son sésiles o poseen una muy limitada capacidad de movimiento (e.g. phyla Tunichata o Porifera, entre otros), por lo que sus estrategias de defensa, ataque o comunicación están basadas principalmente en el intercambio de señales químicas (Kumar and Adki, 2018).

Esta carrera armamentística de millones de años ha fructificado, por medio de infinidad de rutas metabólicas, en una enorme variedad de metabolitos secundarios ya conocidos. Hasta 2016, se habían descrito más de 30000 productos naturales

procedentes del medio marino (Alves *et al.*, 2018). La utilización de dichos metabolitos como fármacos, es relativamente reciente comparándola con los productos naturales de origen terrestre, pero, la experimentación llevada a cabo durante los últimos 50 años, ha empezado a desvelar su verdadero potencial.



Figura 1.3: Fondo marino. La competencia por el espacio constituye un factor evolutivo de primer orden en ambientes como los arrecifes coralinos, fomentando la síntesis de compuestos que proporcionen a los organismos algún tipo de ventaja adaptativa a la hora de colonizar el fondo marino. (PharmaMar®)

Hasta 2021, se han aprobado 9 compuestos de origen marino para uso clínico: Prialt®, Yondelis®, Halaven®, Zepzelca®, Aplidin® y 4 ADCs que contienen compuestos de origen marino: Adcetris®, Polivy®, Padcev®, Blenrep®. Cabe destacar, que 8 de ellos son empleados para el tratamiento del cáncer (**Figura 1.4**). Este hecho no es casual, como se ha mencionado anteriormente, la naturaleza sésil de organismos como poríferos y tunicados marinos ha limitado su capacidad de relacionarse con el medio y con otros organismos al intercambio de metabolitos secundarios. Gran parte de este intercambio responde a fenómenos de defensa o ataque, lo que se traduce en una

mayor presencia de propiedades citotóxicas y antitumorales en muestras marinas que en terrestres (Jiménez, 2018). Se ha estimado que la presencia de actividad citotóxica en los ensayos preliminares supera en el caso de las muestras marinas en una proporción 1:10 a las de origen terrestre (Nigam *et al.*, 2019).

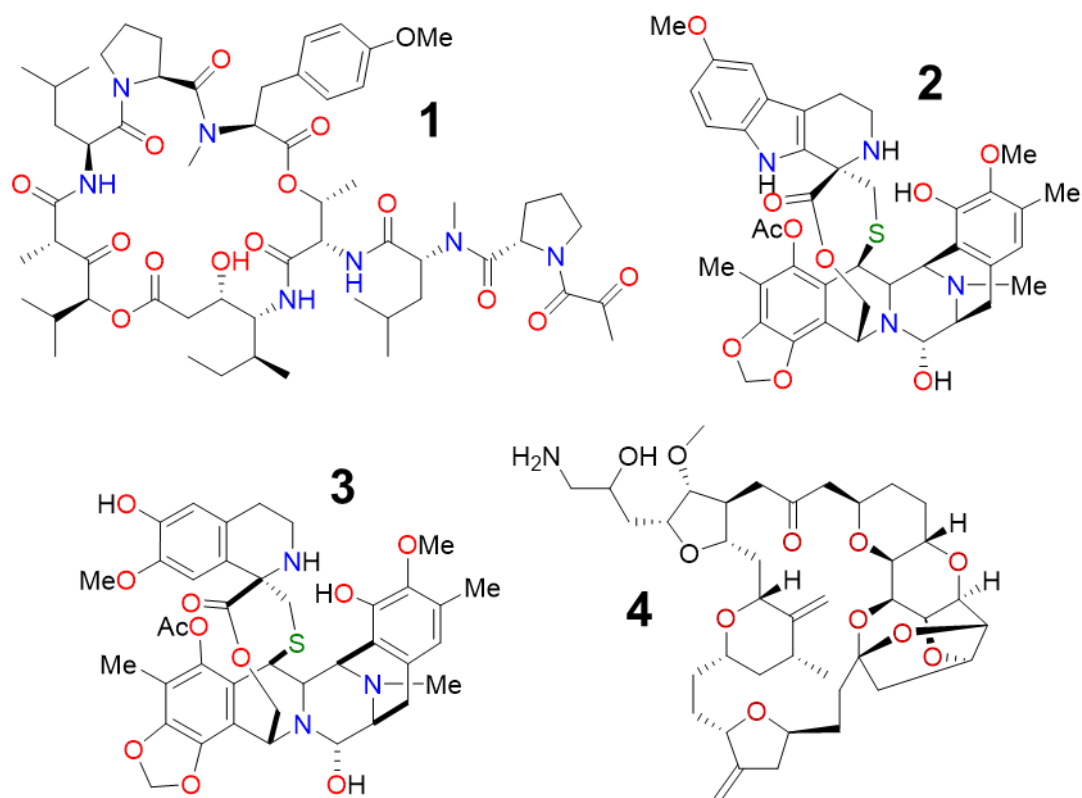


Figura 1.4: Moléculas de origen marino aprobadas para uso clínico contra el cáncer hasta 2020 (no ADCs): Plitidepsina (Aplidin[®], 1), Lurbinectedina (Zepzelca[®], 2), Trabectedina (Yondelis[®], 3), Eribulina (Halaven[®], 4).

A finales de los años 90 del siglo pasado, los programas de descubrimiento de fármacos de las grandes compañías farmacéuticas y centros de investigación, ante el desarrollo alcanzado por la informática y la computación, orientaron sus esfuerzos hacia la química combinatoria y la creación de grandes librerías de compuestos con los que alimentar sus ensayos de cribado para las distintas dianas (Liu, Li and Lam, 2017). Finalizando la segunda década del siglo XXI, la realidad es que dichos programas no han logrado el éxito esperado, siendo incapaces de superar la complejidad y diversidad de los productos de origen natural y sus derivados (Newman and Cragg, 2016). Esta

riqueza estructural es todavía mayor en los productos naturales de origen marino, las peculiares condiciones físicas y químicas en las que viven y evolucionan los organismos se reflejan en los metabolitos secundarios que sintetizan, presentando unas características estructurales únicas que se traducen en novedosos mecanismos de acción y dianas (Jimenez *et al.*, 2020). Un excelente ejemplo son los antitumorales de origen marino Yondelis® y Aplidin®, cuyos principios activos, trabectedina y plitidepsina muestran novedosos mecanismos de acción respecto a los obtenidos de muestras terrestres (Muñoz-Alonso *et al.*, 2009; Larsen, Galmarini and D'Incalci, 2016). Ambos compuestos han sido desarrollados por la compañía biofarmacéutica PharmaMar, donde se ha llevado a cabo esta tesis doctoral como parte de su investigación para la búsqueda de nuevas entidades químicas con aplicabilidad en la lucha contra el cáncer.

1.4 Antitumorales de origen bacteriano

Al igual que sucede en el medio terrestre, los microorganismos tienen un papel destacado entre el resto de organismos marinos fuente de productos naturales. El número de nuevos compuestos de origen microbiológico se incrementa cada año, así como su proporción con respecto al total de nuevos productos naturales marinos descubiertos (**Figura 1.5**). En 2017, supusieron el 57% del total de nuevos productos naturales marinos descubiertos (Carroll *et al.*, 2019).

Compuestos como prodigiosinas, salinisporamidas, iturinas, didemninas, estaurosporinas o actinomicinas (Cragg and Pezzuto, 2016), constituyen solo algunos ejemplos de compuestos con actividad antitumoral producidos por bacterias aisladas del mar. A esta lista creciente de compuestos, hay que sumarle la evidencia de que una parte importante de los compuestos aislados a partir de poríferos y tunicados marinos tienen un origen microbiológico, siendo en realidad sintetizados por bacterias pertenecientes al microbioma asociado al organismo (Nigam *et al.*, 2019). Multitud de estudios metagenómicos han revelado la existencia de clústeres biosintéticos bacterianos que codifican policétido sintasas (PKS) o sintasas de péptidos no ribosomales (NRPS) potencialmente responsables de dicha síntesis en los genomas procariontes asociados a organismos marinos. Tal es el caso de los simbiosis asociados a tunicados responsables de la biosíntesis de la trabectedina, principio activo de Yondelis® (Rath *et al.*, 2011) o los asociados a esponjas, posibles responsables de la síntesis de reinieramicina (Tianero, Balaich and Donia, 2019), briostatinas (Sudek *et al.*,

2007), caliculinas (Wakimoto *et al.*, 2014) o pederinas (Piel, 2002). Pero no solamente los estudios metagenómicos sustentan esta idea, el aislamiento de una *Tistrella mobilis* productora de didemninas (Xu *et al.*, 2012), que son compuestos aislados treinta años antes a partir de tunicados, o el más reciente hallazgo por parte del grupo de investigación donde se lleva a cabo esta tesis doctoral de una *Labrenzia alexandrii* productora de un análogo de pederina, compuestos a su vez obtenidos previamente de esponjas, insectos o líquenes (Schleissner *et al.*, 2017) la respaldan.

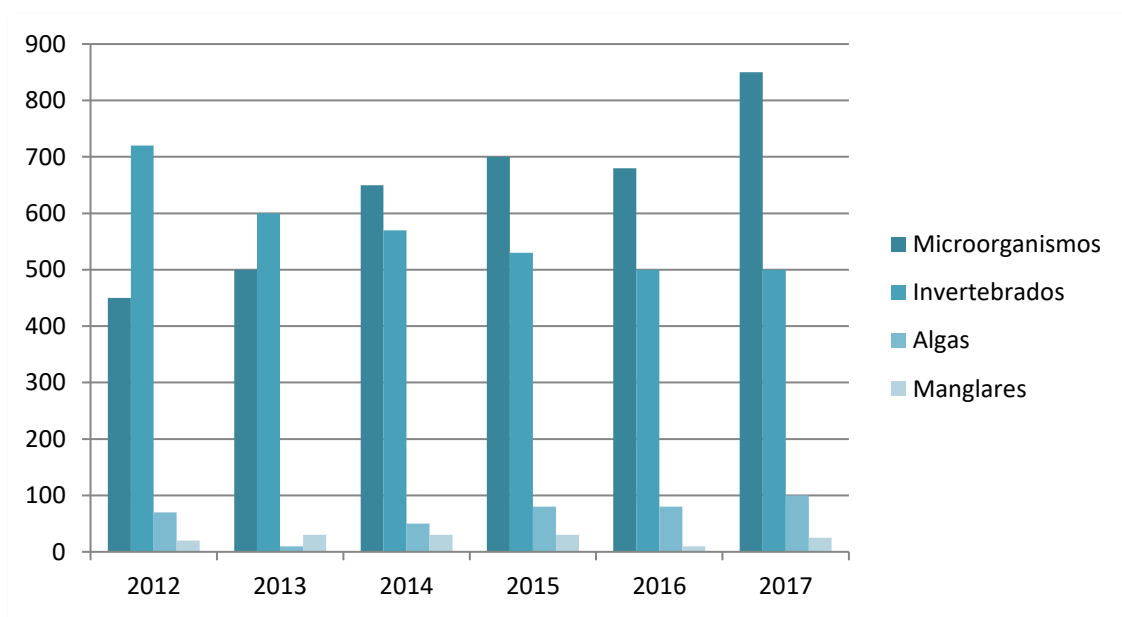


Figura 1.5: Evolución del origen de los nuevos productos naturales en función del año durante el periodo 2012-2017. (Modificado de Carroll *et al.*, 2019).

1.5 Bacterias no filamentosas como fuente de compuestos con actividad antitumoral

Cuando se habla de bacterias como fuente de productos naturales, sean terrestres o marinas, es inevitable hacerlo de las bacterias Gram positivas filamentosas y más concretamente, del género *Streptomyces*. Este grupo de actinomicetos es por sí solo el responsable de más del 60% de los productos naturales de origen microbiológico conocidos hasta el momento (Takahashi and Nakashima, 2018), destacando sobre todos ellos compuestos con actividad antimicrobiana como pueden ser la nistatina, la

anfotericina, la estreptomycinina o el cloranfenicol (Procópio *et al.*, 2012). Actualmente, las 380 especies tipo del género que están secuenciadas y disponibles para su consulta en bases de datos de secuencias como NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene>) permiten ver que cada cepa puede albergar un elevado número de agrupaciones génicas biosintéticas, principalmente policétido sintasas (PKS) y sintasas de péptidos no ribosomales (NRPS). Sirva de ejemplo la popular cepa *Streptomyces coelicolor* A3(2), cepa tipo del género (Bentley *et al.*, 2002), cuyo genoma contiene más de 20 agrupaciones génicas para rutas de síntesis de metabolitos secundarios (Tanaka, Hosaka and Ochi, 2010). Por lo tanto, no solo los compuestos ya descritos convierten al género en el objetivo principal de la mayoría de los programas de aislamiento de microorganismos productores de metabolitos secundarios, sino que el potencial que revelan sus genes sugiere que solamente se conoce una pequeña parte del repertorio químico que esconden. Pero, PKSs, NRPSs y demás agrupaciones génicas biosintéticas, no son exclusivas de actinomicetos, la exploración y anotación génica ha mostrado también en muchos géneros de proteobacterias, firmicutes o bacteroidetes un gran potencial por descubrir (Machado *et al.*, 2015). Además, cada año nuevos productos naturales son obtenidos a partir de géneros de bacterias Gram negativas como *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Pseudoalteromonas*, *Pseudovibrio*, *Vibrio* o *Labrenzia* (Carroll *et al.*, 2019). Que se produzcan dichos hallazgos, a pesar del papel secundario otorgado a estos grupos en los programas de descubrimiento de nuevas entidades químicas de origen natural, no hace más que resaltar su potencial, ya que se han establecido mayores similitudes estructurales entre las moléculas aisladas de Gram – y las provenientes de organismos marinos que entre estas y las obtenidas a partir de Gram + filamentosos (Still *et al.*, 2014). Por lo tanto, parece razonable pensar que compuestos como la didemnina B o la labrenzina (Xu *et al.*, 2012; Schleissner *et al.*, 2017) sintetizados por bacterias Gram negativas aunque descubiertos inicialmente en macroorganismos marinos, constituyen solamente dos ejemplos de la diversidad química existente.

Mediante distintos enfoques como la variación de las condiciones de fermentación o la modificación directa del genoma mediante técnicas de ingeniería genética, se ha logrado activar o incrementar la síntesis de numerosas entidades químicas (Pettit, 2011).

1.6 Aislamiento de bacterias marinas

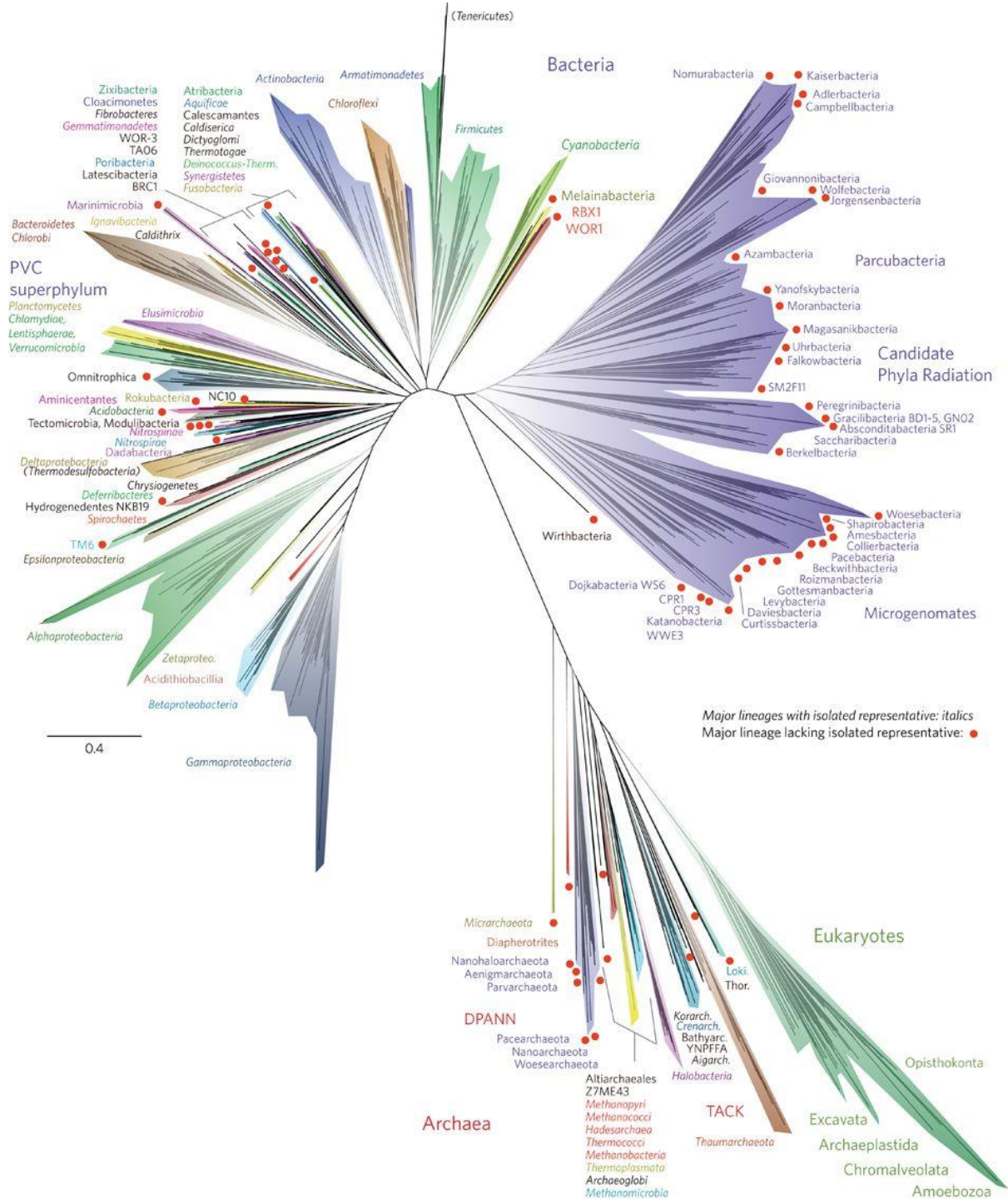


Figura 1.6: “The tree of life”. Árbol con los diferentes linajes de bacterias conocidos donde los puntos rojos señalan aquellos sin representante aislado (Laura A. Hug *et al.*, 2016).

A lo largo de los últimos años, con el exponencial desarrollo de las técnicas de secuenciación masiva, los estudios metagenómicos realizados en poríferos y tunicados marinos (Moreno-Pino *et al.*, 2020) han comenzado a revelar la verdadera diversidad de las bacterias asociadas a estos. La presencia de agrupaciones génicas silenciadas es sobradamente conocida, pudiendo una sola cepa bacteriana albergar múltiples genes crípticos que codifiquen otros tantos metabolitos (Craney, Ahmed and Nodwell, 2013). Pero, más allá de la detección de los compuestos sintetizados o de la inducción de su síntesis, existe un primer obstáculo para el descubrimiento de nuevos compuestos que es el aislamiento de las propias bacterias. Aunque los avances en las técnicas de exploración y anotación génica son muy prometedores (<https://antismash.secondarymetabolites.org>), es notorio que la predicción de la estructura y función exactas de un hipotético compuesto a partir de la secuencia génica, está lejos de ser posible, por lo que el aislamiento del microorganismo sigue siendo la mejor opción y en ocasiones la única, para llegar a obtener la nueva molécula (Joint, Mühling and Querellou, 2010).

1.7 “The Great Plate Count Anomaly”

La enorme diferencia entre el número de microorganismos presentes en una muestra y el que se consigue hacer crecer y aislar bajo condiciones de laboratorio es conocida como “*The Great Plate Count Anomaly*”, término acuñado por Staley y Konopka en 1985 (Staley and Konopka, 1985) y que estima el porcentaje de los microorganismos aislados en condiciones de laboratorio en entre un 0.001 y un 1% del total presente en la muestra estudiada (**Figura 1.6**). Aunque dicho porcentaje es extremadamente variable, es un hecho totalmente contrastado mediante estudios metagenómicos o de recuento directo (Yarza *et al.*, 2014; Laura A Hug *et al.*, 2016) que una enorme biodiversidad permanece oculta debido a la incapacidad para hacerla crecer fuera de sus condiciones naturales (Overmann, Abt and Sikorski, 2017).

Desde un principio, se consideró que las bacterias denominadas “incultivables” eran simbiontes obligados y, por lo tanto, independientemente del método o las condiciones de aislamiento, su multiplicación en laboratorio no sería posible (Brinkmann, Marker and Kurtböke, 2017). A pesar de ser cierto para algunos grupos también lo es que el número de nuevos géneros cultivables no para de crecer, habiendo casos de gran relevancia como el del popular clado SAR11, el grupo bacteriano más abundante

en el medio marino y considerado incultivable hasta que a principios del siglo XXI se logró su aislamiento (Rappé *et al.*, 2002).

Mucho antes de popularizarse el término “*Great Plate Count Anomaly*”, el microbiólogo austriaco Heimrich Winterberg ya apreció hace más de 120 años la discrepancia existente entre el número de células observadas en las muestras y el número de unidades formadoras de colonias obtenidas en la placa de Petri (Lewis *et al.*, 2010). Múltiples métodos han sido empleados desde entonces con mayor o menor éxito para mejorar la ratio de grupos cultivables y aproximarse a la biodiversidad real existente.

1.8 Métodos de aislamiento

1.8.1 Aislamiento en medio sólido

El aislamiento mediante siembra sobre un medio gelificado ha sido desde los inicios el sistema más utilizado (Blevins, Bronze and Koch, 2010). La versatilidad y los reducidos recursos necesarios para llevarlo a cabo, mantienen a este método como el más popular. Además, las infinitas combinaciones de nutrientes y condiciones de cultivo han demostrado ser altamente eficaces para el aislamiento de múltiples grupos de bacterias (Bonnet *et al.*, 2020). Sin embargo, los aislamientos mediante medios selectivos solidificados en placa de Petri no consiguen por si solos superar esa barrera del 1% comentada con anterioridad (Alain and Querellou, 2009). En los medios artificiales ricos en nutrientes, existe una fuerte competencia entre los diversos organismos presentes en el medio, que se manifiesta mediante fenómenos de sobrecrecimiento o de inhibición de unos organismos sobre otros, no reflejando el resultado final del aislamiento la diversidad real de la muestra, sino una sobrerrepresentación de las bacterias con un crecimiento más rápido en esas condiciones (Overmann, Abt and Sikorski, 2017). Por último, el aislamiento en medio sólido presenta grandes limitaciones a la hora de emplearlo como un protocolo de alto rendimiento. El propio formato de la placa de Petri y el hecho de emplear un medio sólido para el cultivo, suponen un gran desafío para su automatización y miniaturización.

1.8.2 Copiar el medio natural

El auge de la secuenciación masiva y el incremento exponencial del número de secuencias 16S rRNA disponibles (Zhulin, 2016), fueron la constatación de la enorme biodiversidad todavía por descubrir y sirvieron de acicate para intentar mejorar la profundidad de los aislamientos, siendo la idea de mimetizar el entorno natural una aproximación exitosa, habiéndose utilizado distintos métodos con notables resultados. Para lograrlo, la forma más sencilla consiste en realizar el aislamiento “*in situ*”. Tecnologías como el I-Tip o el I-Chip permiten realizar aislamientos en el propio ecosistema. El I-Tip mediante dispositivos insertados en el propio sustrato (Jung *et al.*, 2014) y el I-chip (Nichols *et al.*, 2010) a través de una matriz con microcompartimentos que impiden el paso de las bacterias pero permiten el intercambio de nutrientes y señales químicas entre los distintos microorganismos y también con el medio (**Figura 1.7**).



Figura 1.7: I-Chip siendo retirado del sustrato en un aislamiento “*in situ*” (Copyright©2015, Springer Nature).

Es de resaltar el aislamiento mediante la tecnología I-Chip de la β -proteobacteria *Eleftheria terrae*, productora del novedoso antibiótico teixobactina (Piddock, 2015). Esta metodología presenta la evidente dificultad que supone realizar el aislamiento “*in situ*” en algunos ambientes como puede ser el fondo marino. Además, son difícilmente adaptables a un sistema de alto rendimiento debido a su compleja automatización.

En un punto intermedio, que prescinde del aislamiento “*in situ*” pero permite la comunicación y la difusión de nutrientes, se encuentran la cámara de difusión (Lewis *et al.*, 2010) y la tecnología Microdish[®] (Ingham *et al.*, 2007). En el caso de la cámara de difusión, solamente se consigue la separación física del inóculo y el sustrato permitiendo la difusión de pequeñas moléculas a través de una membrana. En cambio en la matriz de agar inoculada con la muestra, no existe ningún tipo de separación entre las células, por lo que se repetirían los fenómenos de inhibición y sobrecrecimiento anteriormente atribuidos al aislamiento en placa de Petri (Lewis *et al.*, 2010). Con la tecnología Microdish[®], se logra la individualización de los cultivos y la difusión de moléculas y nutrientes gracias a una matriz porosa de óxido de aluminio en contacto con el medio de cultivo o sustrato (Ingham *et al.*, 2007). Teóricamente los microorganismos crecerían individualizados en cada micropocillo obteniéndose cultivos puros. A pesar del evidente potencial que presentan ambos métodos especialmente el aislamiento mediante tecnología Microdish[®], las limitaciones para su empleo en aislamiento masivo y automatizado son, una vez más, importantes.

1.8.3 Métodos de aislamiento de alto rendimiento

Existen dos alternativas concebidas para realizar aislamientos de alto rendimiento que permitan aislar un elevado número de cepas de una sola muestra. Por un lado, al igual que el sistema Microdish[®], la microencapsulación (Zengler *et al.*, 2002) permite la individualización física de las células manteniendo la comunicación entre ellas y su entorno, en este caso mediante microcápsulas de agarosa donde una sola bacteria pueda multiplicarse hasta formar una colonia. Las cápsulas se mantienen en suspensión en el medio de cultivo y una vez transcurrido el tiempo de incubación las microesferas con crecimiento son seleccionadas y separadas del resto mediante citometría de flujo.

El otro sistema de aislamiento de alto rendimiento es el conocido como aislamiento por **dilución a extinción (DTE)**. Este método es utilizado desde hace 30 años (Button *et al.*, 1993) con distintos propósitos, siendo su éxito más reconocido el

aislamiento por vez primera de representantes del clado SAR11, el grupo bacteriano considerado más abundante en los océanos y que hasta ese momento había rehuido cualquier intento de cultivo (Rappé *et al.*, 2002). Dando por ciertas las estimaciones de que los representantes del grupo SAR11 suponen hasta el 35% de las bacterias presentes en las muestras marinas (Joint, Mühlhing and Querellou, 2010), el aporte realizado por este método de aislamiento es altamente relevante. El aislamiento por DTE presenta como gran desventaja la ausencia de cualquier intercambio de señales o nutrientes ya que las células se individualizan en placas multipocillo buscando obtener cultivos puros. En cambio, la realización de los cultivos en medio líquido y en placa multipocillo, lo convierte en una opción óptima para la realización de aislamientos masivos.

1.9 Aislamiento de alto rendimiento orientado a bacterias no filamentosas productoras de compuestos antitumorales

Desde el departamento de Microbiología I+D de PharmaMar se está realizando un esfuerzo por profundizar en el aislamiento de bacterias Gram negativas no filamentosas. El aislamiento del compuesto antitumoral labrenzina (Schleissner *et al.*, 2017), a partir de una α -proteobacteria (*Labrenzia alexandrii* PHM005) constituye el último fruto de dicho trabajo e incrementó el interés por el desarrollo de una plataforma de aislamiento y cribado de alto rendimiento específica para este tipo de bacterias.

El aislamiento, la identificación y el cribado de bacterias es un proceso largo y complejo que generalmente conduce a una redundancia en los géneros obtenidos y al reaislamiento de compuestos ya conocidos (Bhatnagar and Kim, 2010). En el caso de las muestras marinas, se debe sumar la dificultad añadida que supone la imposibilidad de realizar un aislamiento de alto rendimiento “*in situ*” y por lo tanto la obligatoriedad de replicar en el laboratorio las condiciones naturales del entorno donde fue recolectada la muestra. Además, al centrar nuestro aislamiento en bacterias no filamentosas, nos encontramos con una ratio de bacterias que muestran actividad en los test de actividad antitumoral por debajo del 2% (según nuestra experiencia), cuando un aislamiento dirigido hacia actinomicetos, cuenta por norma general con alrededor de un 30% (según nuestra experiencia) de cepas activas.

Dadas las limitaciones y requisitos propios del aislamiento de bacterias no filamentosas productoras de compuestos con actividad antitumoral, el diseño y

desarrollo de una plataforma para llevarlo a cabo, presenta una serie de retos específicos además de otros inherentes a cualquier tipo de aislamiento:

1.9.1 Simulación del entorno natural marino

Fitoplancton, algas, esponjas, nidarios, briozoos, moluscos, tunicados o equinodermos sujeto de estudio albergan en su interior y superficie una enorme biodiversidad microbiológica. Se estima que la microbiota asociada a una esponja puede suponer entre un 35 % y un 60 % de su masa (Brinkmann, Marker and Kurtböke, 2017). La carga y diversidad biológicas son extremadamente variables entre una muestra y otra, ya que a la variabilidad que puedan aportar las relaciones de simbiosis entre el macroorganismo y su microbiota asociada se deben sumar los factores ambientales como pueden ser temperatura, salinidad, pH, presión, época del año, etc. (Aprill, 2017). Todos estos factores hacen prácticamente imposible predecir la carga microbiológica o la biodiversidad que presenta la muestra. Debido a esto, para la realización de un aislamiento eficiente, es preciso realizar un estudio previo que permita un tratamiento dirigido de cada espécimen.

Los microambientes en los que puede desarrollarse un microorganismo marino son muy variados (Poli *et al.*, 2017) y el interés radica en reproducir en la medida de lo posible el medio natural. Para ello, se pueden fijar unas condiciones de cultivo estándar para todos los aislamientos asumiendo un incremento de no cultivables, o bien realizar un aislamiento dirigido, mucho más complejo, pero presumiblemente más eficaz. Ambas estrategias son válidas, pero para un aislamiento de alto rendimiento, hacerlo de forma dirigida para cada muestra no es factible por lo que se debe mimetizar el medio natural en la medida de lo posible sin comprometer la viabilidad del método.

1.9.3 Mantenimiento de la comunicación interespecífica y supresión de los fenómenos de competencia e inhibición

Cuanto mejor se conocen los mecanismos de comunicación entre microorganismos, mayor importancia se les reconoce como factor determinante para la viabilidad de muchas bacterias en el aislamiento. Moléculas como las acil homoserin lactonas (Bharati and Chatterji, 2013) o incluso antibióticos a concentraciones

subletales (Okada and Seyedsayamdost, 2017) tienen un importante papel tanto en la multiplicación celular como en la regulación de la síntesis de metabolitos secundarios. Por otro lado, a pesar de haberse logrado el cultivo de nuevos grupos bacterianos mediante la utilización de protocolos de aislamiento que permiten la comunicación interespecífica y con el entorno o mediante cocultivos (Bertrand *et al.*, 2014), generalmente, los organismos han podido fermentarse posteriormente en cultivo puro, por lo que no parece ser un requisito indispensable para la mayoría de las bacterias cultivables. Además, hay que tener en cuenta que la comunicación intercelular puede tener el efecto opuesto, ya que la comunicación puede ser competitiva en vez de cooperativa e inhibir la multiplicación de algunos grupos en vez de favorecerlos. Por lo tanto, puede decirse que ambas estrategias son complementarias y válidas ya que una vez más, para ampliar la biodiversidad aislada de una muestra, son necesarios varios enfoques empleados de forma simultánea.

1.9.4 Identificación taxonómica e individualización a nivel de cepa de los aislados

Tras la obtención del cultivo puro, es necesaria la identificación taxonómica de cada cepa y su individualización. Generalmente, se caracterizan los aislados mediante su perfil genético o *fingerprint* (Versalovic, de Bruijn and Lupski, 1998) y una vez individualizadas las cepas, se realiza la secuenciación del fragmento 16s rRNA para su asignación taxonómica (Kim and Chun, 2014). La redundancia en las cepas y taxonomías obtenidas con la mayoría de los métodos de aislamiento, convierten este paso en fundamental y a la vez en uno de los que consumen un mayor número de recursos. Cuando la finalidad del aislamiento no es taxonómica, como en el caso de la búsqueda de nuevos compuestos con actividad antitumoral, la optimización y agilización del descarte de las cepas sin interés marcan la diferencia a la hora de seleccionar un método u otro para el desarrollo de la plataforma de aislamiento y cribado.

1.9.5 Inducción de la actividad antitumoral

El fin último de este aislamiento es el descubrimiento de cepas bacterianas productoras de nuevos compuestos antitumorales, por lo que son necesarias fermentaciones de inducción que favorezcan la síntesis de los posibles metabolitos de

interés (Pan *et al.*, 2019). Como se expone anteriormente, la presencia de agrupaciones génicas crípticas o silenciadas obliga al desarrollo de distintas metodologías que fuercen a la cepa objeto de estudio a iniciar su biosíntesis o a incrementarla hasta límites detectables.

1.9.6 Detección de la actividad citotóxica

Tras las fermentaciones de inducción, los cultivos deben ser testados con una sensibilidad y especificidad suficiente para detectar la actividad buscada. El cribado masivo de cepas bacterianas precisa de un ensayo de actividad citotóxica con una alta sensibilidad, ya que, al aplicar las mismas condiciones de fermentación a un grupo heterogéneo de bacterias, lo primordial es la detección de las cepas productoras de compuestos con efecto antitumoral, incluso si las condiciones no son las óptimas para dicho organismo. Una vez logrado el objetivo de la selección de cepas con actividad, la producción se puede incrementar en ensayos posteriores más dirigidos.

1.9.7 De-replicación química de las muestras activas

Uno de los mayores retos de la búsqueda de nuevos productos naturales es el continuo redescubrimiento de las mismas estructuras (Zhang *et al.*, 2017). Descartar las cepas productoras de compuestos ya conocidos lo antes posible es determinante en un protocolo de alto rendimiento para hacerlo viable y no consumir recursos y esfuerzo en muestras sin interés.

1.10 Las bacterias marinas, un arsenal de nuevas moléculas en salud humana

La lucha contra el cáncer es un interés global y multidisciplinar que requerirá esfuerzos cada vez mayores por parte de la sociedad. Así como el cáncer agrupa un amplio grupo de enfermedades, su tratamiento también será diverso y requerirá de todas las armas posibles. La quimioterapia, ha jugado y jugará un papel destacado en la curación y mejora de los pacientes con cáncer y los fármacos de origen marino han

demostrado ser parte del arsenal disponible para combatirlo. A partir de bacterias marinas, se han aislado potentes compuestos antitumorales hasta el momento, pero la enorme biodiversidad todavía por estudiar, sugiere que otras muchas entidades químicas esperan a ser descubiertas. Esta tesis pretende trabajar en esa dirección, aportando un nuevo método de aislamiento de alto rendimiento para el cultivo de bacterias productoras de nuevos compuestos con actividad antitumoral.

OBJETIVOS

El objetivo principal de este proyecto de investigación es el desarrollo de una plataforma de aislamiento de alto rendimiento para el descubrimiento de nuevos compuestos con actividad antitumoral producidos por bacterias marinas. Ante el creciente interés por los grupos de bacterias no filamentosas como fuente de compuestos antitumorales, la plataforma a desarrollar pretende estar enfocada a esos microorganismos, de forma que esté adaptada a las peculiaridades y retos que supone su aislamiento. El proyecto de investigación busca implementar todos los protocolos necesarios, así como su integración con los ya existentes conformando de esta forma un proceso con aplicabilidad industrial que sirva de complemento al aislamiento en medio sólido que actualmente vertebra el trabajo del Departamento de Microbiología de PharmaMar.

Para lograr este objetivo principal, se plantean los siguientes objetivos específicos:

- Diseñar y desarrollar una plataforma de aislamiento por dilución a extinción (DTE) para el aislamiento de bacterias no filamentosas productoras de compuestos antitumorales.
- Aplicar DTE al aislamiento de la cepa productora del compuesto antitumoral labrenzina.
- Procesar mediante la nueva metodología 70 muestras marinas diversas para la valoración de la aplicabilidad industrial de la nueva plataforma de aislamiento en base a los resultados obtenidos.

MATERIAL Y MÉTODOS

2.1 Colección de muestras marinas

PharmaMar cuenta con una de las mayores colecciones de invertebrados y tunicados marinos, resultado de más de 30 años de expediciones a lugares de alta biodiversidad a lo largo del globo. Gracias a los aislamientos realizados a partir de estas muestras, la colección de bacterias marinas alberga más de 200.000 cepas.

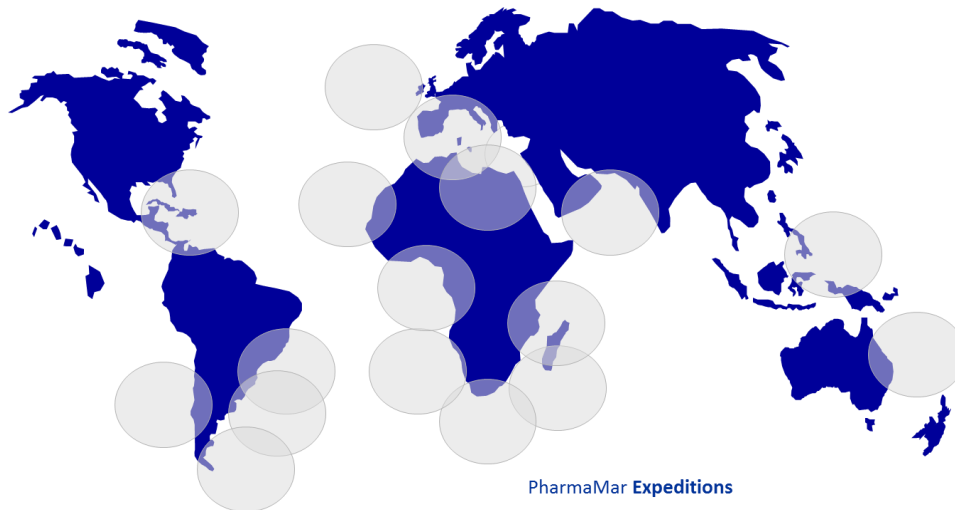


Figura 2.1: Principales localizaciones de las expediciones de PharmaMar.

Las muestras consisten en organismos completos, fragmentos de estos o sedimentos marinos criopreservados “*in situ*” en agua purificada con sales marinas (Tropic Marine® Sea Salts) y Glicerol al 20% (v/v). Las muestras se congelan a -30°C para su transporte y posteriormente a -80°C para su conservación hasta su procesado.

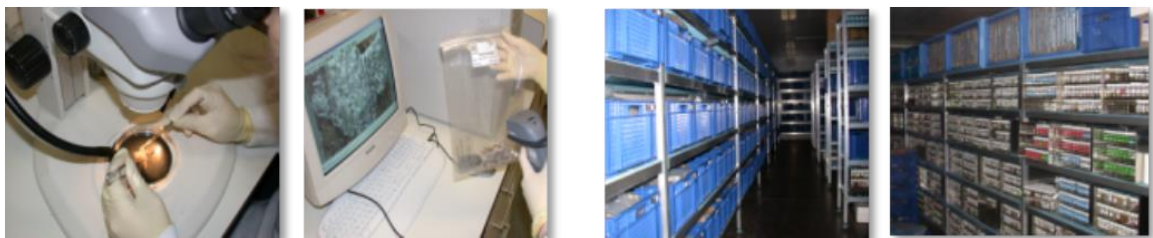


Figura 2.2: Identificación, registro y colección de especímenes de PharmaMar.

2.2 Muestra seleccionada para el desarrollo del método y la prueba de concepto

El organismo objeto de estudio es una esponja marina perteneciente al orden *Haplosclerida*, recolectado en enero de 2017 a una profundidad de 47 metros en las costas de Palau (02° 55.657'N 131° 47.592'E) en el océano Pacífico Oeste. La muestra fue preservada directamente a -30°C en agua con glicerol (20% v/v) y sales marinas (Tropic Marine PROREEF® 2.7% p/v), y posteriormente a -80°C una vez llegada al laboratorio.

La muestra fue seleccionada para la prueba de concepto en base a los resultados obtenidos en su aislamiento en medio sólido, donde se obtuvo la cepa ANN-17-096-035, productora del antitumoral labrenzina.

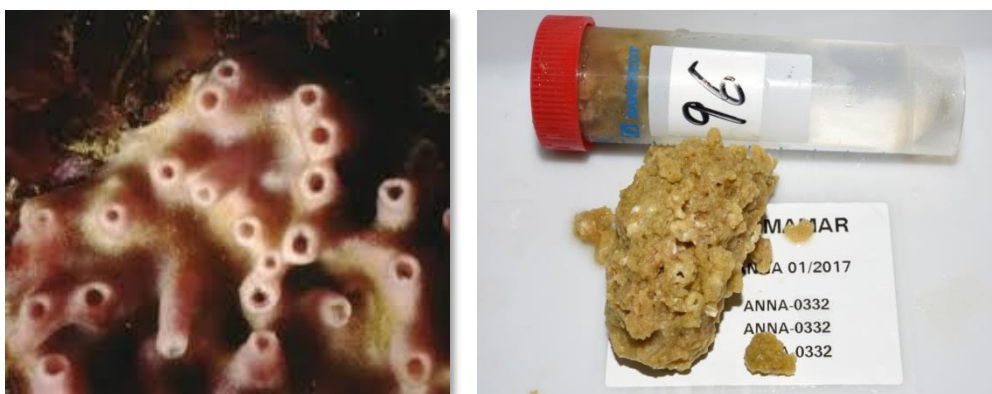


Figura 2.3: Esponja del orden *Haplosclerida* en su medio natural (izquierda) y previo a su procesado para aislamiento en laboratorio (derecha).

2.3 Desarrollo y parámetros del método

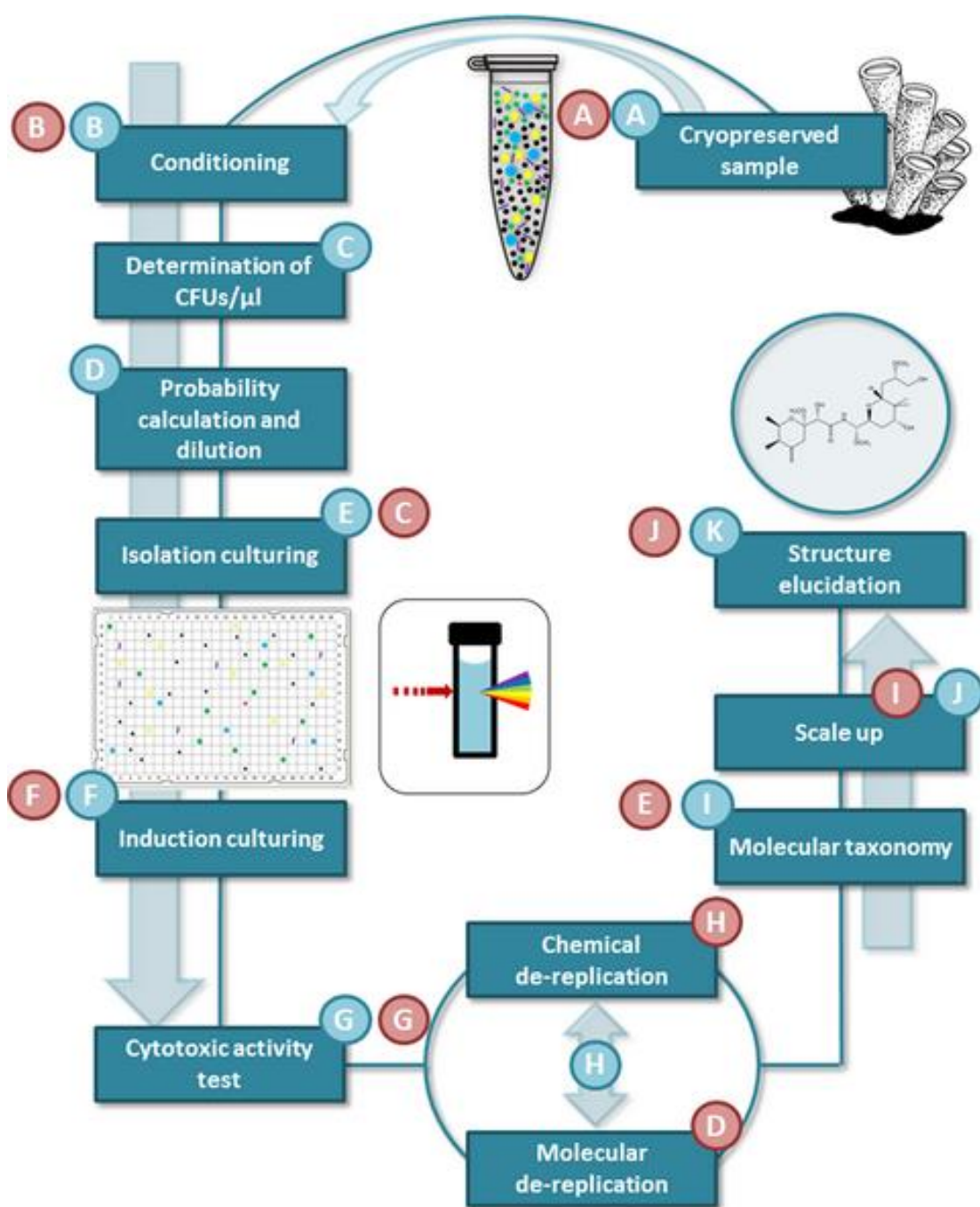


Figura 2.4: Diagrama con los pasos del protocolo de aislamiento y cribado desarrollado en este trabajo de investigación (letras azules), desde la muestra criopreservada (A), hasta la elucidación estructural de los nuevos compuestos (K). Las letras rojas representan el flujo que seguiría el aislamiento clásico en medio sólido, resaltando las diferencias entre ambas metodologías (Benítez *et al.*, 2020).

2.3.1 Acondicionamiento de la muestra

El paso inicial en el procesamiento es el de homogeneización para poder proceder posteriormente a la siembra, independientemente de que el aislamiento se lleve a cabo en medio sólido o líquido. En el caso de un protocolo de aislamiento por DTE, el homogeneizado obtenido debe permitir una siembra reproducible que garantice un número de aislados similar en todas las placas/réplica.

Las muestras criopreservadas a -80°C en tubos de 50 ml, se descongelaron previamente a 23°C durante 2 horas y una vez a temperatura ambiente, fueron homogeneizadas mediante disgregación mecánica en mortero. La presencia de fragmentos de tejido o sustrato en el homogeneizado resultante afectan negativamente a la reproducibilidad en la siembra directa en medio sólido, por lo que se optó por un filtrado suave a través de una malla metálica ($\varnothing 200\mu\text{m}$) con la ayuda de un soporte de filtro (Millipore Sigma XX3002541).

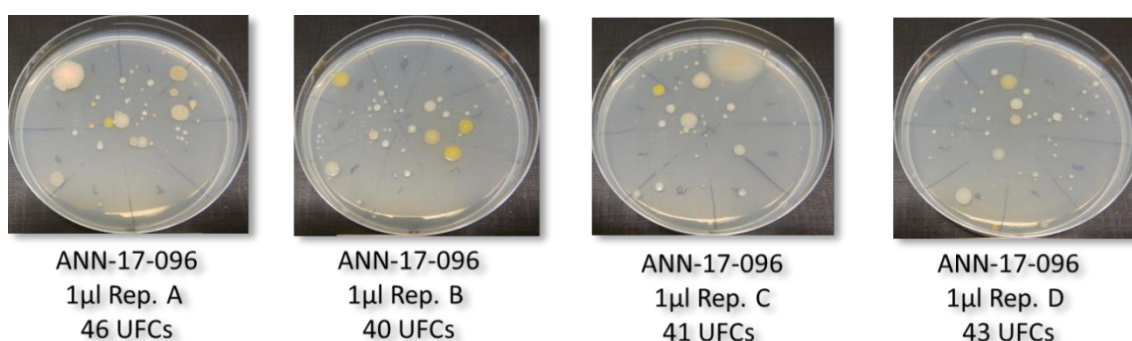


Figura 2.5: Réplicas en medio sólido de la muestra ANN-17-096L sembradas con 1 μl de homogeneizado filtrado. Independientemente de la diversidad morfológica observada entre réplicas, la reproducibilidad en el número de UFC por placa es elevada.

Para evaluar la efectividad de este tratamiento, se llevó a cabo una siembra de réplicas del homogeneizado tipo (ANN-17-096L) en medio sólido, realizando tras la incubación el recuento de unidades formadoras de colonia (UFC). Al analizar la comparativa entre las UFC obtenidas en las réplicas de homogeneizado filtrado y sin filtrar, se observó que las réplicas sembradas con homogeneizado filtrado presentaban

una desviación estándar mucho menor y una elevada agrupación de datos (**Figura 2.6**) con una reducción mínima del número de UFC/placa.

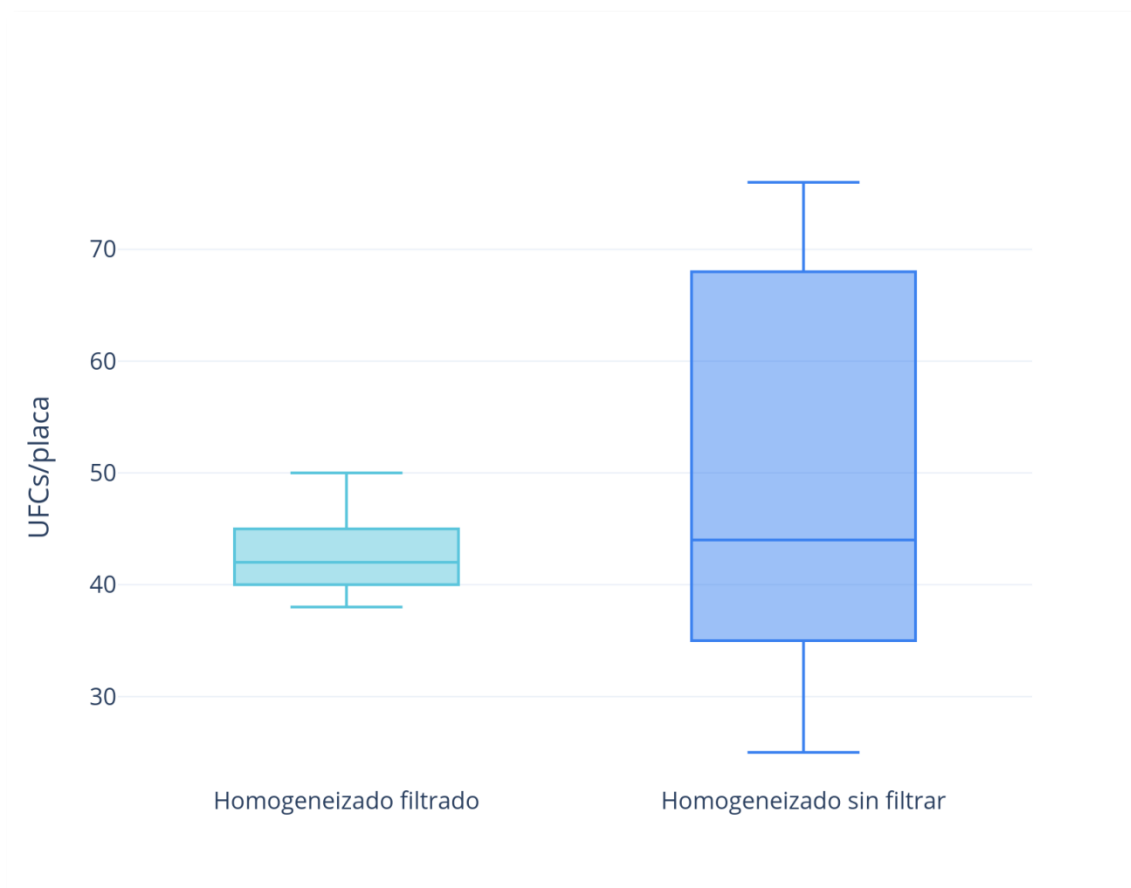


Figura 2.6: Comparativa entre el número de UFC/placa obtenidos tras la siembra con homogeneizado filtrado y homogeneizado sin filtrar de la muestra ANN-17-096L.

2.3.2 Determinación de Unidades Formadoras de Colonia (UFC) en las muestras

Aunque las condiciones de aislamiento se mantengan constantes, el crecimiento obtenido en cada una varía enormemente debido a que la carga biológica puede diferir en varios órdenes de magnitud. Las dos opciones generalmente empleadas para ajustar la dilución a aplicar al homogeneizado son el contaje en cámara cuentaglóbulos o el recuento mediante citometría de flujo. Ambas metodologías contabilizan de forma directa el total de células (tanto las muertas como las vivas viables y no viables). Debido a que resulta muy difícil distinguir las células viables de las no viables, se inoculan

generalmente varias células en cada pocillo esperando obtener la viabilidad de solo una de ellas (Song, Oh and Cho, 2009). Por todo ello, para el cálculo de las diluciones de homogeneizado, se optó por una siembra previa de este en medio sólido y el conteo directo del número real de UFC/ μ L obtenidas, que serán las esperadas en el aislamiento posterior. Para este ensayo, se sembraron 3 réplicas de distintos volúmenes (10, 5, 1, 0.5 y 0.1 μ L) del mismo homogeneizado control (ANN-17-096L) y se realizó el recuento de UFC tras diez días de incubación a 28°C para poder valorar tanto la reproducibilidad entre las réplicas como la proporcionalidad entre los distintos volúmenes en función de la densidad de UFC presentes en las placas Petri.

En la **Figura 2.7** se representa la media de UFC/placa observadas para cada volumen de siembra (1) así como el número esperado para cada volumen en función del número observado (2, 3, 4, 5, 6).

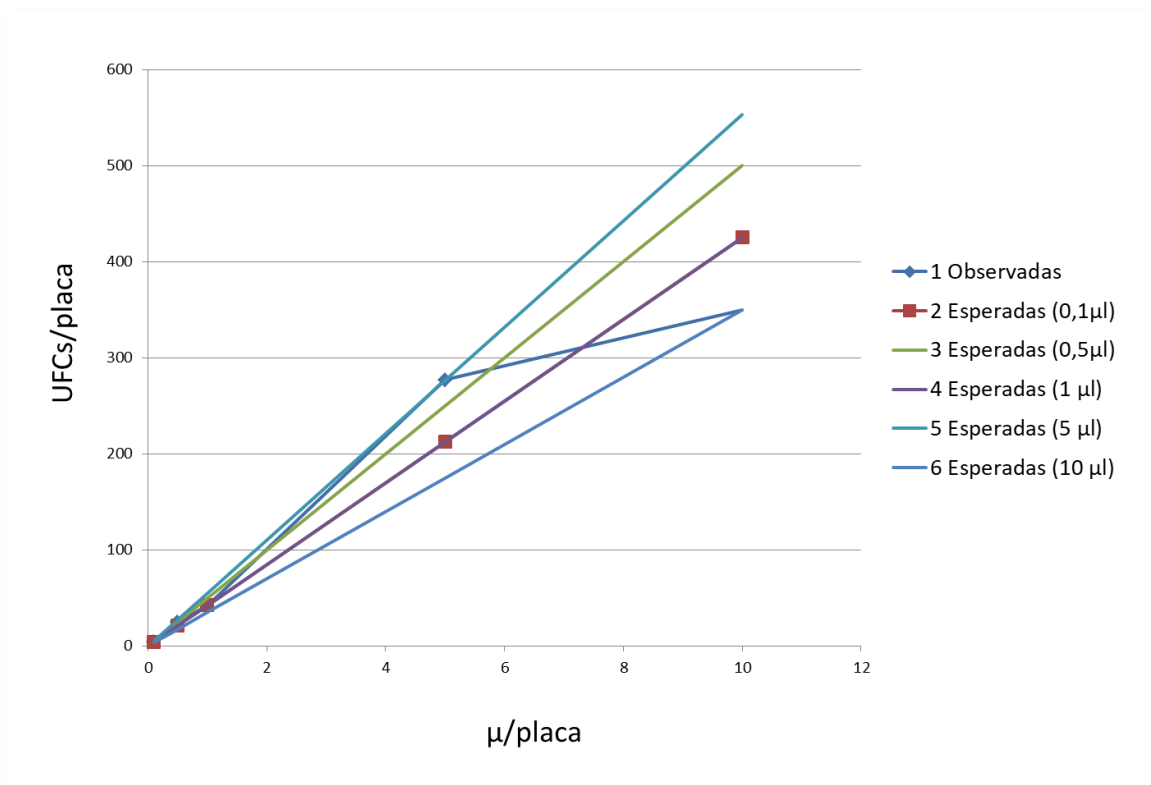


Figura 2.7: Representación gráfica de la media de UFC/placa esperadas (2, 3, 4, 5, 6), frente a observada (1) para los distintos volúmenes sembrados.

El número de UFC medio observado en las siembras con 10 μL (1) resultó ser mucho menor del esperado en comparación con el resto de volúmenes (2, 3, 4, 5, 6), lo cual podría indicar que la excesiva proximidad entre las colonias conlleva fenómenos de competición o inhibición que impedirían el crecimiento de una parte de los organismos presentes en la muestra. A pesar de que lo esperable sería una progresión lineal, los resultados muestran que un número de colonias por placa superior a 200 podría llevar a errores, infravalorando la densidad biológica de la muestra. Respecto a la reproducibilidad entre réplicas, tal como se puede observar en el Box Plot de la **Figura 2.8**, se redujo al incrementarse el número de UFC/ μL . En este caso, se observó una elevada variabilidad a volúmenes de siembra de 5 y 10 μL tal como refleja la desviación estándar. En cambio, los datos para las siembras de 1, 0,5 y 0,1 μL , mostraron una gran acumulación de valores como se refleja en la reducida amplitud de las cajas.

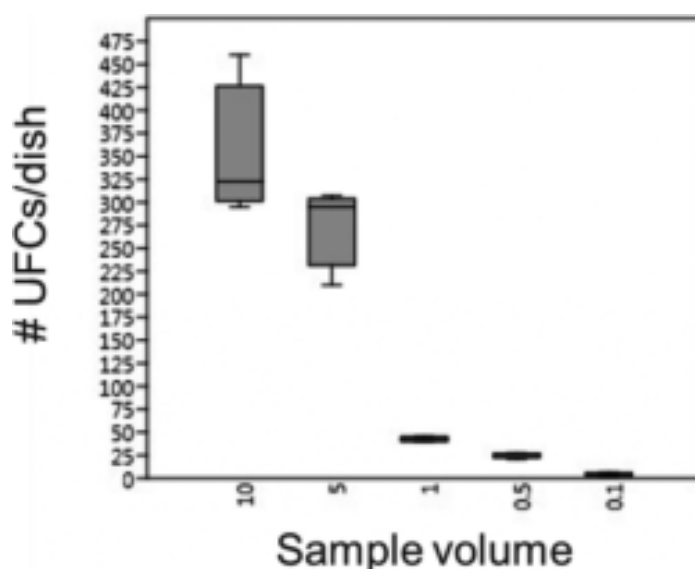


Figura 2.8: Representación gráfica mediante un Box Plot de los resultados obtenidos con los distintos volúmenes de siembra para la muestra ANN-17-096L.

En base a estos resultados, se optó por crecimientos inferiores a 100 UFC por placa para el cálculo de la dilución para aislamiento para evitar problemas de reproducibilidad (a 5 y 10 μL para la muestra ANN-17-096L) y proporcionalidad (a 10 μL para la muestra ANN-17-096L). Logrando crecimientos inferiores a 100 UFC/placa es posible reducir el número de réplicas manteniendo una alta fiabilidad, optimizando de esta forma este paso previo.

Respecto al volumen de siembra necesario para lograr una densidad de colonias por placa inferior a 100 y dada la gran variabilidad esperada entre muestras, se optó por fijar volúmenes en tres órdenes de magnitud (10, 1 y 0.1 μL). Estos valores, así como el número de réplicas de cada uno de ellos, han sido objeto de revisión durante los primeros aislamientos con la plataforma, fijando finalmente un número de 3 réplicas para cada volumen.

Para facilitar una siembra por extensión homogénea entre los distintos volúmenes, se prepararon tres diluciones seriadas 1/10, 1/100 y 1/1000 y se inocularon tres placas de Petri con 100 μL de cada dilución, sembrando de esta forma 10 (1/10), 1 (1/100) y 0.1 (1/1000) μL en cada grupo de réplicas (**Figura 2.9**).

La siembra se realizó sobre Marine Broth (Difco® 2216) solidificado con 16 g/L de Agar Bacteriológico (Conda®) y suplementado con cicloheximida (200 mg/L).

Tras su incubación a 28°C durante 7 días, se realizó el recuento directo de colonias bajo lupa (8X). Se establecieron como recuentos válidos para realizar el cálculo de dilución aquellos volúmenes que presentaban entre 10 y 100 UFC/placa, evitando de esta forma incluir datos aberrantes que distorsionasen el resultado. Para la obtención del número de UFC/ μL se calculó el promedio entre las réplicas de cada uno de los volúmenes de siembra. En caso de diluciones con un valor medio situado entre 10 y 100 UFCs/placa, se calculó el promedio entre ellas.

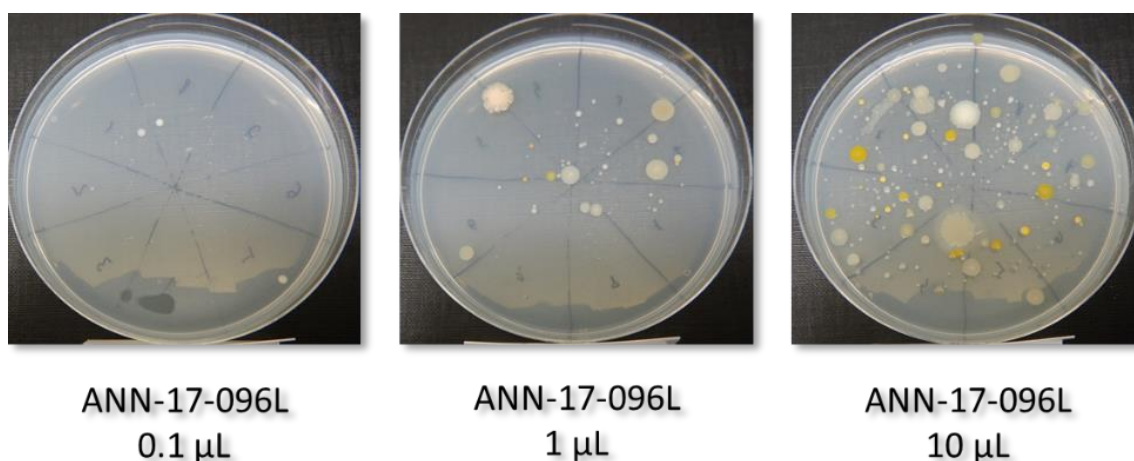


Figura 2.9: Crecimiento en medio sólido de la muestra ANN-17-096L a los tres volúmenes de siembra seleccionados.

2.3.3 Cálculo de probabilidad y dilución

Las inoculaciones calculadas en base a recuentos de células, llevan en muchas ocasiones a crecimientos muy deficientes o bien excesivos que dan lugar a una elevada proporción de cultivos mixtos. El protocolo de aislamiento desarrollado en este trabajo estima la viabilidad mediante la extrapolación del número de UFC/ μ L obtenido en la siembra sobre la versión solidificada del medio que se pretende emplear para el aislamiento, obteniendo de esta forma información individualizada de cada muestra y permitiendo un cálculo de dilución más aproximado que el obtenido con las metodologías descritas anteriormente (cámara cuantaglobulos o citometría de flujo). Una vez conocida la densidad de UFC/ μ L que presenta en medio sólido la muestra objeto de estudio, se puede extrapolar dicha densidad al aislamiento en medio líquido. El objeto de la dilución es lograr cultivos puros en cada pocillo inoculado y se calcula aplicando la regla de la multiplicación para el cálculo de probabilidad de eventos independientes (**Ecuación 2.1**), que establece que dos eventos estadísticamente independientes tienen una probabilidad de que sucedan igual al producto de sus probabilidades.

$$P (A \cap B) = P (A) \times P (B)$$

$$0.05 = P/384 \times P/384 \quad P = 85.86$$

Ecuación 2.1: Fórmula para el cálculo de probabilidad de dos eventos estadísticamente independientes, donde $P(A)$ es la probabilidad de que ocurra el evento 1, $P(B)$ es la probabilidad de que ocurra el evento 2 y $P(A \cap B)$ es el producto de las dos probabilidades y representa la probabilidad de que ambos eventos tengan lugar.

Al igual que sucede con un dado en el que la probabilidad de que salga una cara u otra es de 1/6, en el caso de este aislamiento, la probabilidad de que una célula sea inoculada en un pocillo u otro será de $1/n^{\circ}$ de pocillos de la placa. La plataforma desarrollada, emplea placas microtiter de 384 pocillos para el paso de aislamiento, por lo que la probabilidad sería de 1/384 si inoculamos toda la placa con una dilución que contenga una sola célula. La dilución óptima debe lograr el mayor número de pocillos

crecidos por placa y a su vez el menor número posible de pocillos doblemente inoculados. Considerando un porcentaje de pocillos con cultivos mixto del 5%, que se correspondería con una $P(A \cap B)$ de 0.05, el número esperado de pocillos crecidos por placa sería de 85,86. Se optó finalmente por 80 (≈ 85.86) como el valor teórico a lograr, calculando el volumen de homogeneizado filtrado a inocular para ese número de UFC por placa microtiter (**Ecuación 2.1**).

Mediante el cálculo expuesto en la **Ecuación 2.2**, se obtuvo el volumen de homogeneizado a diluir en 50 mL de medio de cultivo que posteriormente se inoculó en 10 placas microtiter de 384 pocillos para el aislamiento por DTE.

$$80 / (\text{UFCs}/\mu\text{l}) = \text{Vol. homogeneizado} / \text{placa microtiter}$$

$$\frac{(\text{Vol. homogeneizado} / \text{placa microtiter}) \times \text{Vol. inóculo}}{n^{\circ} \text{ de pocillos} \times n^{\circ} \text{ de placas}} = \text{Vol. homogeneizado} / 50 \text{ ml}$$

$$(\text{Vol. de homogeneizado} / \text{Vol. Inóculo}) \times F_c = \text{Vol. final} / 50 \text{ ml}$$

Ecuación 2.2: Cálculo del volumen de homogeneizado para la inoculación de 80 aislados por placa microtiter de 384 pocillos. El volumen de homogeneizado calculado debe multiplicarse por el factor de conversión (F_c) con un valor para las condiciones estándar de ensayo de 0.5.

Durante los ensayos de aislamiento en medio líquido, se observó que el número de UFC obtenidas en medio líquido era superior al esperado, doblando generalmente al calculado. Este mayor crecimiento obligó a aplicar un factor de conversión de 0.5 a aplicar al volumen calculado de siembra y de esta forma mantener el umbral de crecimiento siempre por debajo de los 80 pocillos por placa, ya que de no hacerlo se esperaría un aumento del número teórico de pocillos doblemente inoculados hasta suponer un 20% del total.

2.3.4 Cultivos para aislamiento

A pesar de que la metodología DTE se ha empleado en múltiples ocasiones para el aislamiento de cepas bacterianas provenientes de muestras complejas, no se ha descrito en la literatura el empleo de placas microtiter de 384 pocillos para este fin. En este proyecto de investigación industrial se opta por este formato por razones técnicas ya que para una plataforma de alto rendimiento que pretende aislar miles de colonias por muestra, el manejo de estas debe ser lo más automatizado y miniaturizado posible.

El volumen de trabajo de estas placas en estático es de un máximo de 120 μL por pocillo. Por eso, para una fermentación en agitación, fue necesario reducir dicho volumen a menos de la mitad, llevando a cabo los cultivos de aislamiento en microfermentaciones de 50 μL .

Para la inoculación, se descongeló un vial de 200 μL del homogeneizado criopreservado a -80°C y se agitó en vortex durante un minuto para homogeneizar la muestra. A continuación, se dispensó el volumen de muestra previamente calculado en 50 mL de medio Marine Broth (Difco® 2216), que corresponde con el volumen necesario para la inoculación de 10 placas microtiter. Los cultivos de aislamiento se llevaron a cabo en placas microtiter de 384 pocillos de fondo plano aptas para medición de densidad óptica. Para cada muestra se inocularon 20 placas microtiter por lo que previamente a la siembra se inoculó el volumen de homogeneizado calculado en 2 tubos Falcon® con 50 mL de medio.

El llenado e inoculación de las placas para aislamiento se realizó con la ayuda de un equipo de manejo de líquidos Evo100 (Tecan®). Cada pocillo con 40 μL de medio Marine Broth (Difco® 2216) fue inoculado con 10 μL de la dilución del homogeneizado preparada con anterioridad. Para garantizar la siembra homogénea de las placas, el inóculo se mantuvo en agitación constante mediante el agitador Te-Shaker (Tecan®).

Una vez finalizado el paso anterior, las placas fueron selladas para preservar su esterilidad y controlar la evaporación. La incubación de los cultivos de aislamiento se realizó a 280 rpm y 28°C en agitadores rotatorios Kuhner® con 50mm de excentricidad durante el tiempo estipulado para cada muestra.

Diversos factores técnicos que resultan críticos fueron evaluados por separado:

Evaporación

Las fermentaciones para aislamiento se llevaron a cabo a 28°C y durante tiempos de incubación que podrían ser prolongados. El reducido volumen de fermentación unido a una elevada relación superficie volumen que presenta el formato provocan una intensa evaporación y un marcado efecto borde. Para reducir en la medida de lo posible la evaporación, se testó con éxito el sellado de las placas, lográndose ratios de crecimiento similares en fermentaciones en paralelo de placas selladas y sin sellar. Por tanto, se adoptó el sellado de las placas de forma generalizada para fermentaciones de hasta 10 días de duración.

Agitación

La viscosidad y tensión superficial de los medios acuosos empleados en el aislamiento dificultaban la oxigenación, afectando negativamente al crecimiento de los microcultivos. Para evaluar la influencia de la velocidad de agitación en el crecimiento de los aislados, se testaron diferentes velocidades de agitación mediante el seguimiento de la aparición de pocillos crecidos en el tiempo.

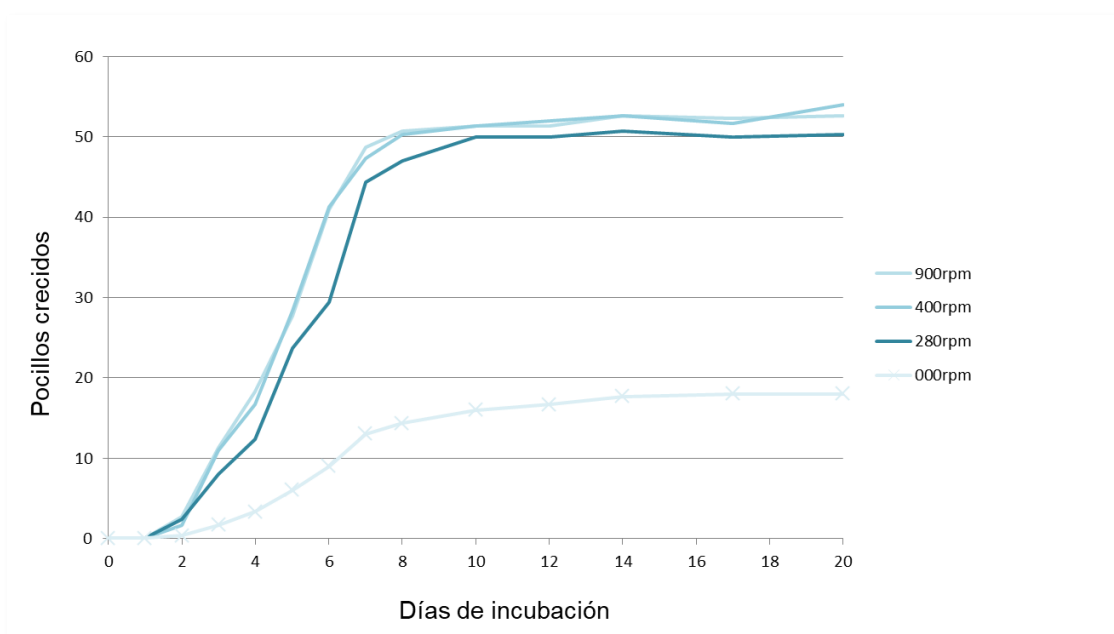


Figura 2.10: Evolución en el tiempo del número de pocillos con crecimiento observable en función de la agitación.

Como se observa en la **Figura 2.10**, la agitación juega un papel determinante en la viabilidad del aislamiento. Las réplicas sin agitación, mostraron un crecimiento muy deficiente, con una media de pocillos crecidos mucho menor que la obtenida con las demás velocidades ensayadas. A pesar de presentar una media de pocillos crecidos ligeramente inferiores a la de las réplicas fermentadas a 900 y 400 rpm, se adoptó 280 rpm como velocidad de agitación de referencia para los aislamientos dado que dicha diferencia no justificaba los requerimientos técnicos que supondrían velocidades de agitación más elevadas.

Tiempos de incubación

Cada microorganismo cuenta con un tiempo de generación propio para unas determinadas condiciones de fermentación. Para realizar cultivos de aislamiento a partir de muestras complejas de las que se desconoce la biodiversidad que albergan, el tiempo de incubación se convierte en un factor crucial, tanto para lograr el crecimiento de la mayor diversidad posible, como para mantener la viabilidad de las cepas aisladas.

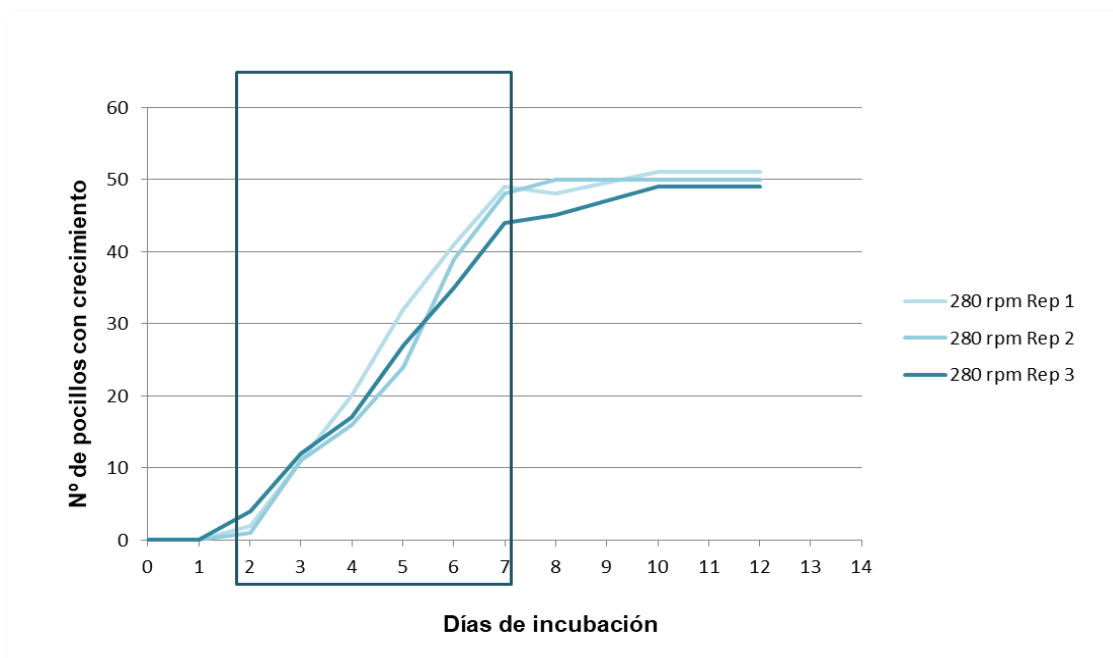


Figura 2.11: Representación del número de pocillos que presentan crecimiento en función de los días de incubación.

Algunas bacterias tendrán tiempos de generación muy cortos y dichos cultivos presentarán turbidez visible rápidamente, en cambio, otras con tiempos de generación más largos, deberán ser mantenidas en incubación durante un tiempo mayor hasta ser detectables. Para fijar el tiempo óptimo que permita obtener el máximo número de aislados, se llevaron a cabo fermentaciones para aislamiento en las condiciones anteriormente fijadas realizando el recuento diario de cultivos crecidos.

En la **Figura 2.11** se puede ver el comportamiento de las distintas réplicas y cómo, tras 7 días de incubación, la aparición de nuevos cultivos se reduce drásticamente. Atendiendo únicamente a este criterio, se podría establecer en 8 días de incubación el punto óptimo para la interrupción de la fermentación y la obtención de los cultivos crecidos. Sin embargo, se observó también que, tras cuatro días de incubación, más de un tercio de los cultivos ya habían alcanzado una densidad celular visible (**Figura 2.11**).

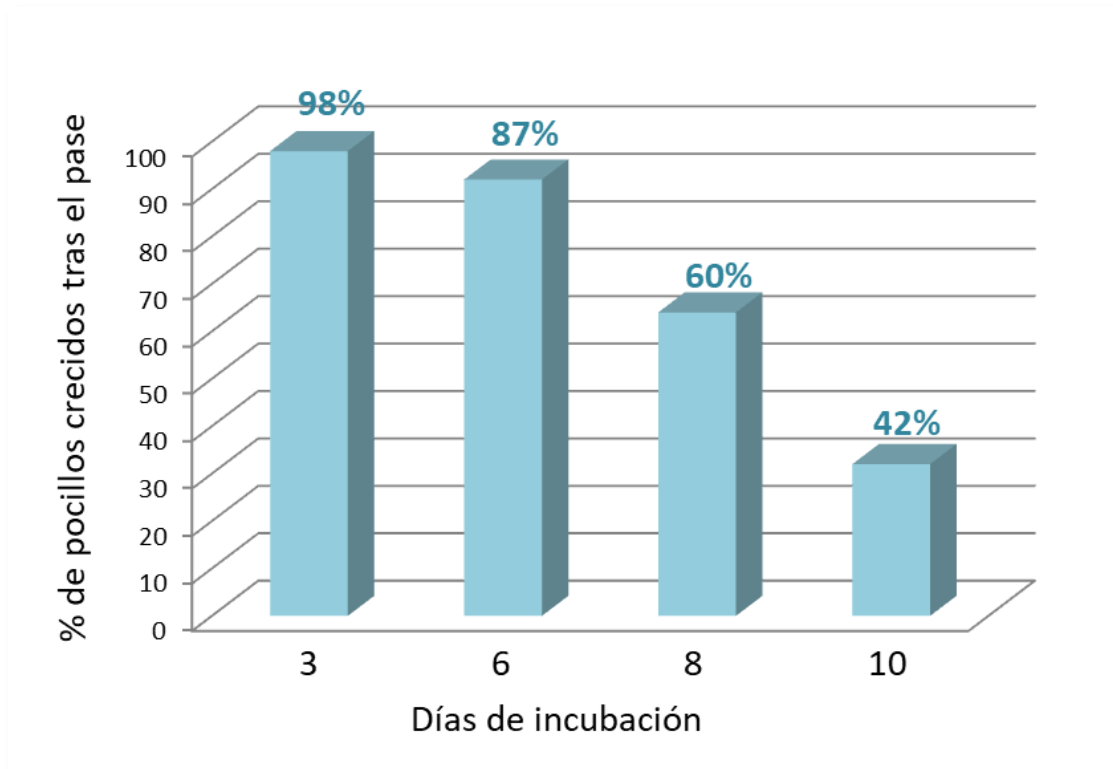


Figura 2.12: Representación del porcentaje de cultivos recuperados en función del tiempo de incubación para aislamiento.

Debido al crecimiento exponencial que presentan las fermentaciones bacterianas, es probable que, tras alcanzar el nivel de detección, los cultivos superen rápidamente la densidad máxima tolerable, incrementándose a partir de ese momento el riesgo de muerte celular por falta de oxígeno y nutrientes o acumulación de desechos. Para evaluar este aspecto, se llevaron a cabo aislamientos en paralelo con la muestra ANN-17-096L, interrumpiendo la incubación a distintos tiempos y realizando un pase a medio fresco de los pocillos crecidos, registrando de esta manera la influencia del tiempo de fermentación en la viabilidad de los mismos. En la **Figura 2.12** se observa cómo, a partir de tres días de incubación, se redujo la viabilidad de los aislados. Atendiendo al ritmo de aparición de los cultivos crecidos (**Figura 2.13**), se optó por adoptar tiempos de incubación para aislamiento no superiores a 6 días, intentando de esta forma alargar en lo posible el tiempo de incubación para el aislamiento, sin comprometer la viabilidad de los aislados, ya que a partir de 8 días de incubación esta se reducía de manera drástica.

Una vez finalizado el tiempo de fermentación para aislamiento, los pocillos con crecimiento fueron detectados mediante densidad óptica en un espectrofotómetro FLUOstar (Omega®) y se determinaron como crecidos los pocillos que superan un umbral de densidad óptica de 0.3. Los datos de absorbancia generados fueron procesados y registrados por la aplicación de gestión de información de laboratorio Nautilus (Thermo®). La recuperación de los cultivos crecidos se realizó con un robot de manejo de líquidos MicroLab Star (Hamilton®). Todos los microcultivos que igualan o superan dicho umbral fueron aspirados e inoculados en pocillos de placa Deep Well (DW) de 96 pocillos con 500 µL de medio de cultivo fresco. Para el crecimiento de los aislados se empleó el medio Sea Water (**Tabla 2.1**) que presenta un aporte de nutrientes superior al empleado en aislamiento buscando de esta forma un mejor crecimiento. La fermentación se realizó a 280 rpm y 28°C.

Medio de cultivo	Composición
Sea Water	Peptona de soja (5g/L), peptona (15 g/L) Marine Salts (Pro Reef®) (27 g/L)

Tabla 2.1: Composición del medio Sea Water, empleado para la fermentación de los aislados.

El cultivo obtenido se usó a su vez como inóculo para las distintas condiciones de inducción y para la criopreservación de la cepa hasta la obtención de los resultados de actividad antitumoral. En este punto, un último factor a evaluar fue el tiempo de incubación del inóculo y cómo influyó en el porcentaje de recuperación de las cepas aisladas. Se observó que, tras 72 horas de incubación, un 92% de las muestras habían alcanzado un crecimiento observable y que, a partir de ese tiempo de incubación, el porcentaje de cepas crecidas se incrementó en un 2% adicional (**Figura 2.13**). Con los datos de viabilidad en función del tiempo de incubación del ensayo anterior como referencia, se optó por establecer el tiempo de incubación del inóculo en 72 horas y evitar de esta forma pérdidas de viabilidad por sobrecrecimiento de aquellas cepas con un menor tiempo de generación.

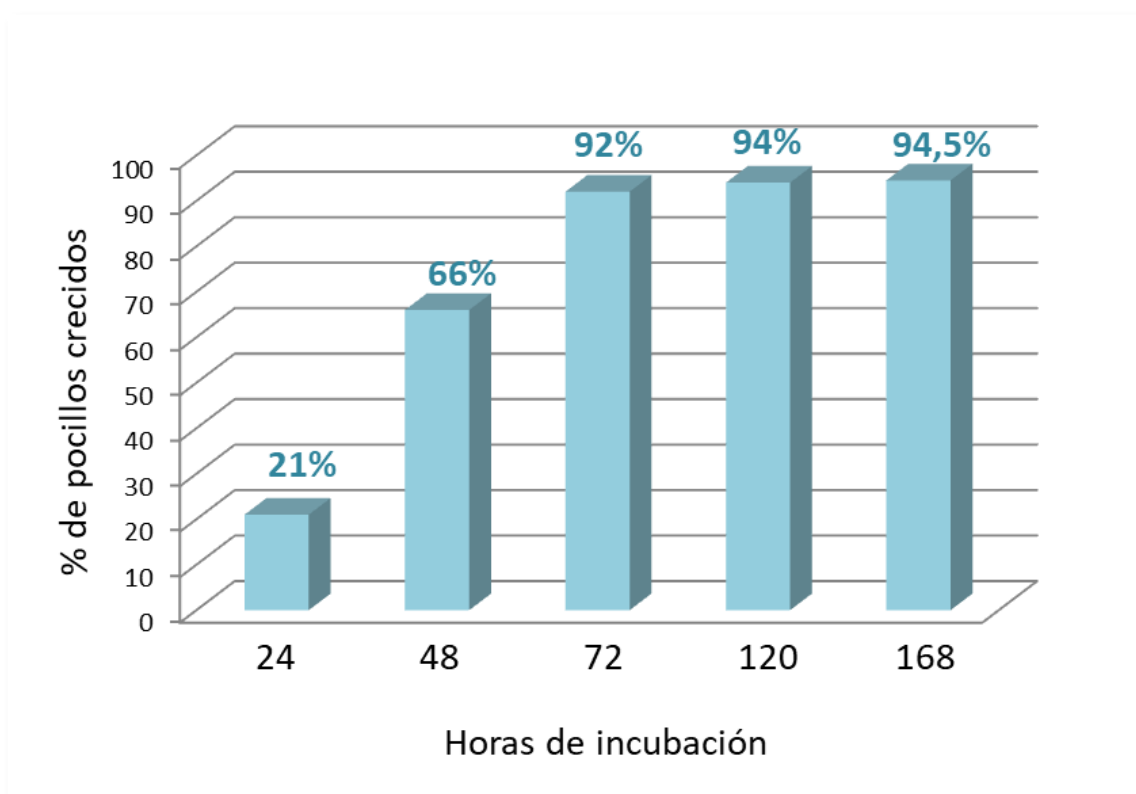


Figura 2.13: Representación del porcentaje de cultivos crecidos tras el pase desde la placa de aislamiento en función del tiempo de incubación.

Una vez finalizada la fermentación de los inóculos, el cultivo obtenido se procesó con la ayuda de un equipo Tecan® EVO100. Por un lado, se inocularon con 20 µl de cultivo (4% v/v) los medios de inducción y por otro, el volumen de inóculo sobrante se

criopreservó provisionalmente con glicerol al 20% a -30°C hasta conocer los resultados de actividad antitumoral.

2.3.5 Cultivos de inducción

Para llevar a cabo la inducción de metabolismo secundario, cada microorganismo fue incubado en medios y condiciones diseñados específicamente. Para ello, se usaron medios de inducción desarrollados previamente para la fermentación de cepas provenientes de aislamiento clásico en medio sólido.

Al igual que sucede con el aislamiento, en el que es necesario el empleo de la mayor variedad de enfoques posible para incrementar la biodiversidad obtenida, en los cultivos de inducción, cuantas más condiciones de fermentación sean empleadas, mayor será la diversidad química que se logre. Las entidades químicas sintetizadas por los microorganismos marinos son fruto de múltiples rutas metabólicas con mecanismos de regulación con una mayor o menor especificidad. Por lo tanto, una sola condición de fermentación no puede servir de inductor global. Como protocolo de aislamiento de alto rendimiento, el número de condiciones a testar con la plataforma desarrollada está limitado por el elevado número de cepas por muestra que se busca procesar. En base a la experiencia previa del departamento, para los primeros ensayos de aislamiento se optó por realizar la inducción con dos medios de probada eficacia promoviendo la síntesis un amplio abanico metabolitos secundarios en bacterias no filamentosas.

Por otro lado, se optó por un periodo de incubación de 96 horas ya que, por trabajos previos, se sabe que la mayor activación del metabolismo secundario se produce generalmente al final de la fase exponencial del crecimiento o al inicio de la fase estacionaria (aprox. 96 horas).

Los cultivos de inducción se llevaron a cabo en placas Deep Well de 96 pocillos con un volumen de trabajo por pocillo de 2 ml en un volumen de 500 µL de medio. Para este paso de inducción se emplearon dos medios distintos, 3MTM 16 F y 2MPD1 14 F (**Tabla 2.2**) en los que las cepas fueron fermentadas durante 96 horas a 28°C y con una agitación de 280rpm en agitadores Kuhner® con 50 mm de excentricidad.

Tras las 96 horas de incubación, se transfirieron 300 µL de cada medio de cultivo a un mismo pocillo en placa DW de 96 pocillos para aumentar el rendimiento del método reduciendo a la mitad el número de extractos enviados a ensayo de actividad

antitumoral. Los 600 μ L totales fueron congelados y mantenidos a -30°C hasta su liofilización (LyoBeta 25, Telstar[®]).

Medio de cultivo	Composición
3MTM16 F	Harina de soja (30g/L), Corn Step Powder (Roquette [®]) (10 g/L), glicerol (5 g/L), CaCO ₃ (12 g/L), Marine Salts (Pro Reef [®]) (27 g/L)
2MPD1 14 F	Harina de soja (30g/L), bacto peptona (3 g/L), Corn Step Powder (Roquette [®]) (3 g/L), manitol (20 g/L), dextrina (5 g/L) CaCO ₃ (5 g/L), Marine Salts (Pro Reef [®]) (10 g/L)

Tabla 2.2: Composición de los medios de cultivo empleados para la inducción del metabolismo secundario de las cepas aisladas.

2.3.6 Extracción

Tras la liofilización se llevó a cabo la extracción con metanol, acetona y agua (1:1:0.2 v/v) en las propias placas DW. La extracción se realizó mediante la adición de 1,5 mL de la mezcla de disolventes con la ayuda de un equipo Genesis RSP150 (Tecan[®]) y una agitación a 150 rpm durante una hora. Posteriormente, las placas fueron centrifugadas y 1 mL del sobrenadante fue transferido a placas DW de 1.2 mL/pocillo mediante un robot EVO100 (Tecan[®]), donde los disolventes se evaporaron durante 24 horas en Speed Vac[®] hasta lograr un extracto seco que fue posteriormente valorado en los ensayos de detección de actividad antitumoral.

2.3.7 Ensayo de actividad antitumoral

En el ensayo de actividad antitumoral se testó el extracto proveniente de cada cepa frente a cuatro líneas tumorales: A549 (ATCC-185, cáncer de pulmón), HT-29 (ATCC HTB-38, cáncer de colon), MDA-MB-231 (ATCC HTB-26, cáncer de mama) y PSN-1 (ATCC CRL-3211, cáncer de páncreas). Para los test, las células fueron

sembradas en placas microtiter de 96 pocillos a una concentración de 5000 células por pocillo y en alícuotas de 150 μ L de medio Dulbecco's Modified Eagle médium (DMEM). Durante 18 horas, se permitió la adhesión de las células a la superficie de la placa y una vez transcurridas, 50 μ L de extracto resuspendido en medio DMEM con dimetilsulfóxido (DMSO) al 4% fueron añadidos y testados para cada línea celular. Tras 72 horas de tratamiento, los efectos sobre la supervivencia celular fueron estimados mediante el algoritmo NCI60 (Shoemaker, 2006) tras la medición de la densidad óptica, obteniendo los valores de IG₅₀ de cada extracto para cada una de las líneas tumorales. Basándose en experiencias previas, se estableció como umbral para considerar un extracto como citotóxicamente activo un valor de IG₅₀ <25% para tres de las cuatro líneas tumorales.

2.3.8 De-replicación

Generalmente, la asignación de la taxonomía es el primer paso tras la obtención de un cultivo puro. Sin embargo, en este protocolo, las cepas aisladas se llevan directamente a fermentaciones de inducción para ser testadas inmediatamente después en busca de actividad antitumoral. El reducido número de bacterias no filamentosas que presentan este tipo de actividad ha permitido descartar un 98% de los cultivos en este primer paso.

De-replicación molecular

Los cultivos correspondientes a los extractos que mostraron actividad antitumoral, conservados a -30°C, fueron descongelados a temperatura ambiente y sembrados en medio Marine Broth 2216 (Difco®) sólido para evaluar que se trata de cultivos puros. El ADN genómico de los cultivos puros seleccionados fue extraído mediante el kit Quiagen DNeasy tissue (Quiagen). La huella genómica para la derreplicación se obtuvo empleando el cebador ERIC-2 (5'-AAG-TAA-GTG-ACT-GGG-GTG-AGC-G-3') y las condiciones de amplificación descritas por Versalovich et al. (J Versalovic, Koeuth and Lupski, 1991). Las bandas generadas por electroforesis fueron analizadas por QIAxcel (Quiagen) y los tamaños de fragmento calculados mediante marcadores (100pb – 2,5 KB, Qiagen). Los agrupamientos se llevaron a cabo con BioNumerics v7.6.3 empleando el coeficiente de correlación de Pearson con una

corrección del 2% estableciendo un valor límite de similitud del 95% para separar genéticamente los distintos aislados. De aquellos considerados genéticamente iguales se seleccionaron para el siguiente paso los que presentaron un dato de actividad antitumoral más elevado.

De-replicación química

El extracto sobrante tras los ensayos de actividad antitumoral fue empleado para la de-replicación química de las cepas que resultaron activas. El extracto seco se resuspendió en 100 μL de metanol y se inyectó 1 μL para el análisis por HPLC. Para buscar compuestos conocidos mediante su espectro de masas se empleó un espectrofotómetro 1100 LC/MSD Series (Agilent®) para el registro de (+)-ESIMS. La espectroscopia de masas de alta resolución se llevó a cabo con la técnica ESIMS en un equipo TOF LC/MS 6230 (Agilent®).

Parámetro	Valores
Columna	Aquity UPLC BEH C18 1.7 μm
Temperatura	25°C
Detección UV(DAD)	λ : 205, 254 nm
Fase móvil	MeOH
Flujo	0.65 mL/min.
Volumen inyección	1 μL
Tiempo	15 min. (+10 min. Post run)

Tabla 2.3: Parámetros TOF LC/MS 6230 (Agilent®) para la derreplicación química de los extractos activos.

2.3.9 Taxonomía molecular

A pesar de la optimización y abaratamiento de las técnicas para la realización de la taxonomía molecular 16s rRNA, este punto continúa siendo un cuello de botella para los protocolos de aislamiento. Es por ello que en el proceso que se describe se decidió realizar el análisis taxonómico solamente a cepas candidatas a producir nuevos compuestos agilizando el procesado de las muestras y reduciendo costes y recursos invertidos.

A las cepas con actividad antitumoral se les realizó el análisis de la secuencia 16S rRNA para determinar su taxonomía basándose en la comparativa BLASTp con la base de datos SILVA LTP132 (WWW.arb-silva.de). Para la amplificación se emplearon los cebadores 63-F (5'-CAGGCCTAACACATGCAAGTC-3') y 1387-R (5'-GGGCGWGTGTACAAGGC-3') (Marchesi *et al.*, 1998). La PCR se llevó a cabo con una desnaturalización inicial a 95°C de 1 minuto seguida de 30 ciclos de desnaturalización a 94°C, alineamiento a 58°C durante 50 segundos y extensión a 72°C durante 1 minuto, finalizando con un paso final de extensión a 72°C de 10 minutos.

Para los análisis filogenéticos, las secuencias parciales 16s rRNA de las cepas seleccionadas fueron alineadas con CLUSTAL X v2 usando los parámetros por defecto y verificadas manualmente para maximizar la homología posicional. Las secuencias adicionales incluidas en el ensayo fueron obtenidas de SILVA LTPS 132. Los datos fueron sometidos al método de unión de vecinos (Saitou and Nei, 1987) y de máxima verisimilitud de inferencia filogenética. Los análisis se llevaron a cabo con PAUP v4.0b10 (Swofford, 2002). Para seleccionar el modelo evolutivo se empleó el criterio de información Akaike implementado en Modeltest v2 (Posada and Crandall, 1998), seleccionando el modelo transicional (TIM) como el más ajustado al grupo de datos. La robustez del árbol resultante fue testada mediante 1000 *bootstrapping* (Felsenstein, 1985).

2.3.10 Escalado, aislamiento de compuestos y elucidación estructural

Los pasos de escalado se diseñaron específicamente para cada cepa candidata basándose en la información obtenida del propio aislamiento y complementados con los

resultados taxonómicos. Una vez se obtuvo una cantidad de extracto activo suficiente se llevaron a cabo los pasos destinados a purificar el nuevo compuesto e identificarlo.

2.4 Aislamiento en medio sólido

Para el aislamiento en medio sólido, 30 µL de muestra homogeneizada mecánicamente fueron sembrados por extensión en placas de Petri de cada uno de los medios de aislamiento seleccionados (**Tabla 2.4**).

Medio de aislamiento	Composición
Amonium Mineral Salt (AMS)	NH ₄ Cl (0.5 g/L), K ₂ HPO ₄ (0.7 g/L), MgSO ₄ * 7H ₂ O (1 g/L), CaCl ₂ * 2 H ₂ O (0.2 g/L), FeSO ₄ * 7H ₂ O (4 mg/L), Zn SO ₄ * 7H ₂ O (0.1 mg/L), MnCl ₂ * 4H ₂ O (0.03 mg/L), H ₃ BO ₃ * (0.3 mg/L), CoCl ₂ * 6H ₂ O (0.2 mg/L), CuCl ₂ * 2 H ₂ O (0.01 mg/L), NiCl ₂ * 6H ₂ O (0.01 mg/L), Na ₂ MOO ₄ * 2H ₂ O (0.06 mg/L), Succinato de sodio (5 g/L)
Benedict agar diluído (BEN 1/2)	L-Asparagina (1.25 g/L), Glicerol (10 g/L), NaCl (2.62 g/L), KCl (0.15 g/L), Mg ₂ SO ₄ * 7H ₂ O (0.05 g/L), FeSO ₄ * 7H ₂ O (0.05 g/L), Na ₂ SO ₄ (3.75 g/L), MgCl ₂ * 6H ₂ O (1.2 mg/L), CaCO ₃ (0.05 g/L), Agar Bacteriológico (Conda®, 20 g/L)
Marine Agar	Marine Broth (Difco® 2216, 37.4 g/L)
Marine Agar + Estreptomicina	Marine Broth (Difco® 2216, 37.4 g/L), Estreptomicina (100 mg/mL)
Marine Agar + Trimetoprim	Marine Broth (Difco® 2216, 37.4 g/L), Trimetoprim (100 mg/mL)

Tabla 2.4: Medios empleados para el aislamiento en medio sólido de la muestra ANN-17-096L y su composición.

Una vez sembradas, las placas se mantuvieron por un periodo de 10 días a 28°C. Transcurrido el tiempo de incubación, las colonias morfológicamente diferentes fueron seleccionadas y sembradas en placas de Petri con medio Marine Agar (Marine Broth, Difco® 2216) para obtener cultivos puros en medio sólido. Todos los cultivos puros a nivel macroscópico fueron criopreservados a -80°C en H₂O con glicerol (20% v/v) y sales marinas (Tropic Marine PROREEF® 2.7% p/v) y caracterizados mediante su huella genómica (De-replicación molecular, Material y métodos), siendo sometido un representante de cada cepa identificada a secuenciación de su 16s rRNA para la asignación de taxonomía (ver Taxonomía molecular en Material y Métodos). Tras su conservación y caracterización, todas las cepas siguieron el mismo protocolo descrito y definido para las cepas aisladas mediante la plataforma en desarrollo.

2.5 Cinéticas de producción de labrenzina

Cepa	Origen de aislamiento	Muestra
KEN-14-087A	Sólido	KEN-14
ANN-17-096-035	Sólido	ANN-17-096
ANN-17-096L-002	DTE	
ANN-17-096L-007	DTE	
ANN-17-135L-007	DTE	ANN-17-135
NOS-18-0410L-005	DTE	NOS-18-0410

Tabla 2.5: Cepas fermentadas en los ensayos de cuantificación y su origen de aislamiento.

2.5.1 Fermentación

Cada cepa fue inoculada desde cultivos puros en medio sólido Marine Broth (Difco®2216) a medio líquido Sea Water (**Tabla 2.1**) en matraces de 100 mL con 20 mL de medio e incubadas durante 96 horas a 28°C y 220 rpm de agitación en incubadores Kuhner® con 50 mm de excentricidad. Transcurridas 96 horas, el medio de inducción fue

inoculado con un 2% v/v de dichos cultivos. Cada cepa fue fermentada para inducir la síntesis de labrenzina en un matraz de 250mL con 50mL de medio 3MTM 16 (**Tabla 2.2**) a 28°C y 280rpm.

2.5.2 Extracción

La toma de muestras (1mL de caldo de cultivo) se realizó cada 24 horas y por triplicado. El volumen de caldo total fue extraído con 5mL de acetato de etilo. Tras 1 hora de agitación, la fase orgánica fue separada de la fase acuosa y evaporada en Speed Vac® hasta obtener el extracto seco para realizar la cuantificación.

2.5.3 Cuantificación

Parámetro	Valores
Columna	Symmetry Shield RP18 3.5µm 150x4.6 mm
Temperatura	25°C
Detección UV(DAD)	λ: 205, 16 nm; λref.: off
Fase móvil	A: Agua B: AcN
Gradiente	10% al 40% B en 30 min., 40% al 60% B en 10 min., 60% B en 5 min., 60% al 100% B en 1 min., 100% B durante 14 min.
Flujo	1 mL/min.
Volumen inyección	20 µL
Tiempo	60 min. (+20 min. Post run)

Tabla 2.6: Método analítico empleado para la cuantificación por HPLC del contenido en labrenzina de los caldos de fermentación a partir del extracto seco obtenido tras su extracción con acetato de etilo.

La cuantificación de labrenzina presente en los caldos de fermentación se realizó con la ayuda de un equipo HPLC Agilent® 1100 equipado con un detector DAD. En la **Tabla 2.6** se describe el método analítico empleado.

RESULTADOS

TEMA 1: Aislamiento de la cepa de *Labrenzia alexandrii* productora del compuesto antitumoral labrenzina utilizando DTE

3.1.1 Descripción de la muestra seleccionada para la prueba de concepto

Una vez diseñado el protocolo de DTE se realizó el aislamiento de la muestra ANN-17-096L siguiendo dicho procedimiento. La muestra seleccionada ha sido procesada con anterioridad para la obtención de bacterias no filamentosas productoras de compuestos antitumorales siguiendo un protocolo estándar de aislamiento en medio sólido. Fruto de dicho aislamiento, se obtuvo una cepa productora del compuesto antitumoral labrenzina, primer compuesto de la familia de las pederinas aislado de una bacteria de vida libre y descubierto por vez primera recientemente (Schleissner *et al.*, 2017). Dada la singularidad del compuesto, se optó por esta muestra para intentar replicar su aislamiento con el nuevo protocolo. Además, el tratarse de una esponja marina (orden *Haplosclerida*) suponía también una ventaja, ya que los poríferos y sus microorganismos asociados constituyen una de las mayores fuentes de metabolitos secundarios de origen marino (Brinkmann, Marker and Kurtböke, 2017).

3.1.2 Aislamiento en medio sólido a partir de la muestra ANN-17-096L

Para el aislamiento estándar en medio sólido se seleccionaron cinco medios específicos de bacterias. Para ampliar la diversidad de los organismos aislados, se optó tanto por medios generalistas como por otros más selectivos con modificaciones (e.g. adición de antibióticos). Un total de 35 colonias fueron conservadas y 13 cepas distintas identificadas según su perfil de de-replicación genómica (**Tabla 3.1**) y fermentadas en los medios de inducción descritos en la **Tabla 2.4** (Material y Métodos) obteniéndose un sólo organismo activo, una *Labrenzia alexandrii* productora de labrenzina (ANN-17-096-035). Como se refleja en la **Tabla 3.1**, la cepa activa es fruto del aislamiento en medio Marine Broth suplementado con el antibiótico trimetoprim.

Medio de aislamiento	Placas Petri	Aisladas	Conservadas	DR Diferentes	Activas
Amonium Mineral Salt (AMS)	2	2	2		
Benedict agar diluido (BEN 1/2)	2	0	0		
Marine Agar	3	31	20	9	
Marine Agar + Estreptomicina	1	4	1		
Marine Agar + Trimetoprim	1	12	12	4	1
Total:	9	49	35	0	1

Tabla 3.1: Resultados de aislamiento en medio sólido de la muestra ANN-17-096L donde se representan el número de colonias aisladas de cada uno de los medios (Total aisladas) así como el número de cepas tras la obtención de la huella genómica (DR diferentes) y las cepas activas obtenidas de la muestra.

3.1.3 Aislamiento por DTE

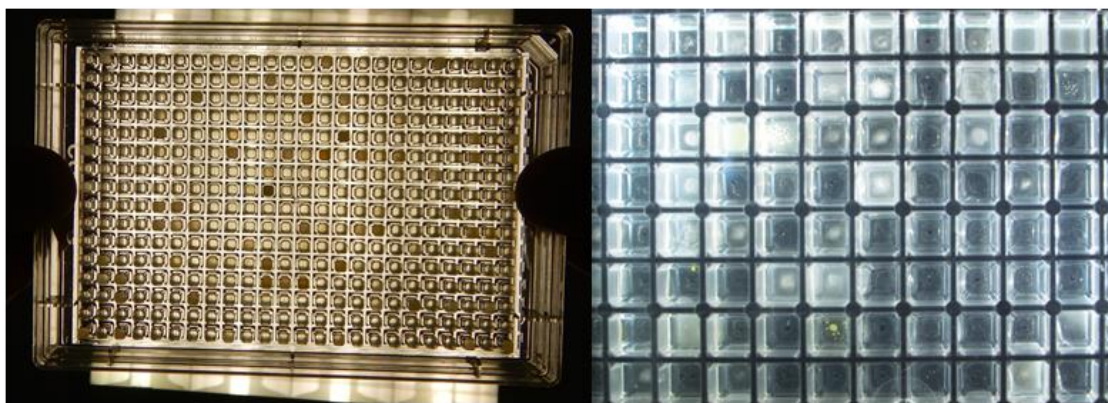


Figura 3.1: Vista inferior de una placa microtiter de 384 pocillos tras cuatro días de incubación donde se aprecian las diferentes tonalidades y grados de turbidez de los pocillos con crecimiento (izquierda) y vista parcial superior a la lupa (8X) donde se observan las distintas morfologías presentes.

Datos de aislamiento

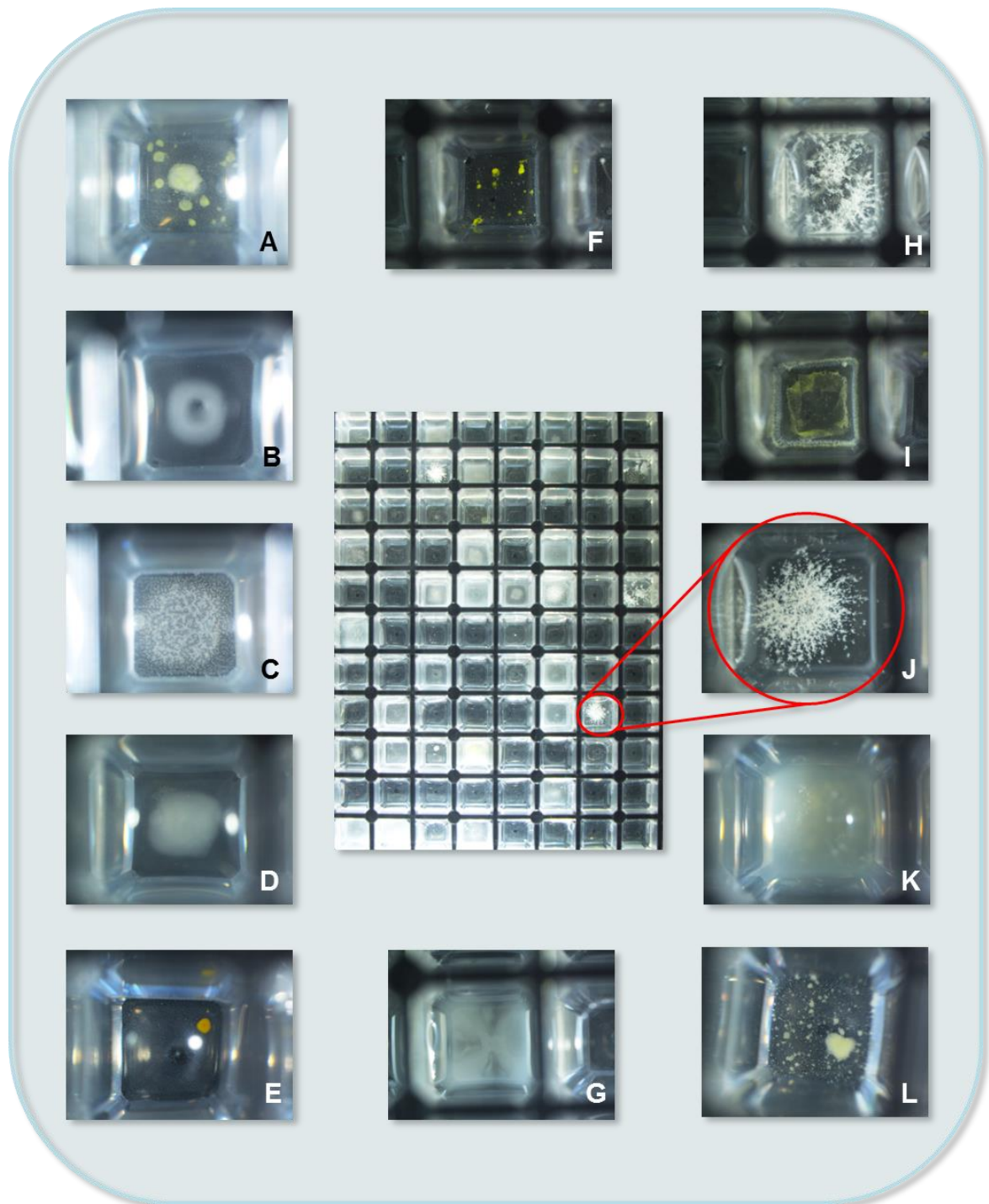


Figura 3.2: Diversas morfologías observadas (8X) en una sola placa de aislamiento.

Para el aislamiento se inocularon 50 placas microtiter de 384 pocillos con la dilución calculada y fueron incubadas durante 4 días buscando la máxima viabilidad de los cultivos obtenidos ya que en este caso el objetivo de aislamiento era conocido y *L. alexandrii* posee un tiempo de generación muy bajo, alcanzando densidades ópticas medibles en menos de 48 horas.

Tras este tiempo de incubación, 2242 pocillos presentaron crecimiento, siendo recuperados y fermentados para la obtención de un volumen suficiente tanto para la inoculación en los medios de inducción como para su criopreservación hasta contar con los resultados de actividad (**Figura 3.1**). Todos los aislados fueron fermentados en medios de inducción y sometidos a ensayo de actividad antitumoral.

Al reducir el tiempo de incubación para aislamiento, el número observado de pocillos crecidos por placa fue inferior a los 80 calculados que previsiblemente se obtendrían tras 9 días de incubación. Durante este tiempo, se realizó un seguimiento de los cultivos y mediante su observación bajo la lupa se apreció un elevado número de morfologías distintas. En la **Figura 3.2** se pueden observar en detalle algunas de estas morfologías bajo la lupa (8X).

Resultados de actividad antitumoral

Como resultado de los ensayos de actividad antitumoral se obtuvieron un total de 28 cultivos activos, repartidos en 17 de las 50 placas de aislamiento y con una frecuencia de cepas activas por placa de entre 1 y 3 (**Tabla 3.2**). Los cultivos activos fueron sembrados en medio sólido a partir de la fracción del inóculo criopreservada con glicerol para valorar la pureza de los cultivos.

Todos los aislados crecieron correctamente obteniéndose cultivos puros de 25 de ellos. Los tres cultivos mixtos restantes fueron descartados al mostrar morfologías no acordes con la de *L. alexandrii*. Al extrapolar el porcentaje de cultivos mixtos obtenido en las fracciones activas al total del ensayo, obtuvimos un porcentaje con un valor de cultivos mixtos del 11%, mayor al valor teórico esperado (5%). Cabe resaltar que los tres cultivos mixtos presentaron la misma mezcla de morfologías y que estas a su vez no parecían observarse por separado entre el resto de cultivos activos, por lo que podría en este caso deberse a dos organismos que crecen en consorcio más que a una infravaloración de los cultivos mixtos (**Figura 3.3**).

N° placa de aislamiento	Colon	Pulmón	Mama	Páncreas
	HT29	A549	MDA-MB-231	PSN1
2	-17.1	-51.6	-81	-74.6
3	-19.4	-62.4	-75.1	-67.4
3	24.8	10.8	-26.2	-1.9
6	-18.2	-22.9	-51.1	-69.2
7	-11.5	-38.4	-46.8	-65.6
7	-22	-65.3	-77.3	-71.8
8	-27.7	-79.6	-87.6	-73.6
9	-15.3	-66.4	-64.4	-65.5
9	-23.2	-59.3	-77.3	-71.8
9	-26.6	-55.7	-71.3	-68.2
11	-17.5	-58.1	-64.4	-70.9
12	-23.2	-56.9	-74.7	-69.1
14	-18.4	-80.1	-84.8	-70
14	-19.5	-69.3	-71.1	-50.2
14	-21.8	-53.7	-79.7	-68.2
16	-21.8	-51.3	-81.4	-69.1
16	-28.5	-56.1	-71.9	-67.3
16	-28.5	-40.5	-54	-58.3
19	-28.5	-65.3	-83.3	-70.8
19	-19.5	-49.7	-67.9	-62.7
24	-2.8	-67.6	-70.6	-59.4
28	-17.4	-50	-78.2	-68.7
34	-23.5	-40.4	-71.6	-50.2
39	-14.3	-53.7	-76.3	-56.3
39	-8.6	-19	-72.9	-56.3
46	-10.9	-24.2	-54.1	-57.9
50	-5.8	-31.2	-66.5	-62
50	-17.1	-30	-61.3	-62.9

Tabla 3.2: Cultivos con actividad antitumoral identificados tras los ensayos con los valores porcentuales de inhibición para las cuatro líneas tumorales respecto a controles no tratados y la placa de aislamiento de origen de cada uno de ellos.

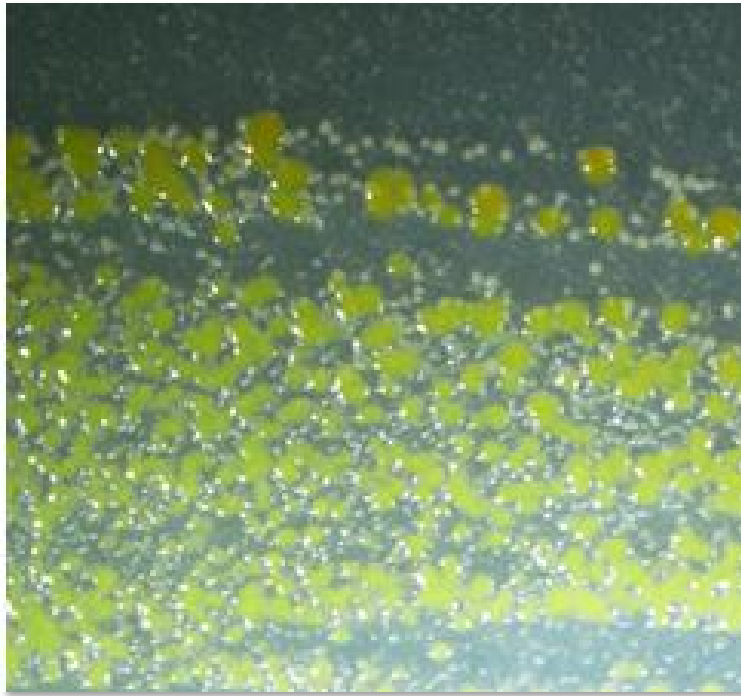


Figura 3.3: Imagen parcial (8X) de una placa Petri con uno de los cultivos mixtos, donde se aprecia la presencia de dos morfologías (blanca y amarilla) claramente diferenciadas.

De-replicación molecular

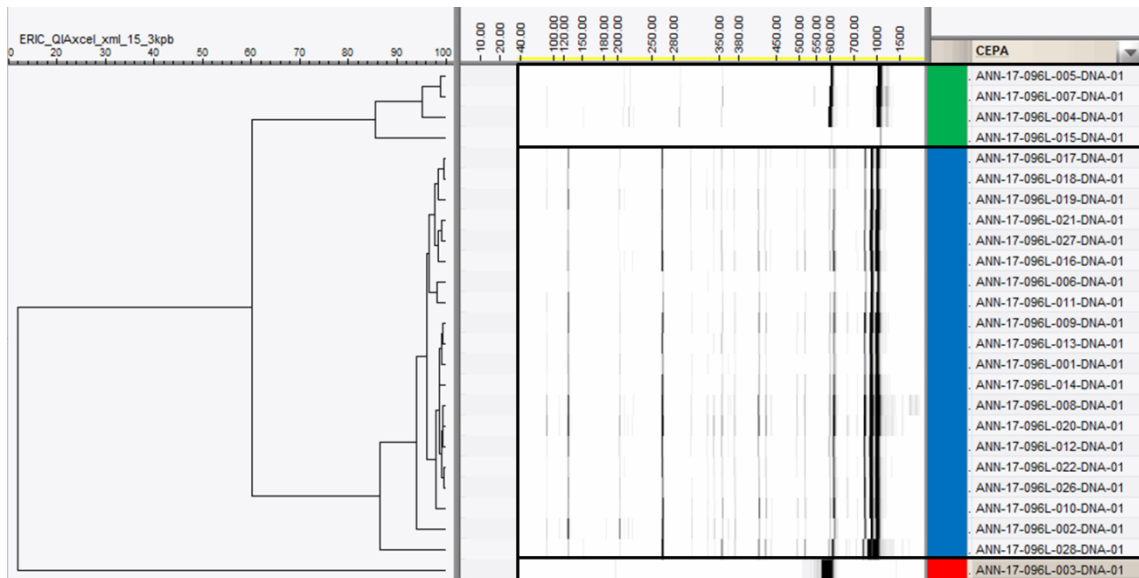


Figura 3.4: Cladograma con la huella genómica de los 25 cultivos puros obtenidos y su agrupación en función de su patrón de bandas.

El ADN genómico de todos los cultivos puros fue extraído con el fin de realizar la amplificación de su huella genómica. Gracias al patrón de bandas obtenido fue posible agrupar los 25 organismos en tres grupos (1, 2 y 3) formados por 4, 20 y 1 representantes, respectivamente, con un valor de similitud alto (> 96%), identificando de esta forma 3 cepas activas distintas en la muestra (**Figura 3.4**). En la **Figura 3.4**, se observa cómo los representantes del grupo 2 (azul) se diferencian claramente de los del grupo 1 (verde) aunque manteniendo cierta similitud. Resulta llamativo el caso de la cepa ANN-17-096L-003, único representante del grupo 3 y con un patrón de bandas totalmente distinto al de los demás aislados.

Con fines comparativos, se incluyeron en el análisis de agrupamiento de huella genómica otras cepas de la colección. Entre estas cepas se encuentra también la primera cepa de la que se obtuvo el compuesto labrenzina (KEN-14-087 o PHM005), otras cepas productoras del mismo compuesto (MAD, NOS, etc), así como la cepa ANN-17-096-035, aislada de la muestra procesada en esta prueba de concepto mediante el protocolo estándar en medio sólido.

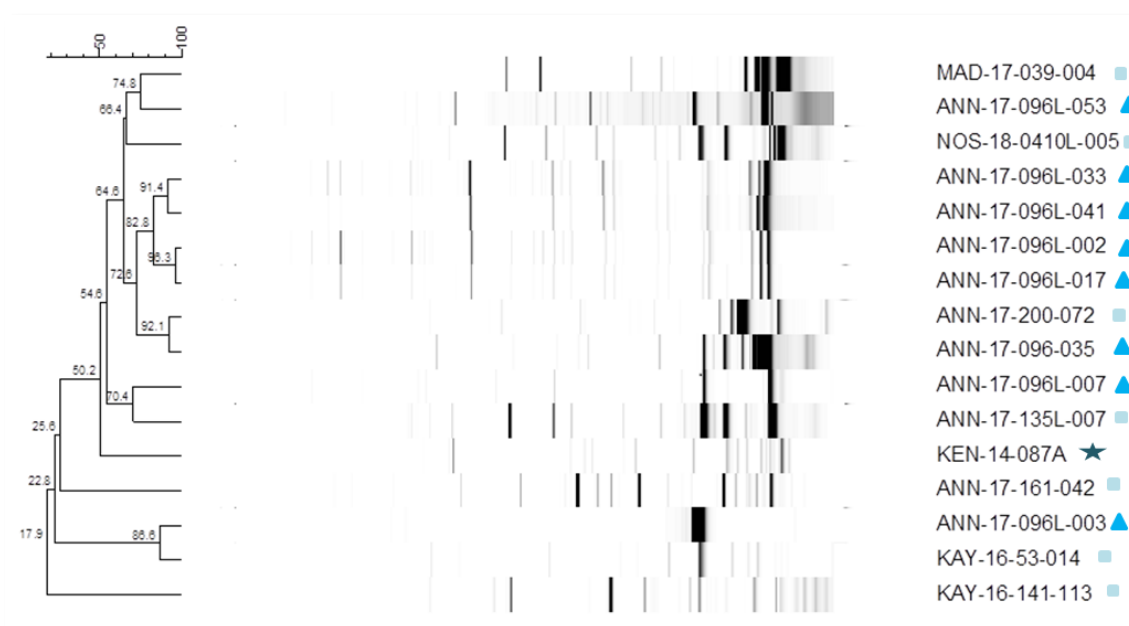


Figura 3.5: Cladograma conjunto de la huella genómica de distintas cepas de *L. alexandrii* activas provenientes de la muestra objeto de estudio (▲), otras muestras (■) y la cepa original productora del compuesto labrenzina (★).

En el cladograma obtenido (**Figura 3.5**), se puede observar cómo todas las cepas provenientes del aislamiento por dilución a extinción de la muestra ANN-17-096L están estrechamente relacionadas entre sí, a excepción de la ANN-17-096L-003. Así mismo, resulta de interés el hecho de que la única cepa obtenida mediante aislamiento en medio sólido de la muestra (ANN-17-096-035) presenta un patrón de bandas más semejante a cepas aisladas a partir de otras muestras que a las obtenidas mediante aislamiento DTE de su misma muestra, mostrando con ellas un valor de similitud inferior al 72%.

De-replicación química

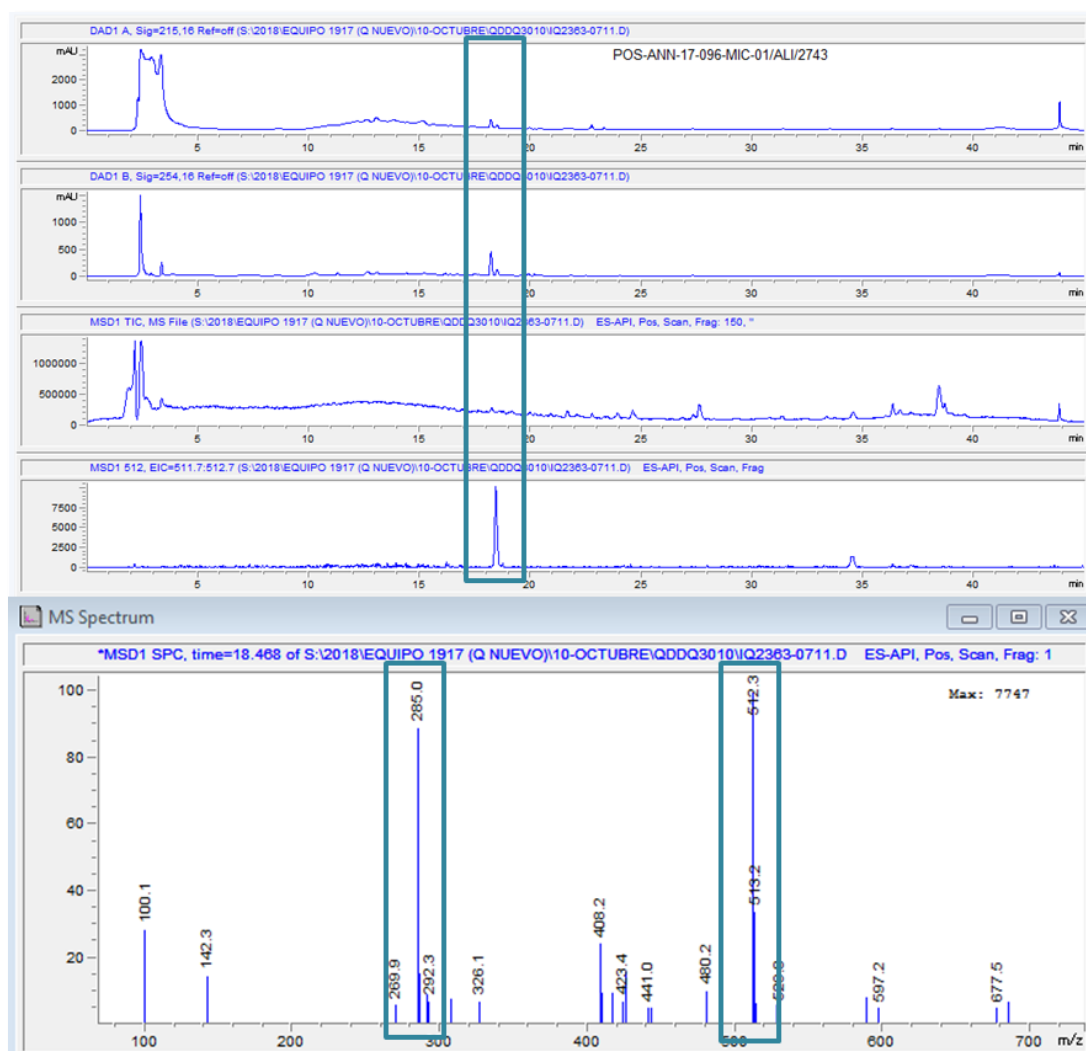


Figura 3.6: Perfiles cromatográficos y espectro de masas de la cepa ANN-17-096L-007 donde se resalta la presencia de labrenzina tanto en el perfil de HPLC como en el espectro de masas.

Se llevó a cabo la de-replicación química de un representante de cada grupo o unidad genética identificada anteriormente, concretamente de las cepas ANN-17-096L-002, ANN-17-096L-003 y ANN-17-096L-007. Una fracción del mismo extracto empleado en el ensayo de actividad antitumoral fue sometida a un test de HPLC y cromatografía de masas para detectar la presencia de compuestos conocidos. Los extractos pertenecientes a las cepas ANN-17-096L-002 (grupo 2) y ANN-17-096L-007 (grupo 1) presentaron unos perfiles de HPLC muy semejantes, donde se observó la presencia del pico característico del compuesto labrenzina, confirmándose posteriormente con el espectro de masas, donde se observó el patrón de fragmentación característico del compuesto (**Figura 3.6**). La cepa ANN-17-096L-003 mostró tanto un perfil cromatográfico como un espectro de masas muy diferente al de las dos anteriores, no pudiendo confirmarse la presencia de labrenzina en la muestra. Esta cepa siguió en proceso hasta comprobar que la actividad se debía a la presencia de sesbanimidias en el caldo de fermentación.

Taxonomía molecular

Las cepas ANN-17-096L-002, ANN-17-096L-003 y ANN-17-096L-007, como representantes de cada uno de los tres grupos diferenciados en base a su huella genómica, fueron analizadas taxonómicamente a través de la exploración genómica de su secuencia ribosomal. Además, se incluyeron en los análisis otras cepas de la colección previamente caracterizadas. Dos de las cepas fueron identificadas como *L. alexandrii* mientras que la cepa ANN-17-096L-003 pertenece al mismo género, pero a distinta especie, más próxima a *L. aggregata*.

El análisis filogenético llevado a cabo (**Figura 3.7**), separa claramente las distintas especies del género, mostrando una topología similar en todos los métodos probados. Tanto la estimación de máxima similitud (MS) como la de gran similitud (GS) describen una relación de especies hermanas entre las cepas aisladas y la cepa tipo de *L. alexandrii* (AJ582083) en un clado y entre la cepa ANN-17-096L-003 y *L. aggregata* (AAUW01000023) en otro.

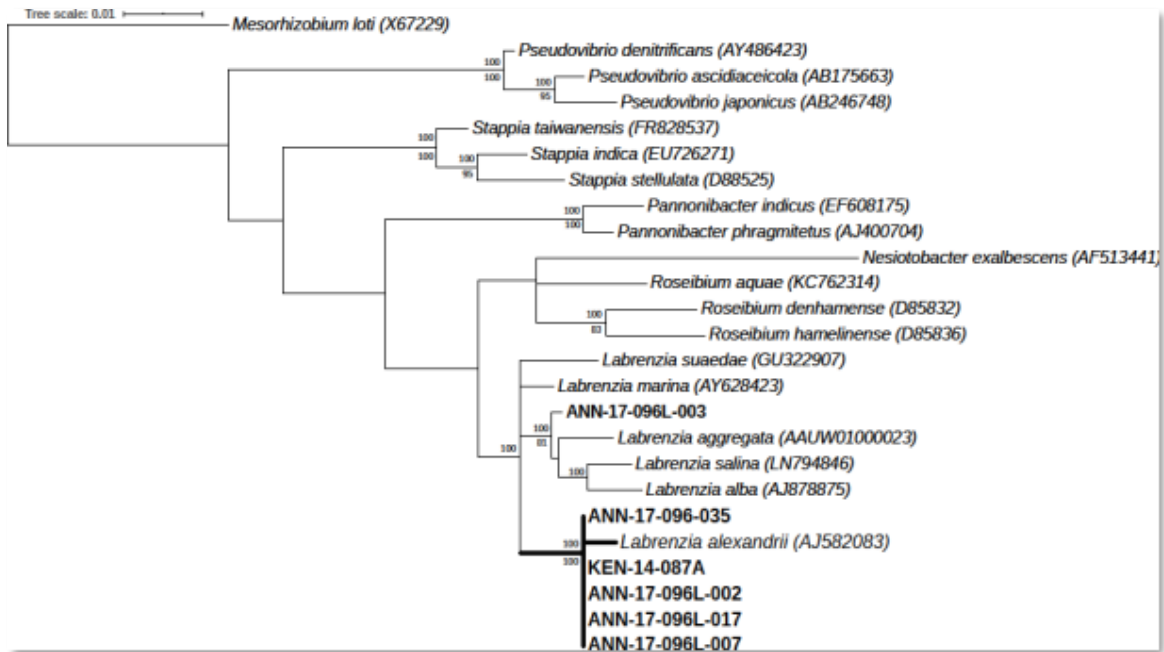


Figura 3.7: Árbol taxonómico donde distintas *L. alexandrii* aisladas mediante DTE o medio sólido, se agrupan según su secuencia 16S rRNA con otros representantes de distintas especies del género o de otros géneros filogenéticamente relacionados.

3.1.4 Curvas de producción del compuesto labrenzina

El análisis taxonómico de las cepas aisladas confirmó la presencia de dos poblaciones de *L. alexandrii* genéticamente diferenciadas entre ellas y diferentes a su vez de la cepa aislada previamente en medio sólido. Como ensayos complementarios a esta prueba de concepto, se llevó a cabo la fermentación de distintas cepas de *L. alexandrii* para evaluar si las diferencias a nivel génico podrían verse reflejadas en su capacidad biosintética y concretamente en la presencia del antitumoral labrenzina en el caldo de cultivo.

Cuantificación de la producción de labrenzina en las distintas cepas aisladas de la muestra ANN-17-096L

En el ensayo de cuantificación, además de las cepas aisladas a partir de la muestra objeto de estudio, se incluyó a modo de referencia la cepa de la que fue aislado el compuesto por vez primera (KEN-14-087A) y otros dos productores provenientes de

muestras distintas (ANN-17-135L-007 y NOS-18-0410L-005). Para la fermentación se emplearon las condiciones óptimas fijadas previamente para la cepa KEN-14-087A y la presencia del compuesto fue cuantificada cada 24 horas mediante HPLC hasta conformar una curva de producción entre las 96 y las 168 horas de incubación. En la gráfica de la **Figura 3.8**, se pueden ver las diferencias en la cantidad de compuesto presente en el caldo de cultivo existentes entre las distintas cepas. Los valores para las tres cepas obtenidas de la muestra ANN-17-096L mostraron un comportamiento bastante similar entre ellas y a su vez a la productora original KEN-14-087A, con una producción máxima a 168 horas de entre 5 y 6 $\mu\text{g/mL}$ en las condiciones del ensayo. Sin embargo, en las cepas ANN-17-135L-007 y NOS-18-0410L-005 la cantidad de compuesto se mantuvo por debajo de los 2.5 $\mu\text{g/mL}$.

A pesar de la similitud genética observada entre las cepas provenientes de la muestra ANN-17-096L, se detectó una mayor cantidad de labrenzina en el caldo de fermentación de cepa ANN-17-096L-007, alcanzando a hora final una concentración de compuesto un 20% superior a las otras dos (**Figura 3.8**), como confirmación, se realizó una segunda fermentación en paralelo para confirmar este comportamiento (**Figura 3.9**), alargando la curva de cuantificación (hasta las 216 horas).

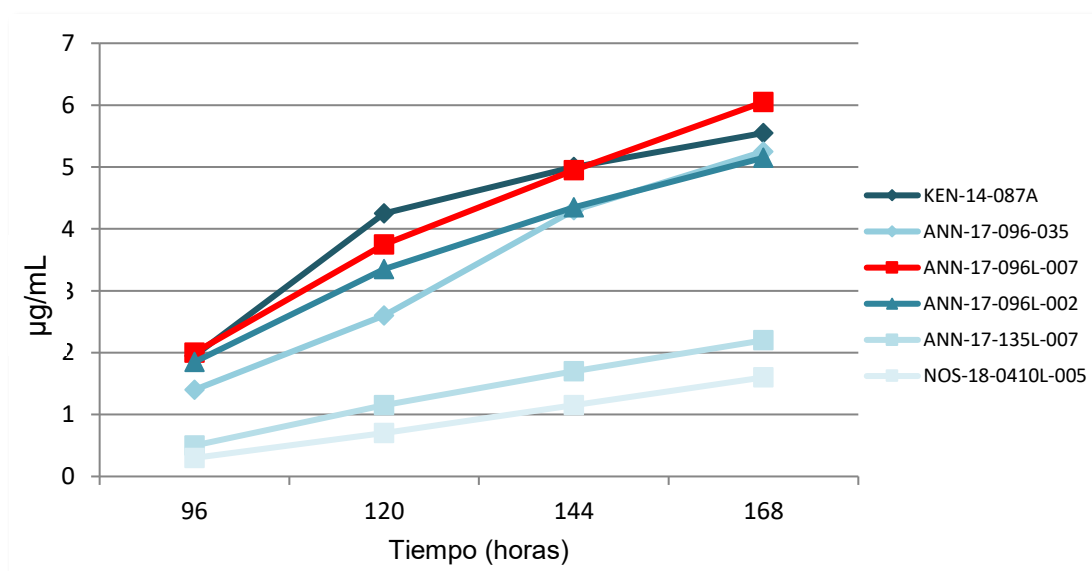


Figura 3.8: Representación gráfica de la presencia del antitumoral labrenzina en el caldo de fermentación de distintas cepas de *L. alexandrii* en función del tiempo de fermentación.

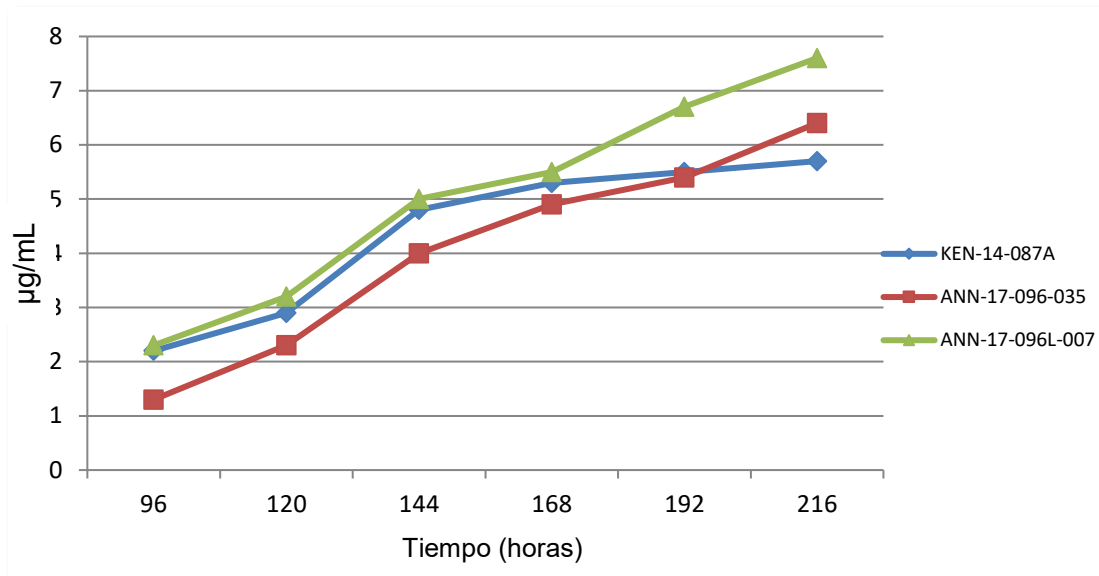


Figura 3.9: Comparativa de la presencia de labrenzina en los caldos de fermentación de las cepas ANN-17-096L-007 y ANN-17-096-035 con la cepa productora original KEN-14-087A como control y referencia.

Los datos de producción representados en la **Figura 3.9** muestran la confirmación de dicha tendencia, manteniéndose la acumulación de compuesto en el caldo de fermentación de la cepa ANN-17-096-035 alrededor de 1.2 µg/mL inferior a la de la cepa ANN-17-096L-007 que alcanza los 7.6 µg/mL a 216 horas.

TEMA 2: Evaluación de la plataforma de aislamiento, aplicabilidad industrial

4.1 Aislamientos en paralelo, sólido vs DTE

En este capítulo se evalúan los resultados obtenidos del aislamiento de siete muestras procesadas mediante los métodos de aislamiento DTE y medio sólido, con fines comparativos y valorar así la complementariedad de ambos métodos y la aplicabilidad industrial del método DTE propuesto. Para la comparativa, se evaluaron aspectos como el número de aislados activos obtenidos de géneros activos aislados y de familias de compuestos con actividad antitumoral detectadas. Las muestras seleccionadas para este aislamiento en paralelo incluían a los Phyla *Porifera*, *Bryozoa*, *Annelida* y *Chordata*, y sedimentos marinos (**Figura 4.1**), buscando de esta forma evaluar distintos tipos de muestra.

Código muestra	Phylum	Medios de aislamiento	
		DTE	Sólido
ANN-17-096L	Porifera	Marine Broth	AMS BEN 1/2 + ASW Marine Agar Marine Agar + Estreptomicina Marine Agar + Trimetoprim
NOS-18-0410L			
RAD-18-0657L	Bryozoa		
HEL-17-078L	Annelida		
ANN-17-135L	Chordata		
RAD-18-0206L	Sedimento		
HEL-17-056L			

Tabla 4.1. Muestras seleccionadas para su aislamiento en paralelo con los medios de cultivo empleados.

4.1.1 Obtención de cepas con actividad antitumoral

Mediante el aislamiento por dilución a extinción, se obtuvo un elevado promedio de cepas activas por muestra de 7.7, respecto al obtenido de sólido de 2.3, que se corresponde además con una mayor diversidad química (el promedio de compuestos detectados fue de 2.7 para DTE y 1.6 para sólido, respectivamente, **Tabla 4.2**).

Código muestra	Cepas con actividad antitumoral		Compuestos detectados	
	Sólido	DTE	Sólido	DTE
ANN-17-096L	1	4	1	1
NOS-18-0410L	4	4	2	4
RAD-18-0657L	3	14	2	2
HEL-17-078L	2	7	2	4
ANN-17-135L	1	9	1	3
RAD-18-0206L	2	12	1	3
HEL-17-056L	3	4	2	2

Tabla 4.2: Comparativa del número de cepas con actividad antitumoral aisladas de cada muestra y con cada protocolo de aislamiento.

4.1.2 Biodiversidad y método de aislamiento

Se realizó la asignación taxonómica de aquellas cepas identificadas previamente mediante su huella genética. El análisis comparativo del 16S rRNA obtenido indicó la presencia de 12 géneros distintos, siendo solamente 5 de ellos comunes a ambos métodos de aislamiento (**Tabla 4.3**).

	Géneros activos aislados		Nº de especies		Nº de muestras	
	Sólido	DTE	Sólido	DTE	Sólido	DTE
<i>Aquimarina</i>	X	X	1	1	1	1
<i>Bacillus</i>	X	X	-	-	5	5
<i>Chryseobacterium</i>	X	X	1	1	1	1
<i>Enterovibrio</i>	X	X	1	2	1	2
<i>Labrenzia</i>	X	X	1	2	1	3
<i>Microbulbifer</i>		X	0	2	0	3
<i>Pseudovibrio</i>		X	0	1	0	2
<i>Ruegeria</i>		X	0	1	0	2
<i>Serratia</i>		X	0	1	0	1
<i>Stappia</i>	X		1	0	1	0
<i>Tropicibacter</i>	X		1	0	1	0
<i>Vibrio</i>	X		1	0	1	0

Tabla 4.3: Distribución de los distintos géneros aislados, así como el número de especies de cada uno de ellos y su abundancia en las distintas muestras procesadas.

De los siete restantes, los géneros *Microbulbifer*, *Pseudovibrio*, *Ruegeria*, y *Serratia*, fueron aislados exclusivamente mediante DTE mientras que los géneros *Stappia*, *Tropicibacter* y *Vibrio* solamente fueron aislados a partir de medio sólido. Cabe resaltar que solamente por DTE se aislaron representantes de algunos géneros en más de una muestra, con la excepción del género *Bacillus* (Tabla 4.3). Así mismo, se identificaron mediante DTE dos especies distintas de tres géneros (*Labrenzia*, *Microbulbifer* y *Enterovibrio*) mientras que el aislamiento en medio sólido no obtuvo en ningún caso más de una especie por género (Tabla 4.3).

4.1.3 Compuestos detectados

Se evaluó a continuación el rendimiento de cada método en base a los compuestos químicos obtenidos con independencia del género asignado al microorganismo productor, teniendo en cuenta que algunas familias de compuestos con actividad antitumoral, como pueden ser prodigiosinas o lichenisinas, son sintetizadas por distintos géneros bacterianos, con lo cual la diversidad biológica no siempre se corresponde con la diversidad química.

	N° de muestras donde se detecta cada familia de compuestos	
	Sólido	DTE
Glicolípidos cíclicos	1	1
Lichenisinas	3	4
Labrenzina	1	3
Prodigosinas	0	2
Serratamolides	0	1
Sesbanimidas	1	1
Péptidos lineales	1	1
Lipopéptidos y glucosaminas	1	0

Tabla 4.4: Tabla con las distintas familias de compuestos citotóxicos obtenidos y su distribución en las muestras y en función del tipo de aislamiento.

En la **Tabla 4.4**, se puede ver la distribución de las familias de compuestos con actividad antitumoral detectadas en las cepas trabajadas. De las 8 familias de compuestos químicos, 5 fueron estaban presentes en ambos protocolos de aislamiento mientras que prodigosinas y serratamolides solamente fueron detectadas en las fermentaciones provenientes de aislamiento DTE (promedio de compuestos de 1.6) y lipopéptidos y glucosaminas fueron de-replicados únicamente en cepas procedentes de aislamiento en medio sólido (promedio de compuestos de 1.0).

4.2 Resultados globales de aislamiento

4.2.1 Selección de muestras

Tras la prueba de concepto con la muestra ANN-17-096L y los aislamientos en paralelo descritos anteriormente, se seleccionaron otras 63 muestras marinas pertenecientes a los phyla más representativos como origen de compuestos antitumorales o de microorganismos productores de los mismos (Khalifa *et al.*, 2019), con especial presencia de las esponjas marinas, principal fuente de productos naturales

marinos o de microorganismos productores (Souza *et al.*, 2016). Además, se incluyeron muestras de sedimentos por constituir también un importante reservorio de biodiversidad (Baker, Appler and Gong, 2020) (**Figura 4.5**).

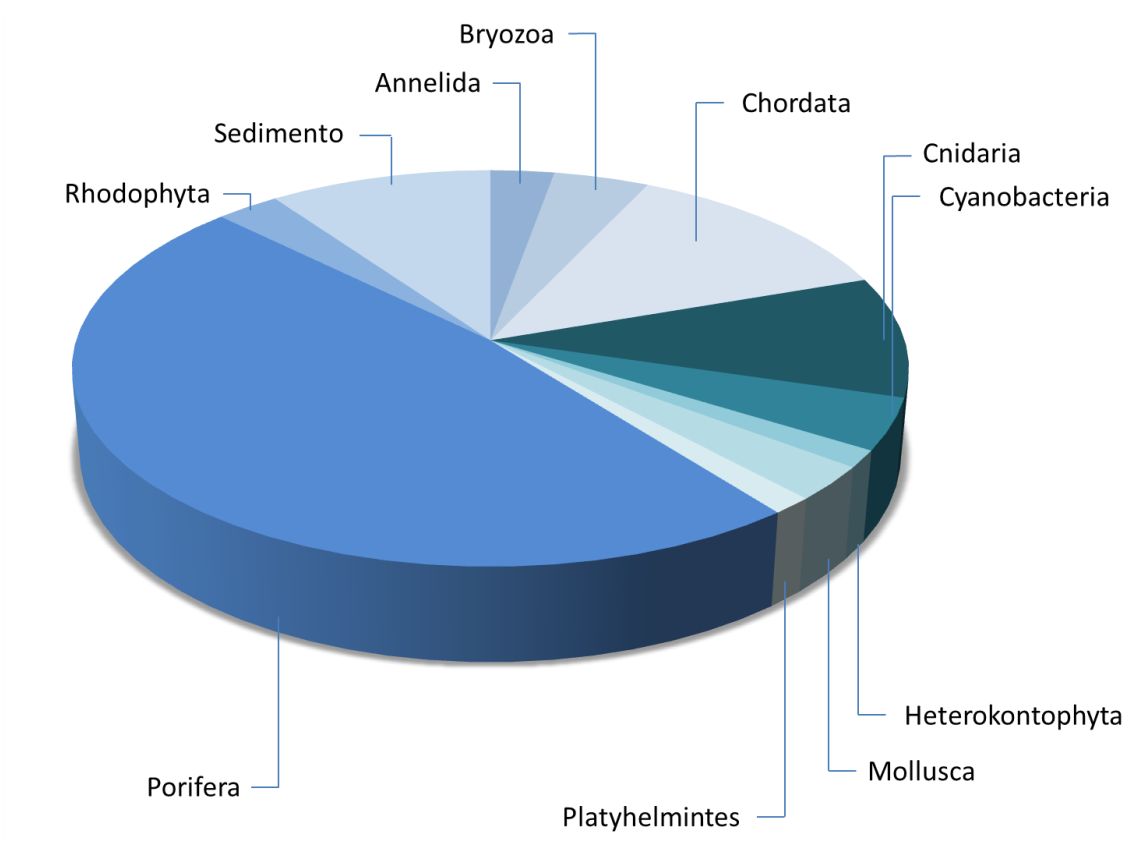


Figura 4.5: Distribución por phylum de las muestras aisladas: Porifera (34), Platyhelminthes (1), Mollusca (2), Heterokontophyta (1), Cyanobacteria (3), Cnidaria (7), Chordata (9), Bryozoa (3), Annelida (2), sedimento (7), Rhodophyta (2).

La finalidad principal fue la evaluación de la utilidad del aislamiento DTE en el entorno real de investigación para realizar aislamientos masivos de bacterias productoras de compuestos con actividad antitumoral a partir de las muestras marinas. Para la experimentación, se seleccionó un grupo representativo que reflejase de la forma más fiel posible la diversidad de muestras objeto de estudio en PharmaMar. Esta variedad es enorme y la variabilidad que conlleva podría afectar al rendimiento del proceso, desde el homogeneizado de las muestras a los cultivos de inducción pasando por el cálculo de la dilución.

Para los aislamientos, se siguieron los protocolos desarrollados y descritos en el apartado de Material y métodos. Sin embargo, los pasos de de-replicación química, de-replicación molecular y taxonomía molecular, se realizaron a un número mayor de muestras del que teóricamente sería necesario con el objetivo de recabar más información y llegar a conclusiones más fiables.

4.2.2 Densidad de población bacteriana aislada

Teniendo siempre presentes las limitaciones que supone el aislamiento en condiciones de laboratorio (Pulschen *et al.*, 2017), el número de UFC/ μ L es un dato de interés que a pesar de no aportar información a nivel de biodiversidad, sí lo hace en términos de densidad de población para los grupos bacterianos capaces de crecer bajo las condiciones de cultivo ensayadas, independientemente de la mayor o menor abundancia relativa de cada uno de ellos. Para todas las muestras analizadas tanto la siembra previa en medio sólido para el cálculo de dilución como la propia siembra en medio líquido, se han realizado en Marine Broth (Difco[®]2216), un medio de cultivo para aislamientos generalistas ampliamente empleado para el cultivo de bacterias copiotrofas no filamentosas (Sipkema *et al.*, 2011; Rekadwad and Khobragade, 2017).

Calcular el número de UFC es el primer objetivo a llevar a cabo durante el proceso de desarrollo de esta plataforma de aislamiento. En la **Figura 4.6** se representa cómo varía la densidad de UFC/ μ L obtenida mediante aislamiento DTE respecto a la observada en la siembra previa en medio sólido poniendo de relieve que en un gran número de muestras (76%), el número de UFC/ μ L obtenidas fue mayor en la siembra por DTE en medio líquido. Este incremento en la viabilidad observada, confirma el comportamiento de la muestra ANN-17-096L con la prueba de concepto. Sin embargo, el incremento promedio obtenido de las 71 muestras trabajadas fue del 43.4%, muy alejado del 100% observado en los ensayos previos sobre la muestra ANN-17-096L. A pesar de ser menor de lo esperado, es lo suficientemente elevado para justificar la aplicación del factor de conversión de medio sólido a líquido a la hora de realizar el cálculo de dilución.

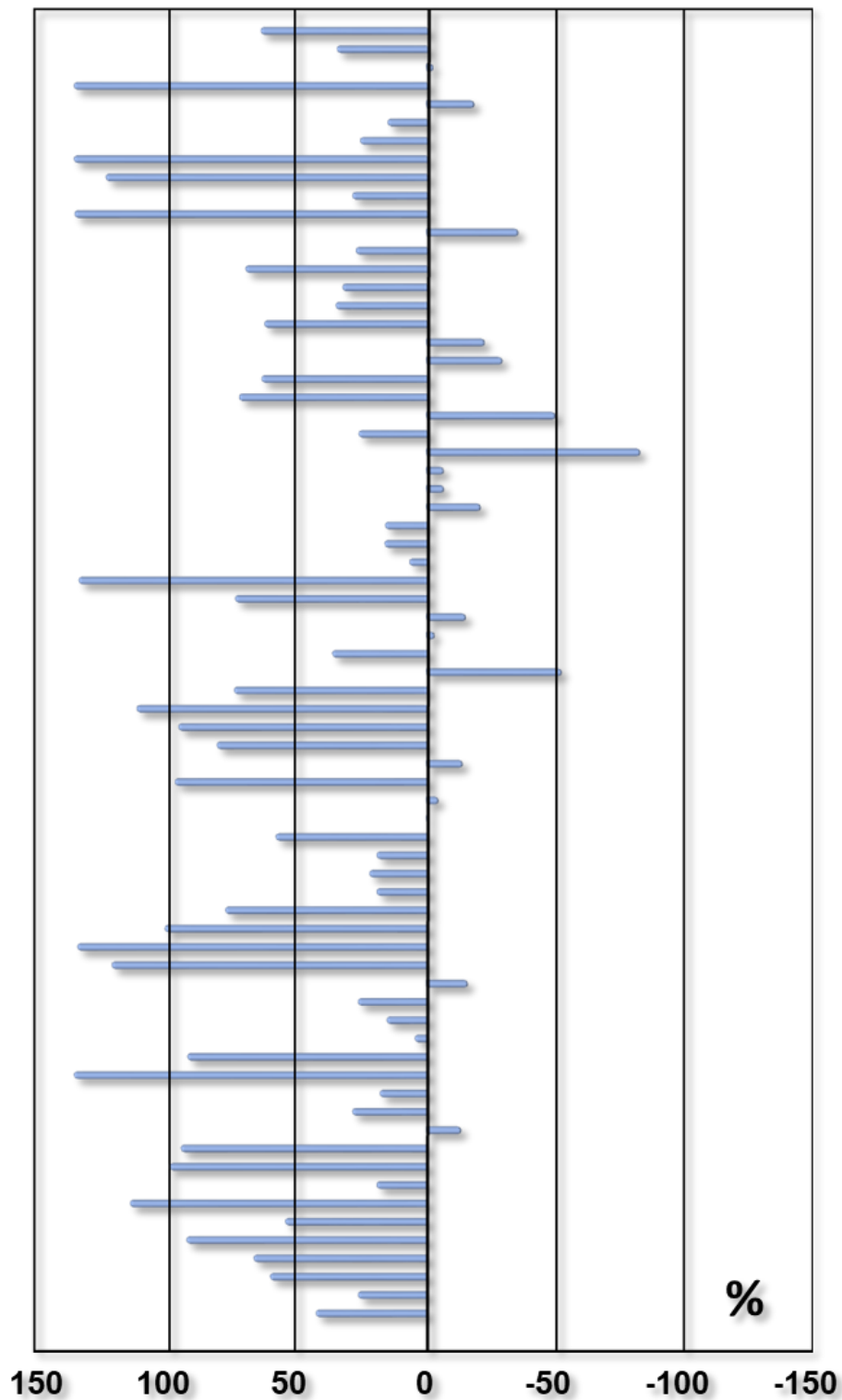


Figura 4.6: Representación de la variabilidad (%) en el número de UFC/ μ L obtenidas de cada muestra, donde los valores positivos (izquierda) suponen un incremento en el número de UFC/ μ L obtenidas en medio líquido respecto a las observadas en medio sólido y los negativos (derecha), una disminución.

4.2.3 Evaluación del sistema de cálculo de dilución y su aplicación a otras muestras marinas

El cálculo de dilución se realiza mediante la extrapolación de los datos de crecimiento obtenidos en medio sólido con el mismo homogeneizado. La amplia biodiversidad presente en cada muestra, podría traducirse en una excesiva variabilidad de crecimiento en las placas de aislamiento DTE, impidiendo aplicar el mismo método de cálculo a todas las muestras. Con el fin de evaluar este parámetro, se ha utilizado como referencia el promedio del número de UFC por placa microtiter de aislamiento obtenido. De esta forma, siendo todas las muestras sometidas a un mismo cálculo destinado a obtener 80 UFC por placa, este valor mostrará la variabilidad que la muestra aporta al cálculo de UFC/ μ L esperado en medio líquido.

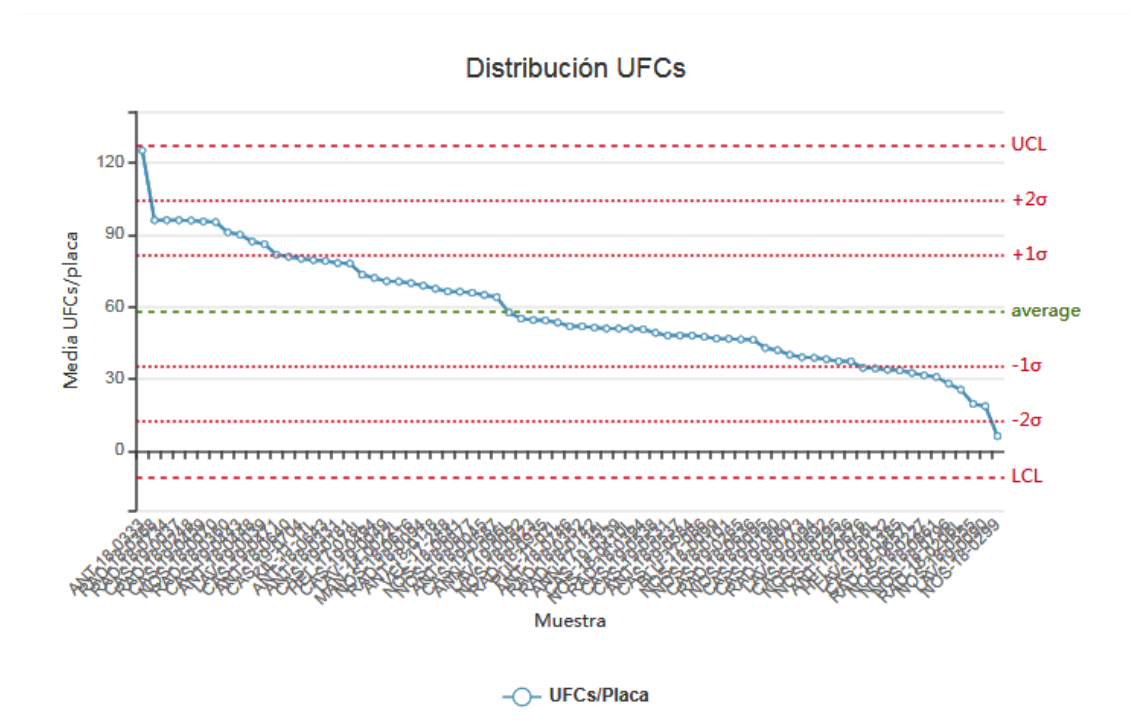


Figura 4.7: Representación de los valores de UFC/placa de aislamiento obtenidos para las 71 muestras procesadas. La media (verde), los límites de control superiores e inferiores (UCL y LCL, respectivamente) y la desviación estándar a cuatro niveles (σ) quedan también señalados en la gráfica.

El valor promedio para la muestra ANN-17-096L, la cual fue empleada como referencia para definir los cálculos de dilución, fue de 57.64 UFC/placa en vez de los 80

calculados, esto se debe a que, en el momento de desarrollar el protocolo de aislamiento, se contemplaban tiempos de incubación de 10 días. Tal como se describe en el apartado de Material y métodos, para mejorar la viabilidad de los inóculos obtenidos, se optó por reducir el tiempo de fermentación a 6 días y evitar de esa forma la lisis de los cultivos más tempranos a costa de ver reducido el número de bacterias aisladas.

Es de resaltar que el valor de la muestra ANN-17-096L, se encuentra muy próximo al del promedio global, que es de 60 UFC/placa. Además, como se observa en la **figura 4.7**, los valores se distribuyen de manera uniforme entre los límites superior e inferior. Las distintas muestras parecen ajustarse al sistema de cálculo de una forma muy similar tal como se puede ver en el histograma de la **Figura 4.8** donde los datos se agrupan en torno a la media formando una distribución que se ajusta a una curva normal.

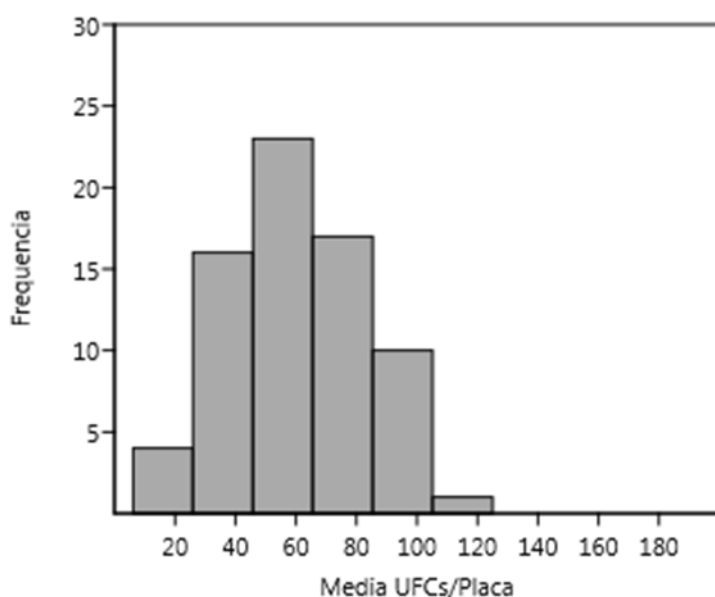


Figura 4.8: Histograma representando las frecuencias que presentan los distintos valores medios de UFC/placa obtenidos de las 71 muestras aisladas.

4.2.4 Abundancia y diversidad de bacterias no filamentosas con actividad antitumoral en muestras marinas

Abundancia de bacterias activas en función del phylum de origen

En la **figura 4.9** se representan, agrupados por phylum, el porcentaje de cultivos que muestran actividad citotóxica sobre el total (media de 1.1%), Destaca el caso del phylum Chordata, que presenta un porcentaje de bacterias activas superior al resto. Aunque esta información es independiente de la biodiversidad que presenten las bacterias activas, sí indica la profundidad de aislamiento necesaria para llegar a ellas.

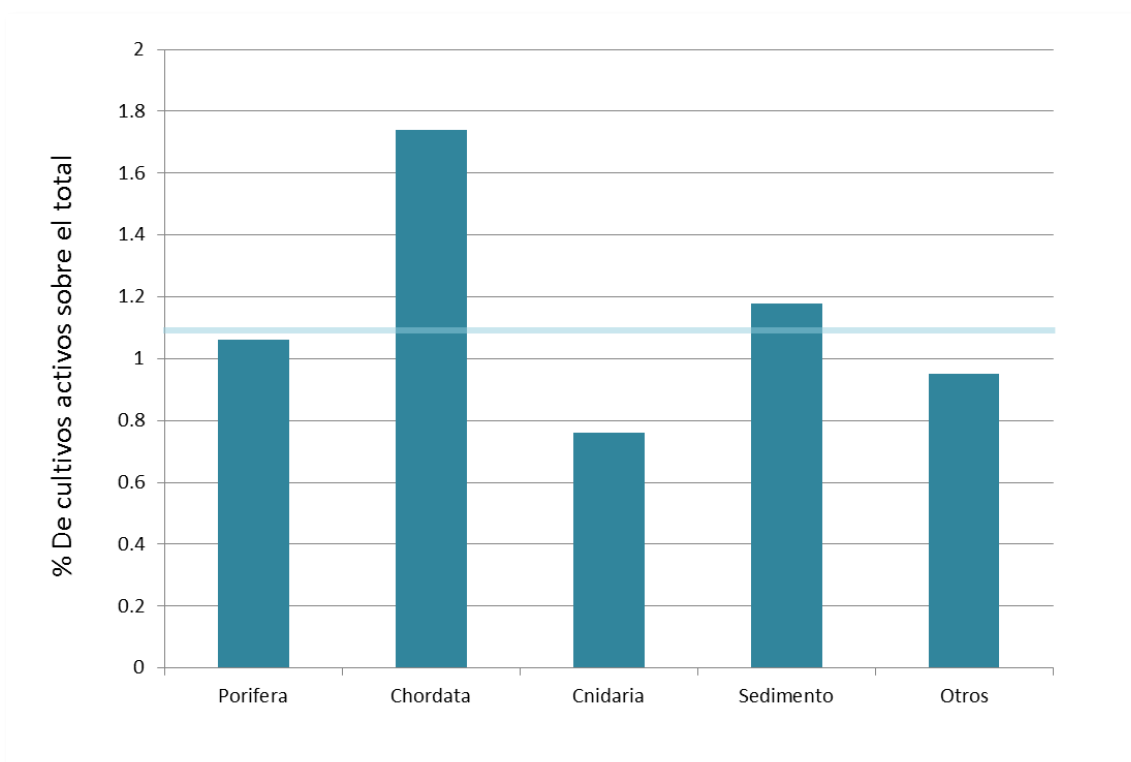


Figura 4.9: Representación del porcentaje de cultivos activos sobre el total de cultivos aislados agrupados por el tipo de muestra (según el phylum al que pertenezca).

Biodiversidad de muestras vs. diversidad de cepas aisladas

El grupo seleccionado constituye una representación de las muestras marinas generalmente disponibles para su aislamiento en PharmaMar. La nueva plataforma realiza el aislamiento y cribado del 100% de las cepas crecidas, lo que la hace especialmente indicada para estudios de diversidad, abundancia o prevalencia al eliminar sesgos como la discriminación morfológica. La **Figura 4.10** representa el índice de diversidad Shannon-Weaver (H , Shannon and Weaver, 1949) para las 71 muestras aisladas y los phyla a los que pertenecen. Cabe destacar tres tipos de muestra sobre los demás, al presentar los phyla Porifera y Cnidaria valores de biodiversidad específica (H') superiores a 2 mientras que las muestras provenientes de sedimentos obtienen un valor de H' muy próximo a 2. El resto de phyla muestra una biodiversidad específica baja o muy baja como es el caso de las muestras de Cyanobacteria.

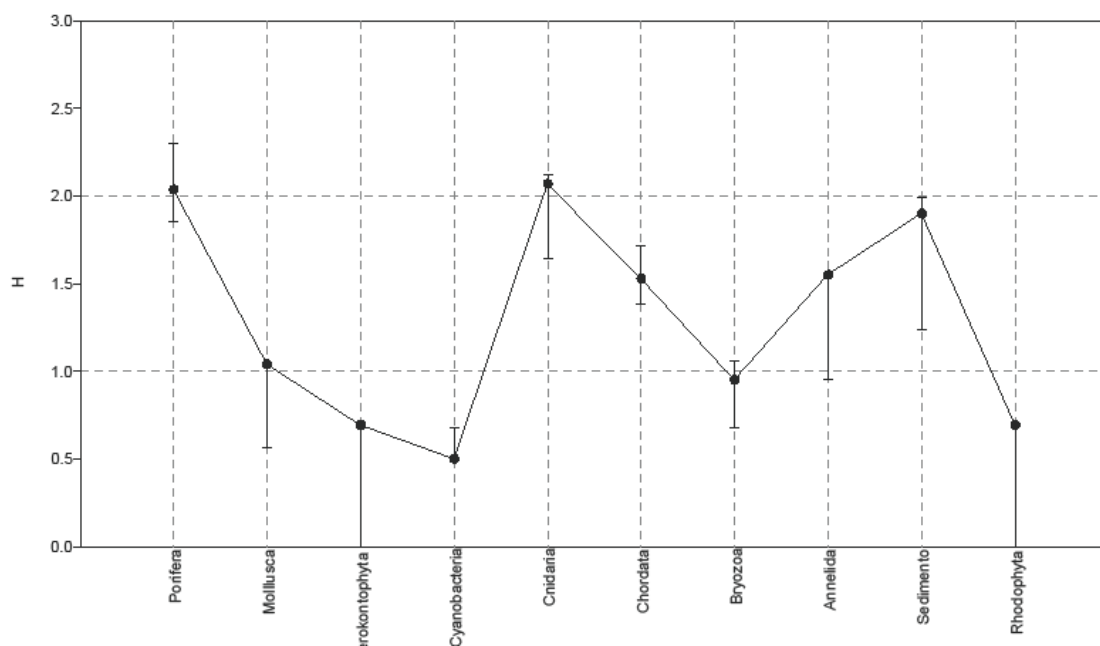


Figura 4.10: Índice de Sannon-Weaver para la biodiversidad específica en función del phylum.

Comparando estos datos de biodiversidad con los reflejados en la **Figura 4.9**, se puede ver que un mayor número de aislados activos, no va unido necesariamente a una

mayor biodiversidad, como es el caso del phylum Chordata, que presenta los porcentajes de aislados activos más alto de todos los grupos y sin embargo su biodiversidad relativa es baja.

4.2.5 Diversidad química

Existe un amplio abanico de familias de compuestos con actividad antitumoral que pueden ser sintetizadas por bacterias no filamentosas, la presencia en las muestras de algunas de ellas es mucho mayor que la de otras, siendo la de-replicación temprana de estos compuestos más abundantes crucial para evitar un innecesario consumo de recursos y tiempo en cepas sin interés. Tal como se describe en el apartado de Material y Métodos, los extractos obtenidos a partir de las fermentaciones de inducción que muestran actividad fueron sometidos a un test de HPLC para su de-replicación química previa a cualquier estudio taxonómico o incluso de la confirmación de la pureza del cultivo. A continuación, se enumeran las distintas familias de compuestos detectadas en las 71 muestras aisladas en el curso de la experimentación, así como su prevalencia entre el total de muestras y de extractos activos.

Alteramidas y bromoalteramidas

Las alteramidas constituyen una familia de moléculas con actividad antifúngica y antitumoral sintetizadas por algunos géneros de Gammaproteobacterias como *Alteromonas* (Shigemori *et al.*, 1992). Entre las muestras estudiadas, dos extractos pertenecientes a su vez a dos muestras distintas, de-replicaron con alteramida B y bromoalteramida A (**Figura 4.11**), siendo posteriormente identificados los microorganismos productores como representantes del género *Pseudoalteromonas*. Es de resaltar que una de las muestras (ANT-18-0333L) presenta una ratio de aislados activos siete veces superior a la media y que, de los 193 extractos activos, alrededor del 84 % son *Pseudoalteromonas* productoras de alteramidas y bromoalteramidas. Sin embargo, la otra muestra (PUL-11-07L), solamente presentó dos extractos activos, de-replicando uno de ellos con estos compuestos, indicando que, si bien la presencia de estos no es muy común, sí lo puede ser de forma puntual en alguna muestra que por alguna razón favorece la proliferación de estos organismos.

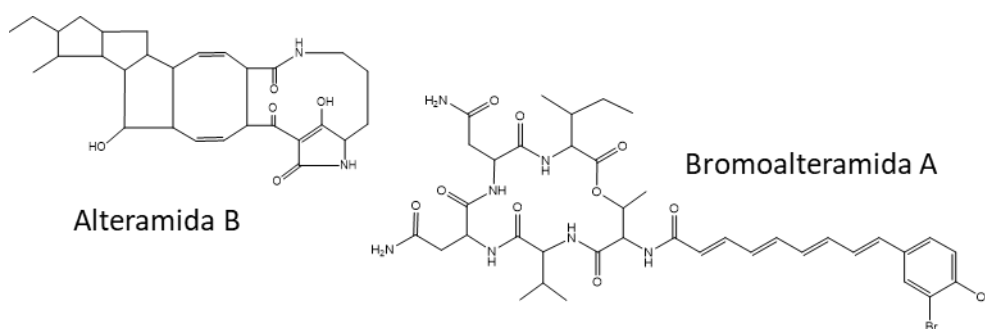


Figura 4.11: Estructuras de los compuestos con actividad antitumoral alteramida B y bromoalteramida A, aislados de forma conjunta a partir de extractos de fermentación de cepas pertenecientes al género *Pseudoalteromonas*.

Derivados de quinolina y tubermicina

Las fenacinas como la tubermicina (**Figura 4.12**) y los derivados de quinolina son metabolitos secundarios con actividad antibiótica y antitumoral aislados generalmente de representantes de los géneros *Pseudomonas*, *Burkholderia*, *Pectobacterium*, *Brevibacterium* o *Streptomyces* (Sarmin *et al.*, 2013).

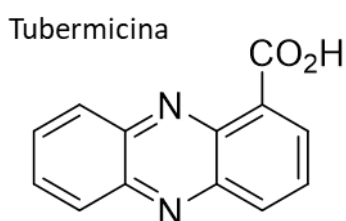


Figura 4.12: Estructura del agente antibiótico y antitumoral tubermicina.

De entre todas las muestras aisladas, solamente en una muestra (RAD-18-0360L) se de-replicaron extractos con estos compuestos confirmando posteriormente el análisis taxonómico que las cepas responsables pertenecen al género *Pseudomonas*. Al igual que en el caso de alteramidas y bromoalteramidas, la presencia de estos compuestos o sus microorganismos sintetizadores en las muestras no parece demasiado común, sin embargo, al igual que en el caso anterior, sí puede serlo en la

muestra en la que se detecta su presencia, ya que, de los 11 extractos activos detectados, el 80% de-replicaron con tubercicina y derivados de quinolina.

En extractos activos provenientes de fermentaciones de cepas del género *Microbulbifer* se detectaron derivados de quinolina sin la presencia de fenacinas. Estas cepas pertenecían a dos muestras distintas (CAS-19-0339L y CAS-19-0459L) de-replicando en varios extractos en ambas.

Estreptocidinas

Las estreptocidinas (**Figura 4.12**) son compuestos con actividad antibiótica y antitumoral aislados inicialmente de cepas del género *Streptomyces* (Gebhardt, Pukall and Fiedler, 2001) y posteriormente en firmicutes del género *Brevibacillus* (Helfrich *et al.*, 2020). La única cepa activa y productora de estreptocidinas fue aislada de la muestra KIL-11-11L, e identificada taxonómicamente como *Brevibacillus laterosporus*. Ninguna otra cepa productora de estreptocidinas fue aislada en las 71 muestras restantes.

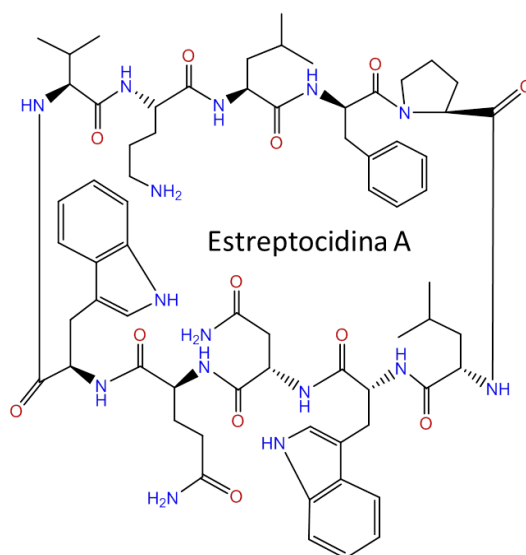


Figura 4.12: Estructura del análogo estreptocidina A, característico de *Streptomyces* y *Brevibacillus*.

Labrenzina

El potente antitumoral labrenzina (**Figura 4.13**) fue el primer compuesto de la amplia familia de las pederinas (Narquizian and Kocienski, 2000) obtenido a partir de una bacteria de vida libre, siendo aislado en 2017 por el grupo de microbiología de PharmaMar a partir de una cepa de *Labrenzia alexandrii* (Schleissner *et al.*, 2017). La muestra ANN-17-096L, de la que fue aislada la segunda cepa productora de este compuesto, fue la seleccionada para el desarrollo de la esta plataforma y la prueba de concepto. Tras el estudio de las 71 muestras, el compuesto fue detectado en 8 de ellas (CAS-19-0190L, CAS-19-0037L, CAS-19-0459L, CAS-19-0443L, ANN-17-135L, NOS-18-0410L, ANT-18-0746L y ANN-17-096L).

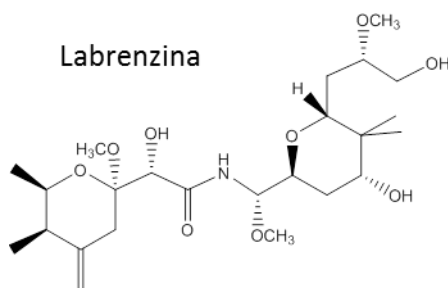


Figura 4.13: Estructura del análogo de pederina, labrenzina.

Las muestras pertenecen a distintos phyla (*Cyanobacteria*, *Cnidaria*, *Chordata* y *Porifera*) y a dos sedimentos, indicando una amplia distribución de los organismos productores del compuesto. Sin embargo, su abundancia en cada una de ellas no es elevada, lo que habrá dificultado su previo aislamiento. Por último, resaltar el aislamiento en la muestra ANT-18-0746L de una cepa productora de labrenzina identificada taxonómicamente mediante la secuenciación de su 16s rRNA como *Labrenzia alba*, constituyendo esta la primera cepa de esta especie en la que se reporta la síntesis de este compuesto y que a su vez sugiere una mayor diseminación de la agrupación génica responsable de la síntesis del compuesto en el género.

Lichenisinas

Las lichenisinas (**Figura 4.14**) son un grupo de moléculas conocidas por su actividad surfactante que presentan además una moderada actividad antitumoral. Aisladas originariamente a partir de *Bacillus licheniformis* (Coronel-León *et al.*, 2016), son sintetizadas por muchas otras especies del género. En los aislamientos por DTE llevados a cabo, fueron identificados *Bacillus* sp. productores de lichenisinas en 5 (ANN-17-135L, VEL-17-248L, BLU-17-086L, HEL-17-078L y NOS-18-0410L) de las primeras 13 muestras. Debido a esta reiteración en los resultados de derreplicación química con análogos de lichenisina en los extractos del género *Bacillus* y al limitado interés como antitumorales de estos y otros compuestos sintetizados por el género, se decide depriorizar a este grupo en los aislamientos siguientes, descartando las cepas por su taxonomía sin someterlas a estudios de HPLC. Sin embargo, la prevalencia de lichenisinas en los primeros extractos de *Bacillus* analizados y la presencia del género en una parte importante de las muestras estudiadas, indicaría que la distribución de los organismos productores de lichenisinas es muy amplia.

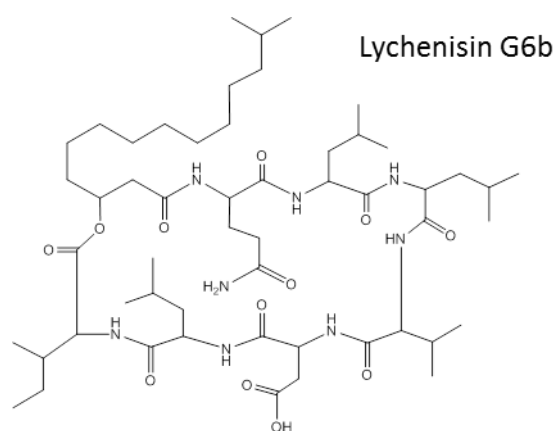


Figura 4.14: Estructura del surfactante y antitumoral Lichenisina G6b, compuesto sintetizado junto a sus análogos por varias especies del género *Bacillus*.

Por último, destacar la detección de análogos de lichenisinas en extractos de fermentación del bacteroidete *Mesoflavibacter sabulilitoris*, siendo estos compuestos generalmente atribuidos en exclusiva al género *Bacillus* y otros firmicutes.

Prodigiosinas y serratamolide

La gammaproteobacteria *Serratia marcescens* fue el organismo del que originariamente fueron aislados los compuestos antitumorales prodigiosina y serratamolide (**Figura 4.15**), así como otros análogos de la primera (Shanks *et al.*, 2012; Darshan and Manonmani, 2015). En el caso de la prodigiosina y sus análogos, su distribución es muy amplia, habiéndose reportado su síntesis en géneros de actinobacterias y distintos grupos de proteobacterias (Darshan and Manonmani, 2015).

Prodigiosinas y serratamolide fueron identificados solamente en una de las muestras (HEL-17-056L) en un extracto identificado posteriormente como *Serratia marcescens*. En cambio, distintos análogos de prodigiosinas fueron dereplicados en tres muestras más (RAD-18-0206L, CAS-19-0037L y MAN-14-0022L) perteneciendo los microorganismos productores a dos géneros distintos, *Pseudovibrio* y *Zooshikella* ambos con conocida capacidad para la síntesis de este tipo de compuestos.

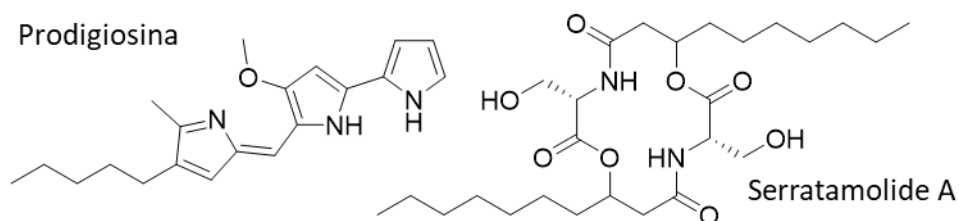


Figura 4.15: Estructuras de serratamolide A y prodigiosina.

Pseudopironinas

Las pseudopironinas (**Figura 4.16**) son compuestos con actividad antibiótica y antitumoral sintetizados por especies del género *Pseudomonas* (Kong, Singh and Carter, 2005). En las muestras aisladas con la nueva plataforma, solamente una cepa de-replicó con estos compuestos. La cepa, proveniente de la muestra NOS-18-0099L, fue posteriormente analizada taxonómicamente asignándose su pertenencia al género *Ruegeria*. Este hecho resulta curioso dado que hasta el momento no se ha relacionado a ningún género de alphaproteobacterias con la síntesis de pseudopironinas.

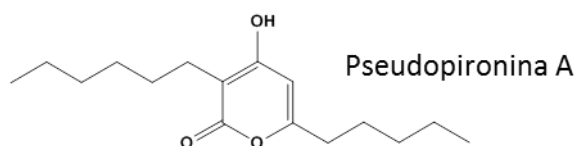


Figura 4.16: Estructura del antibiótico y antitumoral pseudopironina A.

Rhamnolípidos

Los rhamnolípidos (**Figura 4.17**) son una familia de biosurfactantes glicolípidicos sintetizados por grupos bacterianos muy diversos pero especialmente por cepas del género *Pseudoalteromonas* y otros relacionados (Abdel-Mawgoud, Lépine and Déziel, 2010). Solamente dos cepas aisladas a partir de dos muestras distintas (ANT-18-0333L y CAS-19-0704L) de-replicaron con estas moléculas, lo que sugiere una limitada presencia de este tipo de compuestos en las muestras.

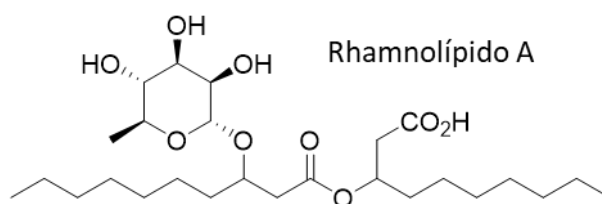


Figura 4.17: Estructura del biosurfactante glicolípidico rhamnolípidido A.

Sesbanimidias

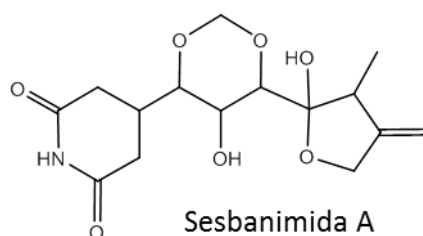


Figura 4.20: Estructura de sesbanimida A.

Las sesbanimidas A y B (**Figura 4.20**) son alcaloides con actividad citotóxica muy potente, aislados originariamente de semillas de leguminosas para ser identificados posteriormente en fermentaciones bacterianas (Acebal *et al.*, 1998). En dos de las muestras trabajadas (ANN-17-096L y RAD-18-0094L) se obtuvieron extractos con sesbanimidas, siendo en ambos casos el organismo productor identificado como *Labrenzia aggregata*.

Surfactinas y pumilacidinas

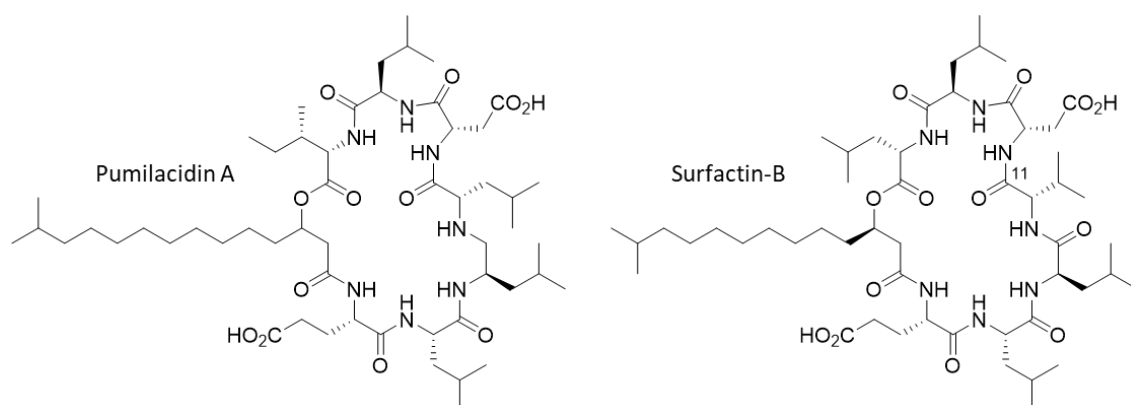


Figura 4.18: Estructura química de los lipopéptidos pumilacidina A y surfactina B, compuestos antitumorales aislados en el género *Bacillus*.

Surfactinas y pumilacidinas (**Figura 4.18**) son dos clases de lipopéptidos con actividad antitumoral del orden de mM característicos del género *Bacillus* (Cooper *et al.*, 1981; Naruse *et al.*, 1990). Como se comenta con anterioridad, tras las primeras muestras, se descartan los aislados de este género por de-replicar generalmente con compuestos sin interés. Por lo tanto, surfactinas y pumilacidinas fueron detectados solamente en un aislado, pero presumiblemente, su frecuencia habría sido mucho mayor de haber llevado a cabo su de-replicación química por HPLC. Otros lipopéptidos característicos de *Bacillus* como las isocumarinas serían así mismo esperables entre los compuestos de-replicados.

Violaceína

La violaceína (**Figura 4.19**), es un pigmento indólico con actividad antimicrobiana y antitumoral aislado de múltiples grupos bacterianos (Choi *et al.*, 2015). En los aislamientos llevados a cabo, solamente dos extractos de la misma muestra (ANT-18-0333L) mostraron la presencia de violaceína, tratándose en ambos casos de la misma cepa identificada posteriormente como perteneciente al género *Microbulbifer*. Es de destacar que a pesar de ser éste uno de los géneros con actividad antitumoral más frecuentemente aislados en los ensayos realizados, solamente una cepa haya sido productora de violaceína. Sin embargo, el hecho de que la secuencia de 16S rRNA muestre una homología del 95.15%, indica un elevado distanciamiento genético con las demás cepas aisladas y podría incluso situarla en un grupo taxonómico diferente, explicando así que sea la única productora del compuesto.

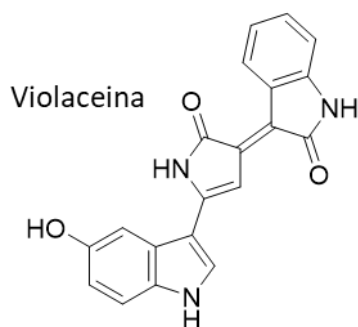


Figura 4.19: Estructura del compuesto violaceína.

4.2.6 Diversidad biológica

A pesar de la inmensa diversidad bacteriana existente en los océanos y en los organismos que lo habitan (York, 2020), el número de géneros de bacterias no filamentosas con capacidad biosintética para producir compuestos antitumorales es relativamente reducido (Takahashi and Nakashima, 2018). Los grupos de oligotrofos tipo SAR11, se estima que suponen el grueso de las bacterias que habitan los mares, estos organismos albergan genomas muy reducidos que apenas codifican información

para la síntesis de metabolitos secundarios en general y antitumorales en particular (Joint, Mühling and Querellou, 2010).

Género	Muestras con representantes	Prevalencia (%)
<i>Acinetobacter</i>	2	2.8
<i>Aquimarina</i>	1	1.4
<i>Bacillus</i>	21	29.5
<i>Brevibacillus</i>	1	1.4
<i>Chryseobacterium</i>	1	1.4
<i>Enterovibrio</i>	2	2.8
<i>Halomonas</i>	2	2.8
<i>Labrenzia</i>	11	15.5
<i>Mesoflavibacter</i>	1	1.4
<i>Microbulbifer</i>	44	61.9
<i>Ochrobactrum</i>	1	1.4
<i>Pseudoalteromonas</i>	3	4.2
<i>Pseudomonas</i>	3	4.2
<i>Pseudovibrio</i>	8	11.3
<i>Ruegeria</i>	21	29.5
<i>Serratia</i>	2	2.8
<i>Shigella flexneri</i>	1	1.4
<i>Tropicibacter</i>	1	1.4
<i>Zooshikella</i>	1	1.4

Tabla 4.5 Géneros bacterianos con actividad antitumoral aislados a partir de las 71 muestras que formaron el ensayo y su prevalencia en las poblaciones estudiadas (porcentaje de muestras en los que se aíslan representantes activos del género).

Respecto a los géneros bacterianos copiotrofos más proclives a crecer en las condiciones de laboratorio empleadas en esta investigación que ya por sí mismos constituyen una pequeña fracción de toda la biodiversidad bacteriana existente, grupos muy comunes como *Microbulbifer*, *Bacillus* o *Ruegeria*, conforman una abrumadora mayoría en comparación con otros géneros productores de compuestos antitumorales. La plataforma de aislamiento desarrollada refleja este hecho, como se puede ver en la **Tabla 4.5**, donde se muestra cómo el género *Microbulbifer* aporta cepas activas hasta en un 62% de las muestras mientras que 16 de los 21 géneros que han aportado cepas

activas muestran una prevalencia inferior al 5% en el conjunto de las muestras estudiadas. En la **Tabla 4.5** se ve cómo, por ejemplo, el género *Microbulbifer* aporta cepas activas hasta en un 62% de las muestras mientras que 16 de los 21 géneros muestran una prevalencia en las muestras inferior al 5%.

Acinetobacter

Solamente se han aislado cepas activas del género *Acinetobacter* en dos de las muestras. Ninguna de las cepas de-replicó con compuesto conocido. Futuros trabajos deberían enfocarse en la identificación de dichos compuestos. A pesar de que ambas cepas presentaron un perfil de actividad similar frente a las cuatro líneas tumorales del ensayo de citotoxicidad (**Tabla 4.6**), cabe resaltar las diferencias a nivel genético que presentan ambas, mostrando la cepa CAS-19-0584L una identidad en su secuencia ARNr 16S inferior al 97%, lo que podría suponer su asignación a un grupo taxonómico distinto.

Taxonomía	Colon	Lung-NSCLC	Breast	Pancreas	\bar{X}	Cepa	Identidad (%)
	HT29	A549	MDA-MB-231	PSN1			
<i>Acinetobacter venetianus</i>	-16.8	-53.0	-57.5	-19.6	-36.7	CAS-19-0584L-001	96.53
<i>Acinetobacter venetianus</i>	-19.7	-64.2	-80.4	-42.1	-51.6	ANT-18-0333L-142	99.78

Tabla 4.6: Perfil de actividad citotóxica e identidad que presentan las cepas de *Acinetobacter venetianus* aisladas.

Aquimarina

Este género de bacteroidetes ha aportado una sola cepa con actividad antitumoral (**Tabla 4.7**). La cepa identificada taxonómicamente como *Aquimarina salinaria* mostró una actividad contundente en las cuatro líneas tumorales y los compuestos responsables de dicha actividad fueron identificados tras su elucidación estructural como una nueva familia de péptidos halogenados todavía sin publicar. Esta

muestra fue utilizada para los aislamientos en paralelo lográndose el aislamiento de la cepa con ambos protocolos (método clásico en medio sólido y mediante DTE).

Taxonomía	Colon	Lung-NSCLC	Breast	Pancreas	\bar{X}	Cepa	Identidad (%)
	HT29	A549	MDA-MB-231	PSN1			
<i>Aquimarina salinaria</i>	-62.7	-49.6	-67.3	-77.6	-64.3	HEL-17-078L-003	98.69

Tabla 4.7: Perfil de actividad citotóxica de la cepa de-replicada con la nueva familia de péptidos.

Bacillus

El género *Bacillus* es uno de los grupos de bacterias no filamentosas con un metabolismo secundario más rico, aportando un número elevado de moléculas con múltiples aplicaciones y actividades (Sansinenea and Ortiz, 2011). Sin embargo, por criterios del departamento, en este estudio no se ha priorizado la identificación de posibles nuevos compuestos producidos por este tipo de organismos por considerarlos de bajo interés, por lo que la gran mayoría de cepas con actividad pertenecientes a este género se han descartado siguiendo esta directriz y no se dispone de información taxonómica o de de-replicación química completas.

El género aportó cepas activas en cerca del 30% de las muestras estudiadas, lo que demuestra su ubicuidad y potencial como fuente de compuestos con actividad antitumoral, además de la idoneidad de la nueva plataforma para el aislamiento de firmicutes. En los extractos que presentaron actividad y fueron sometidos a ensayos de de-replicación química, se detectaron en todos los casos compuestos conocidos característicos del género como lichenisinas, surfactinas o pumilacidinas.

Brevibacillus

Brevibacillus es otro grupo de firmicutes con capacidad biosintética (Zhao and Kuipers, 2016). Solamente fue aislada una cepa productora de estreptocidinas en una de las muestras (**Tabla 4.8**).

Taxonomía	Colon	Lung-NSCLC	Breast	Pancreas	\bar{X}	Cepa	Identidad (%)
	HT29	A549	MDA-MB-231	PSN1			
<i>Brevibacillus laterosporus</i>	-69.4	-71.8	-81.6	-83.7	-76.6	KIL-11-11L-030	98.69

Tabla 4.8: Perfil de actividad citotóxica de la cepa activa identificada como *Brevibacillus laterosporus*.

Chryseobacterium

Se ha logrado el aislamiento de un representante de este género de bacteroidetes a partir de la muestra NOS-18-0410L-001 (**Tabla 4.9**). La cepa presentó unos valores contundentes de inhibición del crecimiento para todas las líneas tumorales testadas y dicha actividad ha sido atribuida recientemente a un grupo de glicolípidos novedosos pendientes de publicación.

Taxonomía	Colon	Lung-NSCLC	Breast	Pancreas	\bar{X}	Cepa	Identidad (%)
	HT29	A549	MDA-MB-231	PSN1			
<i>Chryseobacterium vietnamense</i>	-80.9	-81.0	-82.5	-77.1	-80.4	NOS-18-0410-001	97.71

Tabla 4.9: Actividad antitumoral mostrada por la cepa NOS-18-0410L-001 en el ensayo de citotoxicidad.

Enterovibrio

Tres cepas distintas del género *Enterovibrio* presentaron actividad antitumoral en los ensayos (**Tabla 4.10**). Todas siguen en proceso de identificación al no de-replicar con compuestos conocidos.

Taxonomía	Colon	Lung-NSCLC	Breast	Pancreas	\bar{X}	Cepa	Identidad (%)
	HT29	A549	MDA-MB-231	PSN1			
<i>Enterovibrio nigricans</i>	-38.7	-3.0	24.4	37.8	5.1	NOS-18-0410L-003	97.08
<i>Enterovibrio norvegicus</i>	-10.0	-86.0	-25.6	-37.5	-39.8	ANN-17-135L-005	97.27
<i>Enterovibrio norvegicus</i>	-40.3	-70.7	-18.4	-36.8	-41.6	ANN-17-135L-004	97.71

Tabla 4.10: Perfil de actividad antitumoral de las tres cepas activas del género *Enterovibrio* aisladas por dilución a extinción.

Como se puede observar en la **Tabla 4.10**, la cepa identificada taxonómicamente como *Enterovibrio nigricans* y perteneciente a una muestra distinta a las demás presenta un perfil de actividad más bajo en tres de las líneas tumorales, lo que podría deberse a una menor biosíntesis del compuesto bioactivo o a que se trate de una molécula distinta.

Halomonas

Taxonomía	Colon	Lung-NSCLC	Breast	Pancreas	\bar{X}	Cepa	Identidad (%)
	HT29	A549	MDA-MB-231	PSN1			
<i>Halomonas meridiana</i>	-44.5	1.5	-0.5	5.7	-9.5	ANT-18-0333L-067	98.71
<i>Halomonas meridiana</i>	-30.3	-49.4	-13.4	-39.0	-33.0	CAS-19-0704L-025	99.7

Tabla 4.11: Resultados de actividad antitumoral de las cepas de *Halomonas meridiana* aisladas.

De dos muestras distintas se aislaron dos cepas activas del género *Halomonas* que mostraron actividad citotóxica por la síntesis de ramnolípidos (**Tabla 4.11**).

Labrenzia

Taxonomía	Colon	Lung-NSCLC	Breast	Pancreas	\bar{X}	Cepa	Identidad (%)
	HT29	A549	MDA-MB-231	PSN1			
<i>Labrenzia alba</i>	-32.3	-57.8	-73.3	-33.2	-49.2	ANT-18-0746L-001	98.63
<i>Labrenzia alexandrii</i>	-19.4	-62.4	-75.1	-67.4	-56.1	ANN-17-096L-002	98.73
<i>Labrenzia alexandrii</i>	-27.7	-79.6	-87.6	-73.6	-67.1	ANN-17-096L-007	98.73
<i>Labrenzia alexandrii</i>	-14.1	-49.5	-55.6	-68.4	-46.9	ANN-17-135L-007	98.73
<i>Labrenzia alexandrii</i>	10.5	-65.3	-69.2	-52.3	-44.1	CAS-19-0037L-002	98.79
<i>Labrenzia alexandrii</i>	-25.0	-62.1	-76.8	-67.0	-57.7	CAS-19-0037L-006	98.69
<i>Labrenzia alexandrii</i>	-9.9	-43.0	-69.6	-59.7	-45.6	CAS-19-0190L-002	99
<i>Labrenzia alexandrii</i>	-40.4	-69.9	-83.8	-63.6	-64.4	CAS-19-0190L-003	98.7
<i>Labrenzia alexandrii</i>	-46.3	-73.7	-71.8	-61.1	-63.2	CAS-19-0443L-001	-
<i>Labrenzia alexandrii</i>	-7.6	-66.2	-68.3	-43.9	-46.5	CAS-19-0459L-003	-
<i>Labrenzia alexandrii</i>	-10.9	-7.5	-26.6	-27.1	-18.0	CAS-19-0692L-004	97.9
<i>Labrenzia alexandrii</i>	-44.3	-78.2	-78.7	-49.5	-62.7	NOS-18-0410-005	-
<i>Labrenzia aggregata</i>	24.8	10.8	-26.2	-1.9	1.9	CAS-19-0692L-004	97.9
<i>Labrenzia aggregata</i>	21.2	14.2	20.9	26.3	-62.7	NOS-18-0410-005	-

Figura 4.12: Cepas del género *Labrenzia* aisladas, con sus resultados en los test de citotoxicidad.

El aislamiento de una cepa productora del antitumoral labrenzina fue la base de la prueba de concepto de la plataforma de aislamiento. Fruto de dicha prueba, tres cepas del género *Labrenzia* fueron aisladas de la muestra ANN-17-096L Posteriormente, en

10 de las muestras estudiadas se aislaron cepas productoras de labrenzina, siendo identificada por vez primera su síntesis por parte de la especie *Labrenzia alba* y siendo caracterizadas las demás como *Labrenzia alexandrii*.

Dos cepas con un perfil de citotoxicidad menos contundente que el que presentan las cepas productoras de labrenzina fueron identificadas en base a su secuencia de ARNr 16S como *Labrenzia aggregata* (Tabla 4.12), siendo finalmente derreplicadas como productoras de sesbanimidias.

Mesoflavibacter

Una cepa activa aislada de la muestra VEL-19-248L y perteneciente al género *Mesoflavibacter* (Bacteroidetes) fue de-replicada por HPLC-MS como productora de lichenisinas (Tabla 4.13). Este compuesto es generalmente producido por cepas del grupo Firmicutes y especialmente del género *Bacillus* (Coronel-León *et al.*, 2016), lo cual hace relevante el aislamiento de esta cepa.

Taxonomía	Colon	Lung-NSCLC	Breast	Pancreas	\bar{X}	Cepa	Identidad (%)
	HT29	A549	MDA-MB-231	PSN1			
<i>Mesoflavibacter sabulilitoris</i>	-73.9	-35.7	-63.8	-39.8	-53.3	VEL-17-248L-104	98.68

Tabla 4.13: Perfil de actividad antitumoral de la única cepa activa del género *Mesoflavibacter* aislada de las muestras.

Microbulbifer

Un total de 293 cepas con actividad citotóxica provenientes de 44 muestras distintas fueron identificados como representantes del género *Microbulbifer* dando una idea de la ubicuidad de este grupo en las muestras marinas. Al igual que con el género *Bacillus*, por criterios de departamento, no se ha procedido a realizar la de-replicación química y la asignación taxonómica completas de los extractos activos, siendo

esperables en base a investigaciones previas, diferentes familias de compuestos ya conocidos.

Ochrobactrum

Distintos análogos de los compuestos con actividad antitumoral ansamicinas han sido aislados de cepas marinas del género *Ochrobactrum* (Fan *et al.*, 2018). Sin embargo, la única cepa activa del género aislada continúa en proceso al no de-replicar con dichos compuestos a pesar de mostrar una actividad citotóxica contundente en los ensayos (**Tabla 4.14**).

Taxonomía	Colon	Lung-NSCLC	Breast	Pancreas	\bar{X}	Cepa	Identidad (%)
	HT29	A549	MDA-MB-231	PSN1			
<i>Ochrobactrum lupini</i>	-33.2	-62.9	-28.6	-40.7	-41.4	RAD-18-0360L-003	99.8

Tabla 4.14: Perfil de actividad antitumoral de la cepa RAD-18-0360L-003.

Pseudoalteromonas

A pesar de no ser un género que haya aportado cepas activas en un número elevado de muestras (ANT-18-0333L, CAS-19-0587L y PUL-11-07L), resulta llamativo el número de extractos con actividad citotóxica pertenecientes al género *Pseudoalteromonas*. Esto se debe a la enorme abundancia que las cepas de *Pseudoalteromonas piscicida*, ANT-18-0333L-009, ANT-18-0333L-033 y ANT-18-0333L-072 presentaron en su muestra de origen comparándolas con las demás cepas de *Pseudoalteromonas* aisladas. Todas las cepas sometidas a derreplicación química derreplicaron con alteramidas y bromoalteramidas.

Taxonomía	Colon	Lung-NSCLC	Breast	Pancreas	\bar{X}	Cepa	Identidad (%)
	HT29	A549	MDA-MB-231	PSN1			
<i>Pseudoalteromonas sp.</i>	3.5	-39.5	-62.7	-3.1	-25.5	ANT-18-0333L-009	-
<i>Pseudoalteromonas piscicida</i>	-21.3	-31.0	-48.2	-39.3	-35.0	ANT-18-0333L-033	99.16
<i>Pseudoalteromonas piscicida</i>	-37.8	-45.3	-49.0	-13.8	-36.5	ANT-18-0333L-072	-
<i>Pseudoalteromonas shioyasakiensis</i>	24.7	5.5	-3.6	14.7	10.3	CAS-19-0587L-007	99.23
<i>Pseudoalteromonas sp.</i>	-42.2	-3.6	-15.9	-47.0	-27.2	PUL-11-07L-002	-

Tabla 4.15: Cepas activas del género *Pseudoalteromonas* aisladas.

Pseudomonas

Taxonomía	Colon	Lung-NSCLC	Breast	Pancreas	\bar{X}	Cepa	Identidad (%)
	HT29	A549	MDA-MB-231	PSN1			
<i>Pseudomonas aesturnigri</i>	8.3	10.9	-47.0	7.5	-5.1	ANT-18-0333L-016	-
<i>Pseudomonas stutzeri</i>	-34.5	-10.2	-49.0	-19.0	-28.2	ANT-18-0333L-048	99.16
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-34.6	-55.7	-76.6	1.9	-41.3	RAD-18-0360L-004	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-69.3	-95.2	-64.9	-55.4	-71.2	RAD-18-0360L-009	99.23
<i>Pseudomonas pachastrellae</i>	-2.8	-35.0	-9.8	-5.7	-13.3	RAD-18-0773L-005	-

Tabla 4.16: Cepas con actividad antitumoral del género *Pseudomonas*.

Un total de 5 cepas activas pertenecientes al género *Pseudomonas* (Tabla 4.16) fueron aisladas de tres muestras distintas. De los trece extractos activos detectados, 10 de ellos se corresponden con dos cepas identificadas taxonómicamente como *Pseudomonas aeruginosa* y fueron aisladas a partir de la muestra RAD-18-0360L, sintetizando todas ellas los compuestos antitumorales tubercina y derivados de

quinolina. Las demás cepas pertenecen a otras especies del género, ninguna derreplica con compuesto conocido por lo que siguen en estudio.

Pseudovibrio

Taxonomía	Colon	Lung-NSCLC	Breast	Pancreas	\bar{X}	Cepa	Identidad (%)
	HT29	A549	MDA-MB-231	PSN1			
<i>Pseudovibrio denitrificans</i>	-49.5	-28.9	4.3	15.6	-14.6	BLU-17-086L-005	-
<i>Pseudovibrio denitrificans</i>	28.7	2.3	-2.0	1.2	7.6	HEL-17-078L-006	91.28
<i>Pseudovibrio denitrificans</i>	-61.3	-15.7	-49.0	-46.0	-43.0	MAN-14-0022L-002	-
<i>Pseudovibrio denitrificans</i>	-42.4	-78.5	-78.1	-62.7	-65.4	NOS-18-0227L-005	99.9
<i>Pseudovibrio denitrificans</i>	-16.2	-31.7	-6.8	-32.3	-21.8	NOS-18-0227L-025	99.8
<i>Pseudovibrio denitrificans</i>	69.5	18.1	-0.1	16.8	26.1	NOS-18-0641L-001	-
<i>Pseudovibrio denitrificans</i>	38.1	17.9	19.3	7.6	20.7	RAD-18-0094L-001	99.87
<i>Pseudovibrio denitrificans</i>	-51.3	-47.7	-31.8	-57.4	-47.1	RAD-18-0206L-001	-
<i>Pseudovibrio denitrificans</i>	-24.6	-53.8	-27.6	-6.4	-28.1	RAD-18-0206L-002	-
<i>Pseudovibrio denitrificans</i>	-25.9	-75.1	-15.9	-19.4	-34.1	RAD-18-0206L-008	-

Tabla 4.17: Perfiles de actividad de las cepas de *Pseudovibrio denitrificans* frente a las cuatro líneas tumorales testadas.

Todas las cepas activas fueron identificadas taxonómicamente como *Pseudovibrio denitrificans*. Las 10 cepas fueron aisladas de 7 muestras distintas, indicando una amplia distribución de los representantes activos del género. A pesar de ser un grupo de alfaproteobacterias con un gran potencial genético para la síntesis de metabolitos secundarios (Naughton *et al.*, 2017), en este trabajo solamente fue detectada actividad antitumoral debida a la síntesis de prodigiosinas así como únicamente se han aislado cepas activas de la especie *denitrificans*.

Ruegeria

Taxonomía	Colon	Lung-NSCLC	Breast	Pancreas	\bar{X}	Cepa	Identidad (%)
	HT29	A549	MDA-MB-231	PSN1			
<i>Ruegeria arenilitoris</i>	-67.8	-66.2	-47.6	-84.8	-66.6	ANN-17-135L-008	-
<i>Ruegeria arenilitoris</i>	-50.9	-54.1	-66.8	-80.0	-63.0	ANN-17-135L-010	99.77
<i>Ruegeria</i> sp.	-14.2	-65.6	-8.3	-3.1	-22.8	ANT-18-0640L-020	-
<i>Ruegeria</i> sp.	-16.2	-66.6	4.8	-19.5	-24.4	ANT-18-0640L-022	97.73
<i>Ruegeria</i> sp.	-8.8	-62.0	19.6	-36.4	-21.9	ANT-18-0640L-024	99.02
<i>Ruegeria mobilis</i>	-24.9	-70.0	-51.2	-55.6	-50.4	CAS-19-0494L-001	99.77
<i>Ruegeria arenilitoris</i>	0.9	0.2	-41.6	-58.5	-24.8	CAS-19-0531L-002	97.73
<i>Ruegeria conchae</i>	-78.9	-103.2	-96.7	-95.0	-93.5	NOS-18-0099L-020	97.73
<i>Ruegeria arenilitoris</i>	-80.8	-84.3	-84.5	-71.1	-80.2	NOS-18-0641L-015	99.77
<i>Ruegeria arenilitoris</i>	-11.3	-1.6	-0.2	-66.9	-20.0	NOS-18-0861L-006	97.73
<i>Ruegeria arenilitoris</i>	-37.7	-44.7	0.8	-18.6	-25.1	RAD-18-0248L-002	-
<i>Ruegeria arenilitoris</i>	-69.9	-86.4	-8.0	24.3	-35.0	RAD-18-0360L-001	99.02

Tabla 4.18: Cepas activas del género *Ruegeria* que presentan un promedio de actividad contundente ($\bar{X} < -20$) y no de-repican con compuestos conocidos en los test de HPLC.

Ruegeria es otro de los géneros que ha mostrado una amplia distribución, siendo aislados representantes activos en 21 de las 71 muestras analizadas. Sin embargo, la frecuencia de aparición en cada una de ellas es muy dispar, detectándose entre uno y 12 extractos activos por muestra. Este género tiene un gran potencial genético para la producción de compuestos bioactivos y su perfil de actividad tan variable podría ser indicativo de la producción de compuestos distintos. Hasta el momento, ninguna de las cepas estudiadas ha derreplicado con entidades químicas ya conocidas por lo que las que han mostrado una mayor actividad antitumoral siguen en proceso de identificación (Tabla 4.18).

Serratia

Solamente dos extractos pertenecientes a su vez a dos muestras distintas deben su actividad a la presencia de prodigiosinas y serratomolides conjuntamente. Tras la secuenciación 16S rRNA, ambos extractos proceden de aislados de *Serratia marcescens*, especie conocida por ser productora de dichos compuestos (Williams, 1973; Shanks *et al.*, 2012).

Taxonomía	Colon	Lung-NSCLC	Breast	Pancreas	\bar{X}	Cepa	Identidad (%)
	HT29	A549	MDA-MB-231	PSN1			
<i>Serratia marcescens</i>	-66.1	-81.5	-87.9	-68.1	-75.9	HEL-17-056L-002	99.34
<i>Serratia marcescens</i>	12.4	11.1	14.4	47.5	21.4	CAS-19-0584L-003	

Tabla 4.19: Perfil de actividad de las cepas activas de *Serratia marcescens*.

Shigella

Taxonomía	Colon	Lung-NSCLC	Breast	Pancreas	\bar{X}	Cepa	Identidad (%)
	HT29	A549	MDA-MB-231	PSN1			
<i>Shigella flexneri</i>	6.8	-16.9	65.1	13.4	17.1	ANT-18-0640L-006	93
<i>Shigella flexneri</i>	9.6	1.2	32.7	9.6	13.3	ANT-18-0640L-003	99.64

Tabla 4.20: Actividad antitumoral de las cepas de *Shigella flexneri* aisladas de la muestra ANT-18-0640L.

Las dos únicas cepas activas de este género provienen de la misma muestra (**Tabla 4.20**). Actualmente siguen en proceso al no de-replicar sus extractos con ningún compuesto conocido. Ambas cepas mostraron una modesta actividad citotóxica por lo

que presumiblemente será necesaria una mejora de la producción de los compuestos antitumorales sintetizados para su elucidación.

Tropicibacter

Se ha logrado el aislamiento de un representante de este género de bacteroidetes a partir de la muestra NOS-18-0099L (**Tabla 4.21**). Curiosamente, la de-replicación química del extracto atribuye la actividad citotóxica a los mismos glucolípidos descubiertos en *Chryseobacterium*, perteneciente a un phylum distinto.

Taxonomía	Colon	Lung-NSCLC	Breast	Pancreas	\bar{X}	Cepa	Identidad (%)
	HT29	A549	MDA-MB-231	PSN1			
<i>Tropicibacter mediterraneus</i>	-20.4	12.0	-24.2	11.0	-5.4	NOS-18-0099L-001	93

Tabla 4.21 Perfil de actividad antitumoral de la cepa NOS-18-0099L.

Zooshikella

Taxonomía	Colon	Lung-NSCLC	Breast	Pancreas	\bar{X}	Cepa	Identidad (%)
	HT29	A549	MDA-MB-231	PSN1			
<i>Zooshikella ganghwensis</i>	-82.0	-82.9	-93.2	-82.7	-85.2	CAS-19-0037L-007	98.13

Tabla 4.22: Actividad de la cepa CAS-19-0037L-007 frente a las cuatro líneas tumorales.

Los 5 extractos identificados como *Zooshikella ganghwensis* de-replicaron con prodigiosinas. Este género se caracteriza por una elevada capacidad de síntesis de este compuesto (Lee *et al.*, 2011). Conociendo ese dato, se puede afirmar que el género *Zooshikella* no es tan común como otros productores de prodigiosinas, al haber sido

aislado solamente a partir de la muestra CAS-19-0037L. La cepa, muestra una elevada producción del compuesto, como se ve reflejado en unos valores de inhibición del crecimiento celular muy elevados frente a las cuatro líneas testadas (**Tabla 4.22**).

4.2.7 Posibles nuevos géneros

Especie más próxima	Código de cepa	Identidad (%)	Secuencia (pb)
<i>Acinetobacter venetianus</i>	CAS-19-0584L-001	96.53	750
<i>Bacillus methanolicus</i>	RAD-180206L-009	96.81	816
<i>Enterovibrio norvegicus</i>	NOS-18-0410L-003	97.08	856
<i>Enterovibrio norvegicus</i>	ANN-17-135L-005	97.27	549
<i>Microbulbifer thermotolerans</i>	CAS-19-0587L-006	96.91	846
<i>Microbulbifer variabilis</i>	ANT-18-0640L-007	93.64	619
<i>Microbulbifer variabilis</i>	ANT-18-0333L-099	95.15	1155
<i>Microbulbifer variabilis</i>	ANT-18-0676L-001	96.96	790
<i>Shigella flexneri</i>	ANT-18-0640L-006	94.21	1208

Tabla 4.23: Cepas no de-replicadas con compuestos conocidos con una homología inferior al 97.5%.

Entre las cepas activas aisladas y secuenciadas tras no de-replicar con ningún compuesto conocido en HPLC-MS, se encuentran nueve cepas cuyo porcentaje de homología con la cepa tipo más próxima es inferior al 97.5 %. Este grado de homología es considerado por distintos autores como el umbral por debajo del cual podríamos considerar a la nueva cepa como representante de un nuevo género (Richter and Rosselló-Móra, 2009; Kim *et al.*, 2014). Por lo tanto, es probable que las nueve cepas listadas en la **Tabla 4.23** sean representantes de nuevos grupos taxonómicos, incrementándose así las probabilidades de que los compuestos responsables de la actividad antitumoral sean así mismo novedosos.

DISCUSIÓN

5.1 Bacterias marinas y cáncer

A pesar de los múltiples enfoques existentes para el tratamiento del cáncer, la quimioterapia sigue siendo uno de los tratamientos más empleados, estando basados gran parte de ellos en fármacos de origen o inspiración natural. Los macroorganismos marinos suponen una extraordinaria fuente de nuevos compuestos antitumorales, siendo cada vez más evidente y aceptado que los responsables últimos de su biogénesis pueden ser los microorganismos íntimamente asociados a ellos como simbioses estrictos.

El aislamiento de bacterias marinas productoras de compuestos antitumorales ha dado sus frutos en forma de entidades químicas con potentes actividades antitumorales. Además, el desarrollo de las técnicas de biología molecular en general y de anotación génica en particular ha revelado la presencia de una enorme cantidad de agrupaciones génicas crípticas que podrían albergar nuevos compuestos. Gracias a estos hallazgos, el aislamiento de nuevas bacterias marinas productoras de compuestos bioactivos ha recuperado el interés perdido a finales del siglo XX con la emergencia de las técnicas de síntesis combinatoria.

A pesar de que las actinobacterias, especialmente el género *Streptomyces*, han acaparado toda la atención por su reconocido potencial para la síntesis de metabolitos secundarios, en los últimos años, otros grupos de bacterias no filamentosas han ido ganado importancia tanto por su potencial génico como por los compuestos que han sido aislados a partir de ellas. Sin embargo, la presencia de cepas con actividad antitumoral en estos grupos es muy minoritaria. Esta tesis doctoral contribuye al desarrollo de técnicas y protocolos de aislamiento de alto rendimiento que permitan llegar a ellas.

5.2 Selección del método adecuado para un aislamiento de alto rendimiento

Uno de los pasos previos para este trabajo ha sido seleccionar un método compatible con un aislamiento de alto rendimiento que se adapte a las características y requerimientos del programa de descubrimiento de productos naturales marinos de PharmaMar, para desarrollar a partir de él una plataforma de aislamiento y cribado de

bacterias no filamentosas productoras de compuestos con actividad antitumoral que complemente y aporte nueva diversidad química a los aislamientos en medio sólido en placa de Petri que, de forma rutinaria, se lleva a cabo. Dentro de las distintas opciones metodológicas disponibles en la literatura, el aislamiento “*in situ*” mediante sistemas como I-Chip o I-Tip (Nichols *et al.*, 2010; Jung *et al.*, 2014), Microdish® (Ingham *et al.*, 2007a) o las cámaras de difusión (Lewis *et al.*, 2010), presentan importantes dificultades técnicas para su implementación a gran escala por lo que no se consideraron inicialmente como alternativas de aislamiento. Por lo tanto, dilución a extinción (Rappé *et al.*, 2002) y microencapsulación (Zengler *et al.*, 2002) se presentaban como los enfoques más susceptibles de ser empleados para este propósito. Ambos métodos parten de premisas muy similares, siendo crucial la dilución inicial de la muestra de partida para lograr cultivos individualizados, tanto en las esferas de agarosa en el caso de la microencapsulación, como en los pocillos de las placas microtiter en el caso de la dilución a extinción. La gran diferencia entre ambos métodos radica en que las microesferas permiten el intercambio de señales y compuestos entre los organismos confinados dentro de cada esfera (Li *et al.*, 2017) funcionando el sistema como teóricos cocultivos (Bertrand *et al.*, 2014) que podrían favorecer la división celular de algunas bacterias, mientras que entre los cultivos de dilución a extinción dicha comunicación o intercambio no existe (**Figura 5.1**).

Las cápsulas de agarosa o alginato permiten a las microcolonias realizar dicho intercambio, pero constituyen al mismo tiempo una frágil barrera ya que una vez ocupado todo el espacio disponible en el interior de la cápsula, la colonia en crecimiento rompe la película, pasando a invadir el medio de cultivo que comparte con el resto de esferas. Evitar el sobrecrecimiento de las microcolonias es posible cuando se trabaja con cultivos puros o mixtos formados por bacterias con un tiempo de generación conocido y semejante (Eun *et al.*, 2011). Sin embargo, las muestras marinas que se procesan normalmente en nuestro laboratorio, albergan una gran variabilidad en cuanto a abundancia y biodiversidad taxonómica debido a distintos factores bióticos y abióticos como profundidad, área de recogida, época del año o la taxonomía del macroorganismo (Souza *et al.*, 2016) que suponen una dificultad técnica añadida en el caso de utilizar la microencapsulación como método de aislamiento.

El aislamiento mediante DTE, gracias a la individualización total de los cultivos en los pocillos, logra evitar que los distintos tiempos de generación de los aislados provoquen contaminaciones por sobrecrecimiento a costa de no permitir ningún tipo de comunicación entre los cultivos (**Figura 5.1**).

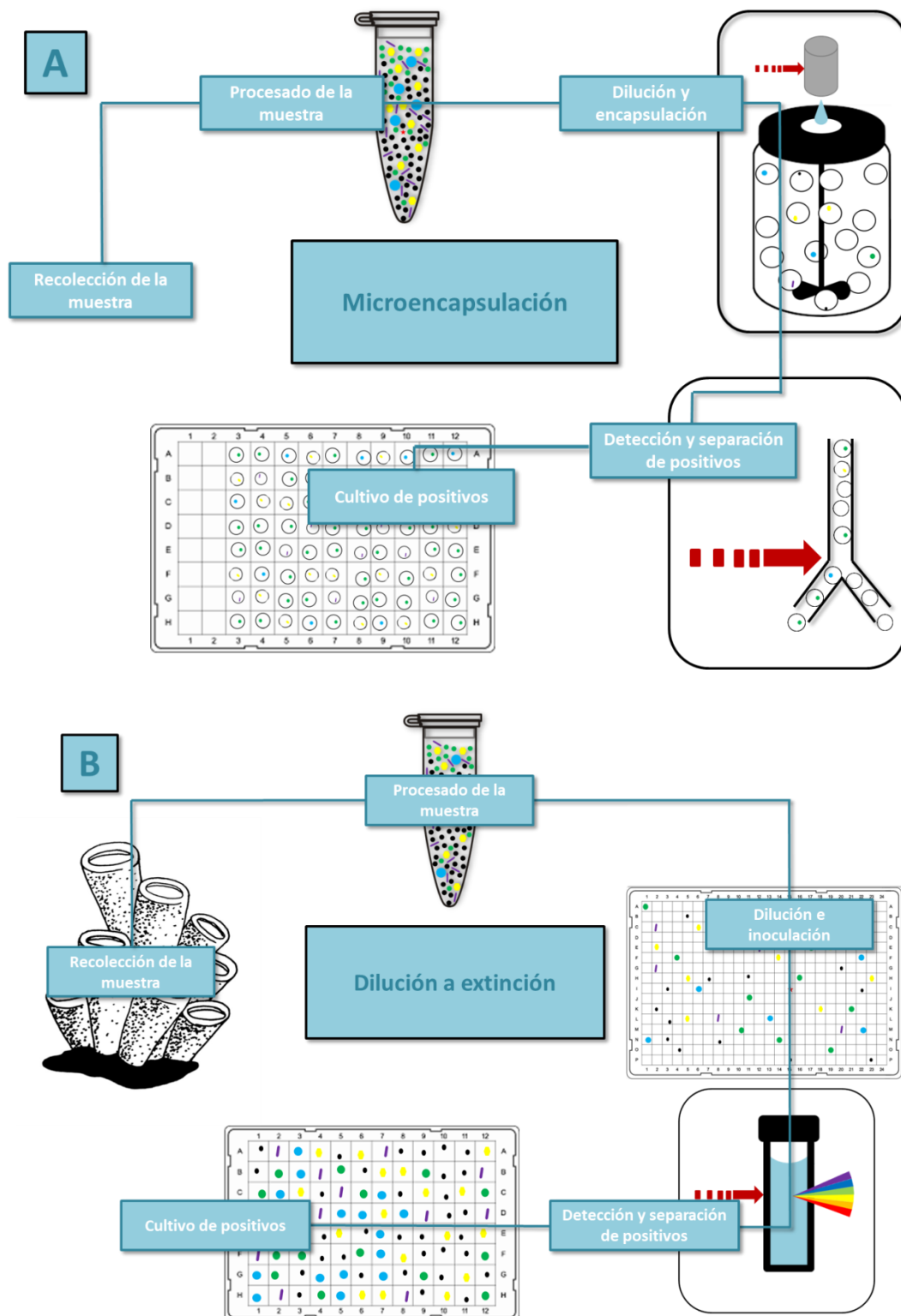


Figura 5.1: Diagrama comparativo de los protocolos de aislamiento mediante microencapsulación (A) y dilución a extinción (B).

Esto, unido al empleo de medio líquido durante todo el proceso, a la relativa sencillez del instrumental necesario para su implementación y a la posibilidad de aumentar ilimitadamente la escala del aislamiento, determinó la elección de este sistema como la base para el nuevo protocolo.

Mediante una plataforma basada en el enfoque DTE, se busca aislar el mayor número de cepas posible en cada muestra con el menor consumo de recursos posible e incrementar de esta forma las probabilidades de llegar a las poblaciones menos abundantes. Para ello, se intenta sacar partido de uno de las mayores limitaciones que presentan las bacterias no filamentosas como fuente de compuestos antitumorales, el reducido número de cepas que presentan actividad citotóxica. El protocolo de aislamiento desarrollado, sitúa el ensayo de actividad antitumoral inmediatamente después de la fermentación inicial, descartando todos los cultivos que no presentan actividad antitumoral (>98%) lo antes posible en el proceso y evitando de esta forma el consumo de recursos en pasos posteriores.

5.3 Oligotrofismo vs copiotrofismo

El aislamiento mediante DTE ha sido ampliamente aplicado al cultivo de bacterias oligotróficas (Yang, Kang and Cho, 2016), es decir, bacterias adaptadas a entornos pobres en nutrientes y que ven inhibida su multiplicación por la abundancia de estos, especialmente fuentes de carbono y nitrógeno. Grupos bacterianos ubicuos o muy abundantes en ecosistemas marinos, como el clado SAR11 entre otros, han sido aislados por vez primera mediante este sistema (Rappé et al., 2002, Giovannoni, 2017). Sin embargo, algunas características de su biología y composición genética las hace menos interesantes en la búsqueda de potenciales metabolitos con actividad antitumoral. Aspectos como un tamaño reducido del genoma son muy comunes en este tipo de organismos y están relacionados generalmente con una menor capacidad biosintética y, por lo tanto, con una menor probabilidad de que puedan producir compuestos de interés (Overmann, Abt and Sikorski, 2017). Además, los cultivos oligotróficos presentan un crecimiento extremadamente lento (Kirchman, 2016), con tiempos de generación por encima de las 30 horas (Overmann, Abt and Sikorski, 2017), lo que es difícilmente compatible con la síntesis de compuestos en una cantidad detectable o con un programa de cribado masivo.

Los principales géneros conocidos de bacterias marinas no filamentosas productoras de compuestos antitumorales pueden definirse como copiotrofos, término que alude a su predilección por medios de cultivo con concentraciones de nutrientes mucho más elevadas de las que encontrarían en su entorno natural (Koch, 2001). Por regla general, se caracterizan por contar con genomas mayores, con abundantes agrupaciones génicas para la síntesis de metabolitos secundarios y por un rápido crecimiento hasta concentraciones celulares muy elevadas (Overmann, Abt and Sikorski, 2017) que favorecería la detección de los posibles compuestos de interés. Por ejemplo, géneros como *Pseudomonas*, *Vibrio* o *Bacillus*, siguen aportando nuevos compuestos cada año (Bhatnagar and Kim, 2010; Mansson, Gram and Larsen, 2011; Mondol, Shin and Islam, 2013).

Hasta la fecha, existen pocas publicaciones que describan el uso del DTE para el aislamiento de este tipo de microorganismos (Hoefman *et al.*, 2012) y ninguna con la finalidad de obtener compuestos antitumorales. Por ello, el presente trabajo intenta optimizar y adaptar este sistema pensado principalmente para el aislamiento de bacterias oligotrofas y probar su utilidad para el aislamiento de copiotrofos con el fin último de descubrir nuevos productores de compuestos antitumorales.

5.4 Desarrollo de la plataforma

5.4.1 Optimización del cálculo de dilución

La reproducibilidad en la dilución se estudió extrapolando los valores de crecimiento en medio sólido del homogeneizado filtrado. Como se refleja en la **Figura 2.6**, el filtrado de la muestra mejora sustancialmente la reproducibilidad. Esto no solo facilita el cálculo de dilución, sino que además permitió reducir el número de réplicas necesarias para que el dato sea fiable a solamente 3.

Es de resaltar también la influencia de la densidad de UFC/placa en medio sólido, observándose para la muestra ANN-17-096L una reducción de las UFC/placa observadas respecto de las esperadas en las réplicas sembradas con 10 μ L y una reducción de la reproducibilidad en las de 5 y 10 μ L. Es decir, que con valores de UFC/placa Petri superiores a 200, la alta densidad biológica de la muestra puede llevar a errores de cálculo debido a fenómenos de inhibición o competencia. Además, la

pérdida de reproducibilidad a partir de 5 μL , (**Figura 2.8**) respalda la selección de réplicas con menos de 100 UFC/placa para los cálculos de dilución.

Una vez ajustada la reproducibilidad, fue necesario optimizar el cálculo de dilución para lograr cultivos morfológicamente puros. Esto se lleva a cabo generalmente mediante sucesivas siembras para aislamiento en placa de Petri hasta poder incorporar la nueva cepa al proceso. Este es un paso tedioso y generalmente limitante que supone dedicar un gran esfuerzo a cepas sin interés. Con el método de DTE aquí desarrollado se minimiza este problema al garantizar un número reducido de cultivos mixtos desde el primer aislamiento, evitando de esta forma los pasos de reaislamiento.

Otros protocolos de aislamiento mediante DTE publicados (Stingl *et al.*, 2008; Yang, Kang and Cho, 2016), asumen generalmente un elevado número de cultivos mixtos o un crecimiento muy deficiente dependiendo de la muestra, lo que reduce enormemente el rendimiento del método. En este caso, se decidió trabajar en profundidad con la muestra ANN-17-096L y explorar la posibilidad de extrapolar los recuentos de UFC obtenidos en medio sólido para realizar la dilución correcta. Aunque el número de UFC por placa microtiter fue finalmente inferior al esperado (57.64 UFC/placa observadas frente a 80 UFCs/placa esperadas) esto está justificado por la reducción del tiempo de incubación aplicado para preservar la viabilidad de las cepas de crecimiento rápido. Atendiendo a las curvas de aparición de UFC en las placas que se representan en la **figura 2.13**, la reducción del tiempo de incubación de 9 a 6 días supuso una reducción de hasta un 30% en el número de cultivos crecidos obtenidos, con lo que el número final de UFC por placa se habría situado muy próximo a 80, de haber mantenido los tiempos de incubación inicialmente establecidos. Se debe tener en cuenta, además, que la obtención de un número inferior a los 80 esperados reduciría el rendimiento del método, pero disminuiría también el porcentaje de pocillos doblemente inoculados. Buscando este equilibrio entre el rendimiento del método y la obtención de cultivos puros, se optó tras la prueba de concepto por mantener un sistema de cálculo dirigido a la obtención de un número de UFC por placa de 80 o inferior, lo que supondría un porcentaje teórico de pocillos mixtos igual o inferior al 5% del total.

Más adelante se evaluó este parámetro con otras 70 muestras, las cuales constituían una representación del tipo de muestras que se procesan de forma rutinaria en nuestros laboratorios. Para estas muestras el valor medio de UFC/placa obtenido fue de 60, muy próximo a las 57.64 UFC/placa obtenidos en el aislamiento de la muestra ANN-17-096L. Se observó de esta forma cómo un 70% de las muestras se agrupaban

en torno al valor medio de distribución de cepas crecidas (**Figura 4.6**), respaldando la validez del sistema de cálculo de dilución para aislamiento DTE en base a los recuentos previos en medio sólido solventando el problema de la variabilidad entre muestras.

A pesar del hecho de obtener un valor medio de UFCs/placa un 25% inferior al esperado, es importante resaltar que un 25% de las muestras presentan un valor de UFCs/placa de entre 80 y 100. El cálculo de probabilidad para los valores próximos a 100 sitúa el porcentaje de cultivos doblemente inoculados en alrededor de un 6%, sin embargo, ese valor subiría hasta un 9,6% si el número de UFC/placa fuese de 120. Por lo tanto, para corregir el deficiente crecimiento obtenido en el 25% de muestras con un valor de UFC/placa inferior a 40, habría que asumir un elevado incremento de los cultivos mixtos en las muestras con una mayor densidad biológica, pudiendo doblar el porcentaje teóricamente obtenido hasta ahora. Se debe valorar para futuros aislamientos si es asumible un porcentaje de cultivos mixtos de alrededor del 10 % en un 25% de las muestras en aras de profundizar el aislamiento del 25% que presentan un crecimiento más limitado.

5.4.2 Incremento del rendimiento

La utilización del formato microtiter de 384 pocillos para microfermentaciones bacterianas ha sido descrita previamente para cultivos de organismos ya conocidos, buscando por ejemplo mutantes minoritarios mediante técnicas de fluorescencia (Karsi *et al.*, 2009). Sin embargo, en el caso del aislamiento de muestras complejas, el formato empleado generalmente es el de placa microtiter de 96 pocillos con fermentaciones de hasta 150 μ L (Hoefman *et al.*, 2012). En el presente proyecto se fue un paso más allá buscando un incremento del rendimiento del método mediante el empleo de placas microtiter de 384 pocillos, multiplicando por 4 el número de microcultivos por placa. Este cambio de formato obligó a realizar fermentaciones de 50 μ L, debido a las características físico químicas de los medios acuosos empleados, esto supuso un desafío en términos de intercambio gaseoso y evaporación.

El sellado de las placas para evitar una evaporación excesiva demostró ser totalmente efectivo, reduciendo al mínimo la pérdida de volumen incluso en los pocillos más exteriores y sin observarse una reducción significativa en el número de UFC/placa en fermentaciones para aislamiento en paralelo. Respecto a la oxigenación de los cultivos, se evaluaron distintas velocidades de agitación (0, 280, 400, y 900 rpm) para

determinar la viabilidad de los cultivos, observándose una drástica disminución de la misma en las fermentaciones estáticas comparándolas con cualquiera de las fermentaciones en agitación. Es de resaltar que el efecto de la agitación sobre la aireación de los cultivos a volúmenes tan pequeños es considerada generalmente residual (Duetz *et al.*, 2000) y en este trabajo se demostró que para la muestra ANN-17-096L la agitación fue un factor crucial para la viabilidad de más de un 60 % de los cultivos aislados (**Figura 2.12**). La incorporación de la agitación (280 rpm) al protocolo final ofreció similares resultados en las demás muestras procesadas, pero serían deseables estudios comparativos más amplios para afianzar esta conclusión.

Para fijar los tiempos de incubación para aislamiento con el protocolo de DTE, se combinaron dos factores, el ritmo de aparición de nuevas UFC en las placas de aislamiento y la viabilidad de dichos cultivos una vez inoculados en medio de cultivo fresco en función del tiempo de incubación para aislamiento. Como se refleja en las **Figuras 2.12 y 2.13**, el mejor tiempo de fermentación para cada 1 de los factores fue distinto por lo que fue necesario hallar un punto común que optimizase el rendimiento del protocolo sin comprometer su eficacia. Los datos de aislamiento obtenidos con las 71 muestras trabajadas mostraron resultados de crecimiento para aislamiento similares a los de la muestra ANN-17-096L y viabilidades en el pase a inóculo superiores al 90% por lo que se mantuvieron los tiempos de incubación para aislamiento durante toda la experimentación. Como la variabilidad en las muestras se observó que podría afectar a este factor resultaría interesante un estudio más amplio en el futuro.

5.6 Aislamiento de un productor de labrenzina como prueba de concepto de la plataforma de aislamiento

5.6.1 Profundidad de aislamiento

A pesar de la amplia distribución de la familia de las pederinas entre distintos grupos de organismos tan dispares como pueden ser insectos y esponjas marinas, el caso de la labrenzina resulta relevante por haber sido el primer análogo de pederina aislado de una bacteria de vida libre. La selección de la muestra ANN-17-096L para la prueba de concepto vino determinada tanto por lo novedoso del compuesto, como por tratarse de una esponja marina, característica que la hace idónea para una prueba de

concepto al ser los poríferos el tipo de muestra más común en los aislamientos realizados en PharmaMar.

Aparte de cumplir el objetivo principal que supuso el aislamiento de un productor de labrenzina con la nueva plataforma, el ensayo aportó valiosa información sobre el potencial del método y sus posibles aplicaciones. El hecho de haber logrado dos cepas genéticamente diferentes productoras del compuesto y que a su vez sean distintas a la aislada en medio sólido resulta especialmente relevante, ya que pone de manifiesto la diversidad genética que puede estar contenida en una muestra, la importancia de la profundidad del aislamiento en el éxito de un programa de cribado y la complementariedad de este método de aislamiento respecto al aislamiento clásico en medio sólido.

El ensayo ha demostrado que, al aislar todas las cepas sin atender a criterios de selección, (como ocurre con la selección *de visu* por morfología que generalmente se aplica en el aislamiento en medio sólido) se amplía la diversidad (tanto taxonómica como genética) de las cepas procesadas. El aislamiento de una tercera cepa con actividad antitumoral (ANN-17-096L-003) morfológicamente similar pero perteneciente a una especie distinta (*Labrenzia aggregata*) del mismo género y productora de sesbanimidias es una prueba de ello. Esto se llevó a cabo a costa de elevar enormemente el número de cepas repetidas y multiplicar los ensayos de cribado, pero se compensa a su vez gracias a la miniaturización y a la automatización, así como por el descarte temprano de las cepas sin interés.

Respecto a la complementariedad de los métodos de aislamiento, resulta curioso el hecho de que la cepa aislada previamente en medio sólido no se encuentre entre las obtenidas mediante aislamiento DTE, aún más cuando una de las cepas fue la responsable de hasta 20 de los 24 cultivos con labrenzina detectados (**Figura 3.4**). Esto parece indicar que distintas cepas de un mismo género pueden tener predilección por uno u otro método de aislamiento, reforzando la idea de que no existe un protocolo universal de aislamiento y que la aplicación de distintos enfoques a la misma muestra conduce al aislamiento de una diversidad más amplia.

5.6.2 Ensayos de cuantificación de labrenzina

Las pruebas de cuantificación de labrenzina en el caldo de fermentación mostraron diferencias entre las distintas cepas (**Figura 3.4**). Las fermentaciones de la cepa ANN-17-096-007 contenían una mayor cantidad de compuesto (**Figuras 3.8 y 3.9**) que los de las otras dos cepas productoras aisladas de la misma muestra, ANN-17-096-035 (aislamiento en medio sólido) y ANN-17-096L-002 (aislamiento DTE), respaldando realizar el cribado de todas las cepas aisladas a partir de una muestra para llegar no solamente a una mayor biodiversidad, sino lograr también una mayor concentración de los compuestos, facilitando la detección y elucidación de los mismos.

5.7 Aislamientos en paralelo, medio sólido vs DTE

Como se comenta en la introducción de este trabajo, la nueva plataforma no busca ser una alternativa al aislamiento en medio sólido sino un método complementario que permita abarcar una mayor diversidad e incrementar las probabilidades de éxito en la búsqueda de nuevos compuestos antitumorales. Las muestras evaluadas mostraron unos resultados comparativos relevantes. Prácticamente en todas las muestras se ha aislado un mayor número de cepas con actividad antitumoral mediante DTE (**Tabla 4.2**). Esto era esperable debido al número mucho mayor de aislados que se procesa mediante ese protocolo, sin embargo, son los datos de diversidad biológica y química los que permiten evaluar la complementariedad de ambos métodos.

5.7.1 Biodiversidad

En la tabla de la **Tabla 4.3** se listan hasta 12 géneros de bacterias con actividad antitumoral aislados de las siete muestras, 5 comunes a ambos protocolos, 4 exclusivos de aislamiento DTE y otros 3 aislados solamente en medio sólido. Atendiendo a los géneros exclusivos del protocolo DTE, resulta interesante que tres de ellos (*Microbulbifer*, *Pseudovibrio* y *Ruegeria*) fuesen aislados en dos o más muestras. Esto parece indicar que algunos grupos productores de compuestos con actividad antitumoral se ven favorecidos por el aislamiento en medio líquido o pasan desapercibidos en el

aislamiento en placa de Petri al no realizar el cribado de todas colonias obtenidas, ya que se trata de géneros aislados sin dificultad a partir de medio sólido con anterioridad.

Respecto al representante del género *Serratia* aislado solamente mediante DTE, es curioso que no se haya detectado su presencia en el aislamiento en medio sólido a pesar del característico color rosado que presentan sus colonias debido a la síntesis de prodigiosinas, por lo que el mayor número de aislados que se pueden procesar mediante DTE pudo jugar un papel fundamental en este caso, puesto que también se han aislado cepas de este grupo en medio sólido con anterioridad.

Los géneros *Tropicibacter* y *Vibrio*, aislados solamente en medio sólido en este grupo de muestras, fueron posteriormente aislados en otras mediante DTE. Sin embargo, el género *Stappia*, no ha sido aislado ni en estas muestras en paralelo ni en las demás por lo que serían necesarios más ensayos sobre muestras conocidas para confirmar la imposibilidad de cultivarlo mediante aislamiento DTE, ya que se trata de un grupo cuyas cepas activas generalmente poco abundantes.

Por último, destacar qué entre los géneros comunes a ambos métodos, *Aquimarina*, *Chryseobacterium* y *Enterovibrio* son grupos poco asociados con la producción de compuestos antitumorales. De hecho, las cepas aisladas de *Aquimarina* y *Chryseobacterium* son productoras de dos familias de compuestos elucidados recientemente en Pharmamar y pendientes de publicación, mientras que las de *Enterovibrio* continúan en proceso de escalado para el aislamiento e identificación del compuesto responsable de la actividad citotóxica.

5.7.2 Diversidad química

Respecto a la diversidad química obtenida (**Tabla 4.4**), parece suceder lo mismo que con la diversidad biológica. Salvo algunos grupos de compuestos detectados solamente con uno de los protocolos, la mayoría son coincidentes, pero con una difusión de algunos de ellos mayor con el protocolo DTE. Destaca la labrenzina, con productores aislados mediante DTE en 3 de las 7 muestras. Una vez más la morfología poco característica que presenta el género *Labrenzia* podría favorecer que las cepas pasen desapercibidas al realizar un aislamiento basado en criterios morfológicos.

Con estos datos se puede afirmar que ambos métodos son apropiados para la mayoría de los géneros y compuestos presentes en las muestras y que la mayor

profundidad de aislamiento lograda mediante DTE parece generalmente relacionada con el mayor número de UFC que permite testar este sistema.

5.8 Resultados globales de aislamiento

5.8.1 Medio sólido vs medio líquido. Densidad de población aislada

La siembra en medio sólido para el cálculo de dilución confirmó lo que ya se pudo apreciar en la prueba de concepto con la muestra ANN-17-096L, la densidad de UFC/ μ L obtenida es mucho mayor en medio líquido que en sólido. El registro de este dato para las 71 muestras analizadas (**Figura 4.6**) muestra un mayor número de UFC/ μ L en medio líquido en un 72% de las muestras, lo que permite afirmar que el aislamiento DTE obtiene mejores resultados en este aspecto que el aislamiento en placa de Petri. Sin embargo, serán necesarios otros estudios para comprobar que el incremento en la viabilidad bacteriana se ve reflejado también en términos de biodiversidad y no solamente en el número de UFC/ μ L.

5.8.2 Abundancia de bacterias no filamentosas con actividad antitumoral en muestras marinas

Una de las premisas de partida que permitían el desarrollo de este proyecto era el reducido porcentaje de cepas productoras de compuestos antitumorales observado en el cribado de bacterias no filamentosas. Teniendo en cuenta el alto grado de repetición esperado para un aislamiento DTE, entraba dentro de lo posible que alguno de los géneros activos más comunes como por ejemplo *Bacillus* o *Microbulbifer* fuesen excesivamente abundantes en las muestras, elevando la ratio de UFC activas e invalidando el cribado temprano como forma de optimización y por lo tanto la plataforma en sí misma. Tras 71 muestras diversas aisladas, dicho porcentaje se sitúa de media en el 1.1% en las condiciones ensayadas, avalando de esta forma la optimización que aporta el cribado temprano mediante el test de actividad antitumoral y el aislamiento masivo como estrategia.

Curiosamente, este porcentaje de cultivos activos se mantiene bastante estable entre los distintos tipos de muestra (**Figura 4.9**), destacando solamente el Phylum

Chordata, aunque tras aplicar el índice de biodiversidad de Shannon-Weaver (**Figura 4.10**) este mayor porcentaje no se refleja en una mayor biodiversidad.

5.8.3 De-replicación química o de-replicación molecular

Como se describe en la **Figura 2.4**, tras el ensayo de actividad antitumoral, los cultivos activos pasan por el proceso de de-replicación. Las muestras ensayadas han permitido definir y optimizar este paso estableciendo en qué casos se procede en primer lugar a la de-replicación química y en cuales a la de-replicación molecular mediante la obtención de la huella genómica. De forma general, el número de extractos activos en las muestras es muy reducido y se opta por realizar la de-replicación química en primer lugar. De esta forma, compuestos fácilmente detectables por HPLC y con una amplia distribución en las muestras como pueden ser lichenisinas o prodigiosinas han permitido descartar las cepas que los sintetizan. Sin embargo, de manera más puntual, algunas muestras presentan un número de extractos activos mucho más elevado. En esos casos se ha optado por realizar en primer lugar la de-replicación molecular mediante la huella genómica para optimizar recursos y agilizar el proceso ya que la derreplicación química de un número elevado de muestras podría suponer un cuello de botella para la plataforma mientras que el análisis de la huella genómica se ha realizado con un equipo de electroforesis capilar de alto rendimiento. Tal como sucede en la muestra ANN-17-096L, en la que los 28 aislados activos pertenecían a solamente 3 cepas distintas (**Figura 3.4**), un elevado número de extractos activos en la misma muestra no parece ir unido a una diversidad genética proporcionalmente mayor, constituyendo el ejemplo más claro de ello la muestra ANT-18-0333L que presenta un porcentaje de extractos activos muy elevado donde el 84% de ellos provienen de una única cepa de *Pseudoalteromonas piscicida*.

5.8.4 Diversidad química

Pese al limitado número de muestras procesadas y al reducido porcentaje del total de organismos aislados que suponen las bacterias no filamentosas con actividad antitumoral, la nueva plataforma ha logrado detectar 11 familias de compuestos (**Figura 5.1**), la mitad de ellos en más de una muestra y algunos como labrenzina, lichenisinas

o prodigiosinas en varios. Este trabajo deja patente la importancia de realizar un aislamiento lo más masivo posible de cada muestra para llegar a aquellos organismos de interés más minoritarios. La mitad de los compuestos detectados han sido aislados de una sola muestra y en algún caso de un solo extracto activo, lo que muestra la baja proporción en la que se encuentran y la importancia de incrementar el número de aislados por muestra en lo posible.

Compuesto	Nº de cepas aisladas	Nº de muestras de origen
Alteramidas y bromoalteramidas	2	2
Derivados de quinolina y tubermicina	1	1
Estreptocidinas	1	1
Labrenzina	12	8
Lichenisinas*	-	5
Prodigiosinas y serratomolide	4	4
Pseudopironinas	1	1
Rhamnolípidos	2	2
Surfactinas y pumilacidinas*	1	1
Violaceína	1	1
Sesbanimidas	2	2

Tabla 5.1: Distribución de las familias de compuestos antitumorales detectados en las muestras.

* Los datos correspondientes a lichenisinas, surfactinas y pumilacidinas son incompletos al ser aislados estos compuestos principalmente a partir del género *Bacillus*.

5.8.5 Hitos relevantes en los aislamientos DTE realizados

Resulta destacable el caso de la labrenzina, ya que se trata de un compuesto con una actividad antitumoral muy potente ($IC_{50} > 10^{-8}$), y no habiendo sido descubierto hasta tiempos recientes, con el método de aislamiento por DTE propuesto se ha conseguido aislar en más de un 10% de las muestras. Dado que entre ellas encontramos representantes de distintos phyla e incluso sedimentos marinos, se puede afirmar que el compuesto se encuentra ampliamente distribuido en el océano y su detección está muy condicionada por el método empleado, siendo la plataforma desarrollada en este trabajo altamente eficiente en el aislamiento de organismos productores de labrenzina, llegando incluso a aislar por vez primera una cepa de *Labrenzia alba* productora del compuesto.

Además de este hecho novedoso, el análisis taxonómico de un alto número de cepas, permitió descubrir, por un lado, análogos de lichenisinas en el caldo de fermentación de una cepa del género *Mesoflavibacter*, siendo este tipo de compuestos característicos de Firmicutes y no estando reportada previamente su síntesis en Bacteroidetes. Por otro, el aislamiento de una *Ruegeria* productora de pseudopironinas, una familia de compuestos característica de *Pseudomonas* que no había sido detectado con anterioridad en una Alphaproteobacteria.

Además, se han aislado cepas con actividad antitumoral de origen desconocido pertenecientes a 6 géneros distintos (*Acinetobacter*, *Enterovibrio*, *Ochrobactrum*, *Ruegeria*, *Microbulbifer* y *Shigella*), siguiendo estas en proceso de escalado para la elucidación estructural de los compuestos responsables de la actividad. Resulta relevante así mismo que entre las cepas de 4 de los 6 géneros que siguen en proceso, existen representantes cuya secuencia 16S presenta un grado de identidad inferior al 97,5%, por lo que podrían constituir nuevos géneros, lo que incrementa las probabilidades de que los compuestos sintetizados sean novedosos.

Estos hallazgos procedentes de un número de muestras tan reducido refuerzan una vez más la idea del aislamiento masivo en general y de la utilidad del método desarrollado en particular para este fin.

CONCLUSIONES

- Se ha desarrollado con éxito una plataforma de aislamiento y cribado basada en el método de dilución a extinción (DTE) para el cribado de bacterias productoras de compuestos con actividad antitumoral implementando y testando todos los subprotocolos necesarios. Este protocolo de aislamiento supone la primera aproximación a la búsqueda de compuestos antitumorales mediante la tecnología DTE y una herramienta complementaria a los demás enfoques de aislamiento disponibles.
- Entre las mejoras respecto a otros métodos basados en DTE, destaca el novedoso sistema de ajuste de la dilución inicial basada en el cálculo de probabilidad y la microfermentación en placa microtiter de 384 pocillos. Estas mejoras han permitido incrementar respectivamente la versatilidad del método y su rendimiento.
- Mediante el nuevo método de aislamiento y cribado, no solamente se ha logrado el aislamiento de una cepa de *Labrenzia alexandrii* productora de labrenzina en la prueba de concepto, sino que se ha detectado el compuesto en cepas provenientes de 8 muestras distintas no trabajadas previamente. Destaca entre ellas la cepa asignada taxonómicamente como *Labrenzia alba* y que relaciona por vez primera el compuesto labrenzina con esta especie.
- El aislamiento por vez primera de un Bacteroidete (asignado taxonómicamente como *Mesoflevibacter sabullitoris*) productor de lichenisinas, así como el aislamiento de cepas productoras de labrenzina en 8 de las 70 muestras analizadas (cuando dicho compuesto había rehuido su aislamiento hasta el año 2017), demuestran la elevada sensibilidad del método y su profundidad de aislamiento.
- La identificación de cepas activas pertenecientes a los géneros *Acinetobacter*, *Enterovibrio*, *Microbulbifer*, *Ochrobactrum*, *Pseudomonas*, *Ruegeria* y *Shigella* que no de-repican con compuestos conocidos y por lo tanto posibles productoras de compuestos novedosos, así como el aislamiento de hasta 9 cepas activas cuya identidad taxonómica para el fragmento 16s rRNA es inferior al 97.5% respaldan el funcionamiento de la plataforma y su empleo.

BIBLIOGRAFÍA

Abdel-Mawgoud, A. M., Lépine, F. and Déziel, E. (2010) 'Rhamnolipids: diversity of structures, microbial origins and roles.', *Applied microbiology and biotechnology*, 86(5), pp. 1323–1336. doi: 10.1007/s00253-010-2498-2.

Acebal, C. *et al.* (1998) 'Two marine *Agrobacterium* producers of sesbanimide antibiotics.', *The Journal of antibiotics*, 51(1), pp. 64–67. doi: 10.7164/antibiotics.51.64.

Alain, K. and Querellou, J. (2009) 'Cultivating the uncultured: Limits, advances and future challenges', *Extremophiles*, 13(4), pp. 583–594. doi: 10.1007/s00792-009-0261-3.

Alves, C. *et al.* (2018) 'From marine origin to therapeutics: The antitumor potential of marine algae-derived compounds', *Frontiers in Pharmacology*, 9(AUG), pp. 1–24. doi: 10.3389/fphar.2018.00777.

Ameri, A. (2014) 'Marine Microbial Natural Products', *Jundishapur Journal of Natural Pharmaceutical Products*, 9(4), pp. 8–9. doi: 10.17795/jjnpp-24716.

Aminov, R. I. (2010) 'A brief history of the antibiotic era: lessons learned and challenges for the future.', *Frontiers in microbiology*, 1, p. 134. doi: 10.3389/fmicb.2010.00134.

Aprill, A. (2017) 'Marine Animal Microbiomes: Toward Understanding Host–Microbiome Interactions in a Changing Ocean', *Frontiers in Marine Science*, 4, p. 222. doi: 10.3389/fmars.2017.00222.

Baker, B. J., Appler, K. E. and Gong, X. (2021) 'New Microbial Biodiversity in Marine Sediments', *Annual review of marine science*, 13, pp. 161-175. doi: 10.1146/annurev-marine-032020-014552.

Ben-Dov, E., Kramarsky-Winter, E. and Kushmaro, A. (2009) 'An in situ method for cultivating microorganisms using a double encapsulation technique', *FEMS Microbiology Ecology*, 68(3), pp. 363–371. doi: 10.1111/j.1574-6941.2009.00682.x.

Benítez, X. *et al.* (no date) 'Detection of a pederin-like compound using a dilution-to-extinction-based platform for the isolation of marine bacteria in drug discovery strategies', *Microbial Biotechnology*, n/a(n/a). doi: <https://doi.org/10.1111/1751-7915.13679>.

Bentley, S. D. *et al.* (2002) 'Complete genome sequence of the model actinomycete *Streptomyces coelicolor* A3(2)', *Nature*, 417(6885), pp. 141–147. doi: [10.1038/417141a](https://doi.org/10.1038/417141a).

Bernardini, S. *et al.* (2018) 'Natural products for human health: an historical overview of the drug discovery approaches.', *Natural product research*, 32(16), pp. 1926–1950. doi: [10.1080/14786419.2017.1356838](https://doi.org/10.1080/14786419.2017.1356838).

Bertrand, S. *et al.* (2014) 'Metabolite induction via microorganism co-culture: A potential way to enhance chemical diversity for drug discovery', *Biotechnology Advances*, 32(6), pp. 1180–1204. doi: [10.1016/j.biotechadv.2014.03.001](https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2014.03.001).

Betts, J. I. and Baganz, F. (2006) 'Miniature bioreactors: current practices and future opportunities.', *Microbial cell factories*, 5, p. 21. doi: [10.1186/1475-2859-5-21](https://doi.org/10.1186/1475-2859-5-21).

Bharati, B. K. and Chatterji, D. (2013) 'Quorum sensing and pathogenesis: Role of small signalling molecules in bacterial persistence', *Current Science*, 105(5), pp. 643–656. <http://www.jstor.org/stable/24097936>

Bhatnagar, I. and Kim, S. K. (2010) 'Immense essence of excellence: Marine microbial bioactive compounds', *Marine Drugs*, 8(10), pp. 2673–2701. doi: [10.3390/md8102673](https://doi.org/10.3390/md8102673).

Blevins, S. M., Bronze, M. S. and Koch, R. (2010) 'International Journal of Infectious Diseases Robert Koch and the “ golden age ” of bacteriology', 14, pp. 744–751. doi: [10.1016/j.ijid.2009.12.003](https://doi.org/10.1016/j.ijid.2009.12.003).

Bonnet, M. *et al.* (2020) 'Bacterial culture through selective and non-selective conditions: the evolution of culture media in clinical microbiology.', *New microbes and new infections*, 34, p. 100622. doi: [10.1016/j.nmni.2019.100622](https://doi.org/10.1016/j.nmni.2019.100622).

- Bray, F. *et al.* (2018) 'Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries.', *CA: a cancer journal for clinicians*, 68(6), pp. 394–424. doi: 10.3322/caac.21492.
- Brinkmann, C. M., Marker, A. and Kurtböke, D. I. (2017) 'An overview on marine sponge-symbiotic bacteria as unexhausted sources for natural product discovery', *Diversity*, 9(4). doi: 10.3390/d9040040.
- Button, D. K. *et al.* (1993) 'Viability and isolation of marine bacteria by dilution culture: Theory, procedures, and initial results', *Applied and Environmental Microbiology*, 59(3), pp. 881–891.
- Carroll, A. R. *et al.* (2019) 'Marine natural products', *Natural Product Reports*, 36(1), pp. 122–173. doi: 10.1039/c8np00092a.
- Castro, D. J. *et al.* (2017) 'Blastomonas quesadae sp. Nov., isolated from a saline soil by dilution-to-extinction cultivation', *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 67(6), pp. 2001–2007. doi: 10.1099/ijsem.0.001902.
- Choi, S. Y. *et al.* (2015) 'Violacein: Properties and Production of a Versatile Bacterial Pigment', *BioMed Research International*. Edited by F. Marinelli, 2015, p. 465056. doi: 10.1155/2015/465056.
- Connon, S. A. and Givannoni, S. J. (2002) 'High-throughput methods for culturing microorganisms in very-low-nutrient media.', *Appl Environ Microbiol*, 68(8), pp. 3878–3885. doi: 10.1128/AEM.68.8.3878.
- Cooper, D. G. *et al.* (1981) 'Enhanced Production of Surfactin from *Bacillus subtilis* by Continuous Product Removal and Metal Cation Additions.', *Applied and environmental microbiology*, 42(3), pp. 408–412. doi: 10.1128/AEM.42.3.408-412.1981.
- Coronel-León, J. *et al.* (2016) 'Optimizing the production of the biosurfactant lichenysin and its application in biofilm control', *Journal of Applied Microbiology*, 120(1), pp. 99–111. doi: 10.1111/jam.12992.

- Cragg, G. M. and Pezzuto, J. M. (2016) 'Natural Products as a Vital Source for the Discovery of Cancer Chemotherapeutic and Chemopreventive Agents', *Medical Principles and Practice*, 25(2), pp. 41–59. doi: 10.1159/000443404.
- Craney, A., Ahmed, S. and Nodwell, J. (2013) 'Towards a new science of secondary metabolism', *Journal of Antibiotics*, 66(7), pp. 387–400. doi: 10.1038/ja.2013.25.
- Darshan, N. and Manonmani, H. K. (2015) 'Prodigiosin and its potential applications', *Journal of Food Science and Technology*, 52(9), pp. 5393–5407. doi: 10.1007/s13197-015-1740-4.
- Dias, D. A., Urban, S. and Roessner, U. (2012) 'A Historical overview of natural products in drug discovery', *Metabolites*, 2(2), pp. 303–336. doi: 10.3390/metabo2020303.
- Duetz, W. A. *et al.* (2000) 'Methods for intense aeration, growth, storage, and replication of bacterial strains in microtiter plates', *Applied and Environmental Microbiology*, 66(6), pp. 2641–2646. doi: 10.1128/AEM.66.6.2641-2646.2000.
- Editorial (2007) 'All natural Natural products research focuses on the chemical properties , biosynthesis and biological functions of secondary', *Nature chemical biology*, 3(7), p. 2007.
- Eun, Y.-J. *et al.* (2011) 'Encapsulating bacteria in agarose microparticles using microfluidics for high-throughput cell analysis and isolation.', *ACS chemical biology*, 6(3), pp. 260–266. doi: 10.1021/cb100336p.
- Falzone, L., Salomone, S. and Libra, M. (2018) 'Evolution of Cancer Pharmacological Treatments at the Turn of the Third Millennium', *Frontiers in Pharmacology*, 9, p. 1300. doi: 10.3389/fphar.2018.01300.
- Fan, Y. *et al.* (2018) 'New ansamycins from the deep-sea-derived bacterium ochrobactrum sp. OUCMDZ-2164', *Marine Drugs*, 16(8), pp. 1–9. doi: 10.3390/md16080282.

Felsenstein, J. (1985) 'Phylogenies and the Comparative Method', *The American Naturalist*, 125(1), pp. 1–15. Available at: <http://www.jstor.org/stable/2461605>.

Gebhardt, K., Pukall, R. and Fiedler, H. P. (2001) 'Streptocidins A-D, novel cyclic decapeptide antibiotics produced by *Streptomyces* sp. Tü 6071. I. Taxonomy, fermentation, isolation and biological activities.', *The Journal of antibiotics*, 54(5), pp. 428–433. doi: 10.7164/antibiotics.54.428.

Gould, K. (2016) 'Antibiotics: From prehistory to the present day', *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 71(3), pp. 572–575. doi: 10.1093/jac/dkv484.

Helfrich, E.J.N., Vogel, C.M., Ueoka, R. et al. Bipartite interactions, antibiotic production and biosynthetic potential of the *Arabidopsis* leaf microbiome. *Nat Microbiol* 3, 909–919 (2018). doi.org/10.1038/s41564-018-0200-0

Hoefman, S. et al. (2012) 'Miniaturized extinction culturing is the preferred strategy for rapid isolation of fast-growing methane-oxidizing bacteria', *Microbial Biotechnology*, 5(3), pp. 368–378. doi: 10.1111/j.1751-7915.2011.00314.x.

Hug, Laura A. et al. (2016) 'A new view of the tree of life', *Nature Microbiology*, 1(5), pp. 1–6. doi: 10.1038/nmicrobiol.2016.48.

Ingham, C. J. et al. (2007) 'The micro-Petri dish, a million-well growth chip for the culture and high-throughput screening of microorganisms.', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(46), pp. 18217–18222. doi: 10.1073/pnas.0701693104.

Ji, H.-F., Li, X.-J. and Zhang, H.-Y. (2009) 'Natural products and drug discovery. Can thousands of years of ancient medical knowledge lead us to new and powerful drug combinations in the fight against cancer and dementia?', *EMBO reports*, 10(3), pp. 194–200. doi: 10.1038/embor.2009.12.

Jiménez, C. (2018) 'Marine Natural Products in Medicinal Chemistry', *ACS Medicinal Chemistry Letters*, 9(10), pp. 959–961. doi: 10.1021/acsmchemlett.8b00368.

Jimenez, P. C. *et al.* (2020) 'Enriching cancer pharmacology with drugs of marine origin', *British Journal of Pharmacology*, 177(1), pp. 3–27. doi: 10.1111/bph.14876.

Jimenez, P. C., Wilke, D. V. and Costa-Lotufo, L. V. (2018) 'Marine drugs for cancer: Surfacing biotechnological innovations from the oceans', *Clinics*, 73, pp. 1–7. doi: 10.6061/clinics/2018/e482s.

Joint, I., Mühlhling, M. and Querellou, J. (2010a) 'Culturing marine bacteria - An essential prerequisite for biodiscovery: Minireview', *Microbial Biotechnology*, 3(5), pp. 564–575. doi: 10.1111/j.1751-7915.2010.00188.x.

Jung, D. *et al.* (2014) 'Application of a new cultivation technology, I-tip, for studying microbial diversity in freshwater sponges of Lake Baikal, Russia', *FEMS Microbiology Ecology*, 90(2), pp. 417–423. doi: 10.1111/1574-6941.12399.

Karsi, A. *et al.* (2009) 'High-throughput bioluminescence-based mutant screening strategy for identification of bacterial virulence genes.', *Applied and environmental microbiology*, 75(7), pp. 2166–2175. doi: 10.1128/AEM.02449-08.

Keller, M. and Zengler, K. (2004) 'Tapping into microbial diversity.', *Nature reviews. Microbiology*, 2(2), pp. 141–150. doi: 10.1038/nrmicro819.

Khalifa, S. A. M. *et al.* (2019) 'Marine Natural Products: A Source of Novel Anticancer Drugs.', *Marine drugs*, 17(9). doi: 10.3390/md17090491.

Kim, M. *et al.* (2014) 'Towards a taxonomic coherence between average nucleotide identity and 16S rRNA gene sequence similarity for species demarcation of prokaryotes', *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 64(Pt_2), pp. 346–351. doi: <https://doi.org/10.1099/ijs.0.059774-0>.

Kim, M. and Chun, J. (2014) 'Chapter 4 - 16S rRNA Gene-Based Identification of Bacteria and Archaea using the EzTaxon Server', in Goodfellow, M., Sutcliffe, I., and Chun, J. (eds) *New Approaches to Prokaryotic Systematics*. Academic Press (Methods in Microbiology), pp. 61–74. doi: <https://doi.org/10.1016/bs.mim.2014.08.001>.

Kirchman, D. L. (2016) 'Growth Rates of Microbes in the Oceans', *Annual Review of Marine Science*, 8(1), pp. 285–309. doi: 10.1146/annurev-marine-122414-033938.

Klein Jan, H. *et al.* (2017) 'Exploring the cultivable Ectocarpus microbiome', *Frontiers in Microbiology*, 8(DEC), pp. 1–13. doi: 10.3389/fmicb.2017.02456.

Koch, A. (2001) 'Oligotrophs versus copiotrophs', *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology*, 23, pp. 657–661. doi: 10.1002/bies.1091.

Kong, F., Singh, M. P. and Carter, G. T. (2005) 'Pseudopyronines A and B, α -pyrones produced by a marine *Pseudomonas* sp. F92S91, and evidence for the conversion of 4-hydroxy- α -pyrone to 3-furanone', *Journal of Natural Products*, 68(6), pp. 920–923. doi: 10.1021/np050038v.

Kumar, M. S. and Adki, K. M. (2018) 'Marine natural products for multi-targeted cancer treatment: A future insight', *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 105(February), pp. 233–245. doi: 10.1016/j.biopha.2018.05.142.

Larsen, A. K., Galmarini, C. M. and D'Incalci, M. (2016) 'Unique features of trabectedin mechanism of action.', *Cancer chemotherapy and pharmacology*, 77(4), pp. 663–671. doi: 10.1007/s00280-015-2918-1.

Lee, J. S. *et al.* (2011) 'Exceptional production of both prodigiosin and cycloprodigiosin as major metabolic constituents by a novel marine bacterium, *Zooshikella rubidus* S1-1.', *Applied and environmental microbiology*, 77(14), pp. 4967–4973. doi: 10.1128/AEM.01986-10.

Lewis, K. *et al.* (2010) 'Uncultured microorganisms as a source of secondary metabolites', *Journal of Antibiotics*, 63(8), pp. 468–476. doi: 10.1038/ja.2010.87.

Li, P. *et al.* (2017) 'Encapsulation of Autoinducer Sensing Reporter Bacteria in Reinforced Alginate-Based Microbeads.', *ACS applied materials & interfaces*, 9(27), pp. 22321–22331. doi: 10.1021/acsami.7b07166.

Liu, R., Li, X. and Lam, K. S. (2017) 'Combinatorial chemistry in drug discovery.', *Current opinion in chemical biology*, 38, pp. 117–126. doi: 10.1016/j.cbpa.2017.03.017.

Machado, H. *et al.* (2015) 'Genome mining reveals unlocked bioactive potential of marine Gram-negative bacteria', *BMC Genomics*, 16(1), pp. 1–12. doi: 10.1186/s12864-015-1365-z.

Mansson, M., Gram, L. and Larsen, T. O. (2011) 'Production of bioactive secondary metabolites by marine Vibrionaceae', *Marine Drugs*, 9(9), pp. 1440–1468. doi: 10.3390/md9091440.

Marchesi, J. R. *et al.* (1998) 'Marchesi JR 1998 Primer für 16S rRNA.pdf', 64(2), pp. 795–799.

Mohamed, R. (2013) 'Dilution-to-extinction culturing of SAR11 members and other marine bacteria from the Red Sea', (December).

Mondol, M. A. M., Shin, H. J. and Islam, M. T. (2013) 'Diversity of secondary metabolites from marine bacillus species: Chemistry and biological activity', *Marine Drugs*, 11(8), pp. 2846–2872. doi: 10.3390/md11082846.

Montaser, R. and Luesch, H. (2011) 'Marine natural products: A new wave of drugs?', *Future Medicinal Chemistry*, 3(12), pp. 1475–1489. doi: 10.4155/fmc.11.118.

Moreno-Pino, M. *et al.* (2020) 'Characterizing the microbiomes of Antarctic sponges: a functional metagenomic approach', *Scientific Reports*, 10(1), p. 645. doi: 10.1038/s41598-020-57464-2.

Muñoz-Alonso, M. J. *et al.* (2009) 'The mechanism of action of plitidepsin.', *Current opinion in investigational drugs (London, England : 2000)*, 10(6), pp. 536–542.

Narquizian, R. and Kocienski, P. J. (2000) 'The Pederin Family of Antitumor Agents: Structures, Synthesis and Biological Activity', in Mulzer, J. and Bohlmann, R. (eds) *The Role of Natural Products in Drug Discovery*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin

Heidelberg, pp. 25–56.

Naruse, N. *et al.* (1990) 'Pumilacidin, a complex of new antiviral antibiotics. Production, isolation, chemical properties, structure and biological activity.', *The Journal of antibiotics*, 43(3), pp. 267–280. doi: 10.7164/antibiotics.43.267.

Naughton, L. M. *et al.* (2017) 'Identification of Secondary Metabolite Gene Clusters in the *Pseudovibrio* Genus Reveals Encouraging Biosynthetic Potential toward the Production of Novel Bioactive Compounds.', *Frontiers in microbiology*, 8, p. 1494. doi: 10.3389/fmicb.2017.01494.

Newman, D. J. and Cragg, G. M. (2020) 'Natural Products as Sources of New Drugs over the Nearly Four Decades from 01/1981 to 09/2019', *Journal of Natural Products*, 83, pp. 770–803. doi: 10.1021/acs.jnatprod.9b01285.

Nichols, D. *et al.* (2010) 'Use of lchip for High-Throughput &em>In Situ&/em> Cultivation of "Uncultivable" Microbial Species', *Applied and Environmental Microbiology*, 76(8), pp. 2445–2450. doi: 10.1128/AEM.01754-09.

Nigam, M. *et al.* (2019) 'Marine anticancer drugs and their relevant targets: a treasure from the ocean', *DARU, Journal of Pharmaceutical Sciences*, 27(1), pp. 491–515. doi: 10.1007/s40199-019-00273-4.

Okada, B. K. and Seyedsayamdost, M. R. (2017) 'Antibiotic dialogues: Induction of silent biosynthetic gene clusters by exogenous small molecules', *FEMS Microbiology Reviews*, 41(1), pp. 19–33. doi: 10.1093/femsre/fuw035.

Overmann, J. (2013) 'Principles of Enrichment, Isolation, Cultivation, and Preservation of Prokaryotes', in Rosenberg, E. *et al.* (eds) *The Prokaryotes: Prokaryotic Biology and Symbiotic Associations*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, pp. 149–207. doi: 10.1007/978-3-642-30194-0_7.

Overmann, J., Abt, B. and Sikorski, J. (2017) 'Present and Future of Culturing Bacteria', *Annual Review of Microbiology*, 71(1), pp. 711–730. doi: 10.1146/annurev-

micro-090816-093449.

Pan, R. *et al.* (2019) 'Exploring Structural Diversity of Microbe Secondary Metabolites Using OSMAC Strategy: A Literature Review', *Frontiers in Microbiology*, 10, p. 294. doi: 10.3389/fmicb.2019.00294.

Pettit, R. K. (2011) 'Small-molecule elicitation of microbial secondary metabolites', *Microbial Biotechnology*, 4(4), pp. 471–478. doi: 10.1111/j.1751-7915.2010.00196.x.

Piddock, L. J. V (2015) 'Teixobactin, the first of a new class of antibiotics discovered by iChip technology?', *The Journal of antimicrobial chemotherapy*, 70(10), pp. 2679–2680. doi: 10.1093/jac/dkv175.

Piel, J. (2002) 'A polyketide synthase-peptide synthetase gene cluster from an uncultured bacterial symbiont of *Paederus* beetles', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(22), pp. 14002–14007. doi: 10.1073/pnas.222481399.

Piel, J. (2009) 'Metabolites from symbiotic bacteria', *Natural Product Reports*, 26(3), pp. 338–362. doi: 10.1039/b703499g.

Poli, A. *et al.* (2017) 'Microbial Diversity in Extreme Marine Habitats and Their Biomolecules.', *Microorganisms*, 5(2). doi: 10.3390/microorganisms5020025.

Posada, D. and Crandall, K. A. (1998) 'MODELTEST: testing the model of DNA substitution.', *Bioinformatics (Oxford, England)*, 14(9), pp. 817–818. doi: 10.1093/bioinformatics/14.9.817.

Procópio, R. E. de L. *et al.* (2012) 'Antibiotics produced by *Streptomyces*.', *The Brazilian journal of infectious diseases: an official publication of the Brazilian Society of Infectious Diseases*, 16(5), pp. 466–471. doi: 10.1016/j.bjid.2012.08.014.

Pulschen, A. A. *et al.* (2017) 'Isolation of Uncultured Bacteria from Antarctica Using Long Incubation Periods and Low Nutritional Media', *Frontiers in Microbiology*, 8, p.

1346. doi: 10.3389/fmicb.2017.01346.

Pye, C. R. *et al.* (2017) 'Retrospective analysis of natural products provides insights for future discovery trends.', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 114(22), pp. 5601–5606. doi: 10.1073/pnas.1614680114.

Rappé, M. S. *et al.* (2002) 'Cultivation of the ubiquitous SAR11 marine bacterioplankton clade', *Nature*, 418(6898), pp. 630–633. doi: 10.1038/nature00917.

Rath, C. M. *et al.* (2011) 'Meta-omic characterization of the marine invertebrate microbial consortium that produces the chemotherapeutic natural product ET-743', *ACS Chemical Biology*, 6(11), pp. 1244–1256. doi: 10.1021/cb200244t.

Rekadwad, B. N. and Khobragade, C. N. (2017) 'Morphotypes and pigment profiles of halophilic bacteria: Practical data useful for novelty, taxonomic categorization and for describing novel species or new taxa.', *Data in brief*, 13, pp. 609–619. doi: 10.1016/j.dib.2017.06.039.

Richter, M. and Rosselló-Móra, R. (2009) 'Shifting the genomic gold standard for the prokaryotic species definition', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(45), pp. 19126–19131. doi: 10.1073/pnas.0906412106.

Romano, G. *et al.* (2017) 'Marine microorganisms as a promising and sustainable source of bioactive molecules', *Marine Environmental Research*, 128, pp. 58–69. doi: 10.1016/j.marenvres.2016.05.002.

Saitou, N. and Nei, M. (1987) 'The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees.', *Molecular Biology and Evolution*, 4(4), pp. 406–425. doi: 10.1093/oxfordjournals.molbev.a040454.

Sansinenea, E. and Ortiz, A. (2011) 'Secondary metabolites of soil *Bacillus* spp', *Biotechnology letters*, 33, pp. 1523–1538. doi: 10.1007/s10529-011-0617-5.

Sarmin, N. I. M. *et al.* (2013) 'Streptomyces kebangsaanensis sp. nov., an endophytic

actinomycete isolated from an ethnomedicinal plant, which produces phenazine-1-carboxylic acid.', *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 63(Pt 10), pp. 3733–3738. doi: 10.1099/ijs.0.047878-0.

Schleissner, C. *et al.* (2017) 'Bacterial Production of a Pederin Analogue by a Free-Living Marine Alphaproteobacterium', *Journal of Natural Products*, 80(7), pp. 2170–2173. doi: 10.1021/acs.jnatprod.7b00408.

Schut, F. *et al.* (1993) 'Isolation of Typical Marine Bacteria by Dilution Culture: Growth, Maintenance, and Characteristics of Isolates under Laboratory Conditions.', *Applied and environmental microbiology*, 59(7), pp. 2150–60. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16348992> (Accessed: 3 December 2018).

Shanks, R. M. Q. *et al.* (2012) 'Serratamolide is a hemolytic factor produced by *Serratia marcescens*', *PLoS ONE*, 7(5), pp. 1–8. doi: 10.1371/journal.pone.0036398.

Sharifi-rad, J., Ozleyen, A. and Tumer, T. B. (2019) *Natural Products and Synthetic Analogs as a Source of Antitumor Drugs*. *Biomolecules* 2019, 9(11), 679; <https://doi.org/10.3390/biom9110679>

Shigemori, H. *et al.* (1992) 'Alteramide A, a New Tetracyclic Alkaloid from a Bacterium *Alteromonas* sp. Associated with the Marine Sponge *Halichondria Okadai*', *Journal of Organic Chemistry*, 57(15), pp. 4317–4320. doi: 10.1021/jo00041a053.

Shoemaker, R. H. (2006) 'The NCI60 human tumour cell line anticancer drug screen.', *Nature reviews. Cancer*. England, pp. 813–823. doi: 10.1038/nrc1951.

Sipkema, D. *et al.* (2011) 'Multiple approaches to enhance the cultivability of bacteria associated with the marine sponge *Haliclona (gellius) sp*', *Applied and Environmental Microbiology*, 77(6), pp. 2130–2140. doi: 10.1128/AEM.01203-10.

Song, J., Oh, H. M. and Cho, J. C. (2009) 'Improved culturability of SAR11 strains in dilution-to-extinction culturing from the East Sea, West Pacific Ocean', *FEMS Microbiology Letters*, 295(2), pp. 141–147. doi: 10.1111/j.1574-6968.2009.01623.x.

- Souza, D. T. *et al.* (2016) 'Analysis of bacterial composition in marine sponges reveals the influence of host phylogeny and environment', *FEMS Microbiology Ecology*, 93(1). doi: 10.1093/femsec/fiw204.
- Staley, J. T. and Konopka, A. (1985) 'Measurement of In Situ Activities of Nonphotosynthetic Microorganisms in Aquatic and Terrestrial Habitats', *Annual Review of Microbiology*, 39(1), pp. 321–346. doi: 10.1146/annurev.mi.39.100185.001541.
- Stewart, E. J. (2012) 'Growing Unculturable Bacteria', *Journal of Bacteriology*, 194(16), pp. 4151–4160. doi: 10.1128/JB.00345-12.
- Stingl, U. *et al.* (2008) 'Dilution-to-extinction culturing of psychrotolerant planktonic bacteria from permanently ice-covered lakes in the McMurdo Dry Valleys, Antarctica', *Microbial Ecology*, 55(3), pp. 395–405. doi: 10.1007/s00248-007-9284-4.
- Sudek, S. *et al.* (2007) 'Identification of the putative bryostatin polyketide synthase gene cluster from "Candidatus Endobugula sertula", the uncultivated microbial symbiont of the marine bryozoan *Bugula neritina*', *Journal of Natural Products*, 70(1), pp. 67–74. doi: 10.1021/np060361d.
- Swofford, D. (2002) *PAUP*. Phylogenetic Analysis Using Parsimony (*and Other Methods). Version 4.0b10, version 4.0b10 edn.* doi: 10.1111/j.0014-3820.2002.tb00191.x.
- Takahashi, Y. and Nakashima, T. (2018) 'Actinomycetes, an inexhaustible source of naturally occurring antibiotics', *Antibiotics*, 7(2). doi: 10.3390/antibiotics7020045.
- Tanaka, Y., Hosaka, T. and Ochi, K. (2010) 'Rare earth elements activate the secondary metabolite-biosynthetic gene clusters in *Streptomyces coelicolor* A3(2)', *Journal of Antibiotics*, 63(8), pp. 477–481. doi: 10.1038/ja.2010.53.
- Tianero, M. D., Balaich, J. N. and Donia, M. S. (2019) 'Localized production of defence chemicals by intracellular symbionts of *Haliclona* sponges', *Nature Microbiology*, 4(7), pp. 1149–1159. doi: 10.1038/s41564-019-0415-8.

Tsukimoto, M. *et al.* (2011) 'Bacterial production of the tunicate-derived antitumor cyclic depsipeptide didemnin B.', *Journal of natural products*, 74(11), pp. 2329–2331. doi: 10.1021/np200543z.

Versalovic, J., de Bruijn, F. J. and Lupski, J. R. (1998) 'Repetitive Sequence-based PCR (rep-PCR) DNA Fingerprinting of Bacterial Genomes', in de Bruijn, F. J., Lupski, J. R., and Weinstock, G. M. (eds) *Bacterial Genomes: Physical Structure and Analysis*. Boston, MA: Springer US, pp. 437–454. doi: 10.1007/978-1-4615-6369-3_34.

Versalovic, J, Koeuth, T. and Lupski, J. R. (1991) 'Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes', *Nucleic acids research*, 19(24), pp. 6823–6831. doi: 10.1093/nar/19.24.6823.

Wakimoto, T. *et al.* (2014) 'Calyculin biogenesis from a pyrophosphate protoxin produced by a sponge symbiont', *Nature Chemical Biology*, 10(8), pp. 648–655. doi: 10.1038/nchembio.1573.

Weber, T. and Kim, H. U. (2016) 'The secondary metabolite bioinformatics portal: Computational tools to facilitate synthetic biology of secondary metabolite production', *Synthetic and Systems Biotechnology*, 1(2), pp. 69–79. doi: 10.1016/j.synbio.2015.12.002.

Williams, R. P. (1973) 'Biosynthesis of prodigiosin, a secondary metabolite of *Serratia marcescens*.', *Applied microbiology*, 25(3), pp. 396–402.

Xu, Y. *et al.* (2012) 'Bacterial biosynthesis and maturation of the didemnin anti-cancer agents', *Journal of the American Chemical Society*, 134(20), pp. 8625–8632. doi: 10.1021/ja301735a.

Yang, S. J., Kang, I. and Cho, J. C. (2016) 'Expansion of Cultured Bacterial Diversity by Large-Scale Dilution-to-Extinction Culturing from a Single Seawater Sample', *Microbial Ecology*, 71(1), pp. 29–43. doi: 10.1007/s00248-015-0695-3.

Yarza, P. *et al.* (2014) 'Uniting the classification of cultured and uncultured bacteria and

archaea using 16S rRNA gene sequences', *Nature Publishing Group*, 12(9), pp. 635–645. doi: 10.1038/nrmicro3330.

York, A. (2020) 'Marine microbial diversity from pole to pole', *Nature Reviews Microbiology*, 18(1), p. 3. doi: 10.1038/s41579-019-0304-4.

Yuan, H. *et al.* (2016) 'The Traditional Medicine and Modern Medicine from Natural Products.', *Molecules (Basel, Switzerland)*, 21(5), p. 559. doi: 10.3390/molecules21050559.

Zengler, K. *et al.* (2002) 'Cultivating the uncultured', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(24), pp. 15681–15686. doi: 10.1073/pnas.252630999.

Zhang, H., Zhao, Z. and Wang, H. (2017) 'Cytotoxic Natural Products from Marine Sponge-Derived Microorganisms', *Marine drugs*, 15(3), p. 68. doi: 10.3390/md15030068.



Zhang, M. M. *et al.* (2017) 'Using natural products for drug discovery: the impact of the genomics era.', *Expert opinion on drug discovery*, 12(5), pp. 475–487. doi: 10.1080/17460441.2017.1303478.

Zhao, X. and Kuipers, O. P. (2016) 'Identification and classification of known and putative antimicrobial compounds produced by a wide variety of Bacillales species', *BMC Genomics*, 17(1), p. 882. doi: 10.1186/s12864-016-3224-y.

Zhulin, I. B. (2016) 'Classic Spotlight: 16S rRNA Redefines Microbiology', *Journal of Bacteriology*, 198(20), pp. 2764–2765. doi: 10.1128/JB.00616-16.

ANEXO

Detection of a pederin-like compound using a dilution-to-extinction-based platform for the isolation of marine bacteria in drug discovery strategies

Xulio Benítez, Elena G. Gonzalez*  Jesus García, Paz Zúñiga, Fernando de laCalle  and Carmen Cuevas

Research and Development Area, PharmaMar S.A., Avda. De los Reyes, 1 P.I. La Mina-Norte, Madrid, Colmenar Viejo 28770, Spain.

genus *Labrenzia*. The efficiency and diversity ratio in the number of isolates and compounds are discussed. In view of the results, the proposed DTE approach proved to be efficient for the isolation of new cytotoxic compounds of marine origin and pave the way for future potential applications.

Summary

The continued development of culturing technologies for the discovery of new molecules from marine microbes is of paramount importance for drug discovery. Coupled with this, the use of the high-throughput approach shows promise for increasing the number of Gram-negative and non-filamentous bacteria cultures that can be surveyed, since they show a lower potential of bioactivity. In this work, we propose a new strategy of high-throughput cultivation of bacteria inspired by a dilution-to-extinction (DTE) methodology for the isolation of, and screening for, new cytotoxic compound producing marine bacteria. A marine sponge tissue was directly used as inoculum and the results were compared with the data obtained through the direct plating isolation method. Enterobacterial repetitive intergenic consensus polymerase chain reaction (ERIC-PCR) genomic fingerprinting indicated the isolation of four bioactive strains, three of them producers of a pederin-like compound, and the fourth one able to synthesize a different compound, still unidentified, rendered by the DTE approach, in comparison with one bioactive strain identified through the plating method. Analyses based on the 16S rRNA gene data showed the existence of two different species belonging to the

Introduction

Since 'The Great Plate Count Anomaly' was put forth by Staley and Konopka (Staley and Konopka, 1985), a vast effort has been made to minimize the disparity between the immense bacterial diversity and abundance detected in samples by microscopy or metagenomics and the low number of isolates cultured. A large part of the environmental microbiome has been considered non-cultivable using standard cultivation techniques or common condition media. However, there is a potentially number of species that can be cultured under other specific conditions (Keller and Zengler, 2004; Stewart, 2012; Overmann *et al.*, 2017). These microorganisms could constitute an outstanding untapped source of pharmaceutically relevant organisms (Romano *et al.*, 2017). With respect to the marine environment, this is even more evident, containing a large diversity of unusual natural products still unexplored (Alves *et al.*, 2018; Nigam *et al.*, 2019; Jimenez *et al.*, 2020). Hence, the continued development of culturing technologies for the discovery of new molecules from marine microbes is of paramount importance for drug discovery (Klein Jan *et al.*, 2017; Carroll *et al.*, 2019).

There are relevant examples that claim an important role of non-filamentous marine bacteria as synthesizers of potent cytotoxic compounds (Piel, 2009). In addition, despite the importance of the genus *Streptomyces* and other actinomycetes among marine bacteria with the ability to synthesize secondary metabolites (Dias *et al.*, 2012; Zhang *et al.*, 2017), genomic mining studies have shown an unexpected potential for providing insights into bioactive compound synthesis in Gram-negative bacteria (Machado *et al.*, 2015). A recent example has been found in our own research group, with the isolation of an alphaproteobacteria with the ability to synthesize a powerful bioactive compound previously considered to be of a macro-organismal origin. The discovery of this

Received 31 July, 2020; revised 18 September, 2020; accepted 24 September, 2020.

*For correspondence. E-mail: eggonzalez@pharmamar.com; Tel. + 34 91 823 45 69 (Ext. 1569); Fax + 34 91 846 60 01.

Funding information

The present study was funded in part by the Ministry of Economy and Competitiveness and the Ministry of Science, Innovation and Universities of Spain under the Spanish National Research Program RETOS-Colaboración with the project numbers RTC-2016-4892-1 (DESPOL) and RTC-2017-6405-1 (MARBIOM), respectively.

Microbial Biotechnology (2020) 0(0), 1–10
doi:10.1111/1751-7915.13679

Labrenzia alexandrii PHM005 as the producer of the new pederin-like compound, labrenzin (Schleissner *et al.*, 2017), supports the broadly accepted idea of a microbial origin of most natural products isolated from marine macro-organisms (Piel, 2009).

Moreover, it had been thought that the producers of most natural products isolated from marine macro-organisms are often microbiologic uncultivable symbionts, and findings like this run contrary to that idea. These discoveries have encouraged us to include non-filamentous bacteria in the core of our high-throughput screening programmes and to explore the different options for their isolation.

From easy-to-use methods like solid media plating, to sophisticated and complex ones such as the microencapsulation technique (Zengler *et al.*, 2002), many achievements were reached (Stewart, 2012). Isolation by plating samples on solid media is the most widely used method (Joint *et al.*, 2010). The minimal amount of equipment needed and the unlimited number of different culture media maintain solid media plating as the preferred isolation strategy for a wide range of bacteria. However, inhibition and competition phenomena, scalability, morphology-guided selection or automation are just some limitations to overcome. Notwithstanding this, several different approaches have been applied successfully. Isolation techniques like I-tip (Jung *et al.*, 2014) and I-chip (Nichols *et al.*, 2010) are alternative options for mimicking the natural environment, including the marine habitat. Both methods allow the diffusion of natural signalling compounds, favouring the growth of microorganisms on their own environment. Single-cell isolation methods such as microencapsulation (Ben-Dov *et al.*, 2009) or the use of the Microdish[®] system (Ingham *et al.*, 2007) have taken a step forward in mimicking in the laboratory the marine environmental conditions of the samples, growing pure cultures by individualizing single cells from their neighbours but keeping them connected to the outside environment and allowing diffusion in both directions of small signalling molecules. Nonetheless, scalability and high throughput are limiting factors for all the above-mentioned techniques. Another single-cell isolation technique is the dilution-to-extinction method (DTE) (Schut *et al.*, 1993; Rappé *et al.*, 2002), which has the feasibility of being easily scalable and automatable, allowing for very high-throughput isolation (Stewart, 2012). This approach has proven to be very useful for the isolation of bacteria featuring special metabolic characteristics (Hoefman *et al.*, 2012; Castro *et al.*, 2017), such as methane-oxidizing bacteria (Hoefman *et al.*, 2012). More extensively, DTE has been successfully applied for the isolation of new marine oligotrophic bacteria throughout the last 30 years (Schut *et al.*, 1993;

Connon and Givannoni, 2002; Mohamed, 2013; Castro *et al.*, 2017). These types of bacteria have several characteristics that make them less valuable for drug discovery programmes with respect to copiotrophic bacteria groups. Features such as small genome sizes or low growth rates are directly related to a reduced ability to produce secondary metabolites (Overmann *et al.*, 2017). Thus, the DTE approach has been mainly focused on taxonomic studies, rather than producers of new and interesting secondary metabolites. In seeking innovative approaches for the discovery of new Gram-negative bioactive producers, we realized that the lack of cytotoxic activity of most of its representatives, which keeps them outside the focus of high-throughput screening programmes, could be an advantage for the implementation of an isolation and screening protocol based on DTE methodology. One of the main problems related to the use of *Actinomyces* in drug discovery programmes is the high number of bioactive samples and the continuous rediscovery of existing compounds (Weber and Kim, 2016). The reduced number of bioactive samples obtained from non-actinobacteria cultures (less than 2%, based on our experience), compared with those from *Streptomyces* (more than 30%, based on our experience), gave us the chance to set up a high-throughput isolation platform combining DTE and antiproliferative assays. This allowed us to discard redundant and non-cytotoxic activity samples in the first steps of the process.

Keeping this in mind, we intended to apply a DTE technique coupled with a high-throughput platform (based on the use of 384 format well plates) as a complementary method to the classic solid media isolation, with the aim to discovering new marine bacteria with the ability to synthesize unrevealed cytotoxic compounds. Seeking innovative approaches for the discovery of new Gram-negative producers, the classical workflow, sample, isolation, cultivation and screening, is modified by jumping directly from sample to cultivation, skipping the expensive, time-consuming and repetitive isolation step (Fig. 1). The number of pure colony-forming units (CFU) was statistically calculated by serially diluting the sample, and the obtained isolates were fermented for induction of secondary metabolite production. The crude extracts were tested in a bioassay against four cancer cell lines. Only samples with cytotoxic activity proceed to DNA-fingerprint and/or chemical de-replication by HPLC-MS, excluding a high number of strains with no interest for the isolation, re-isolation and molecular and chemical de-replication steps. Moreover, isolation cultures were carried out in 384-well microtitre plates, a very appropriate format for automation. In addition, the fermentation volume used was small enough to allow the single cells

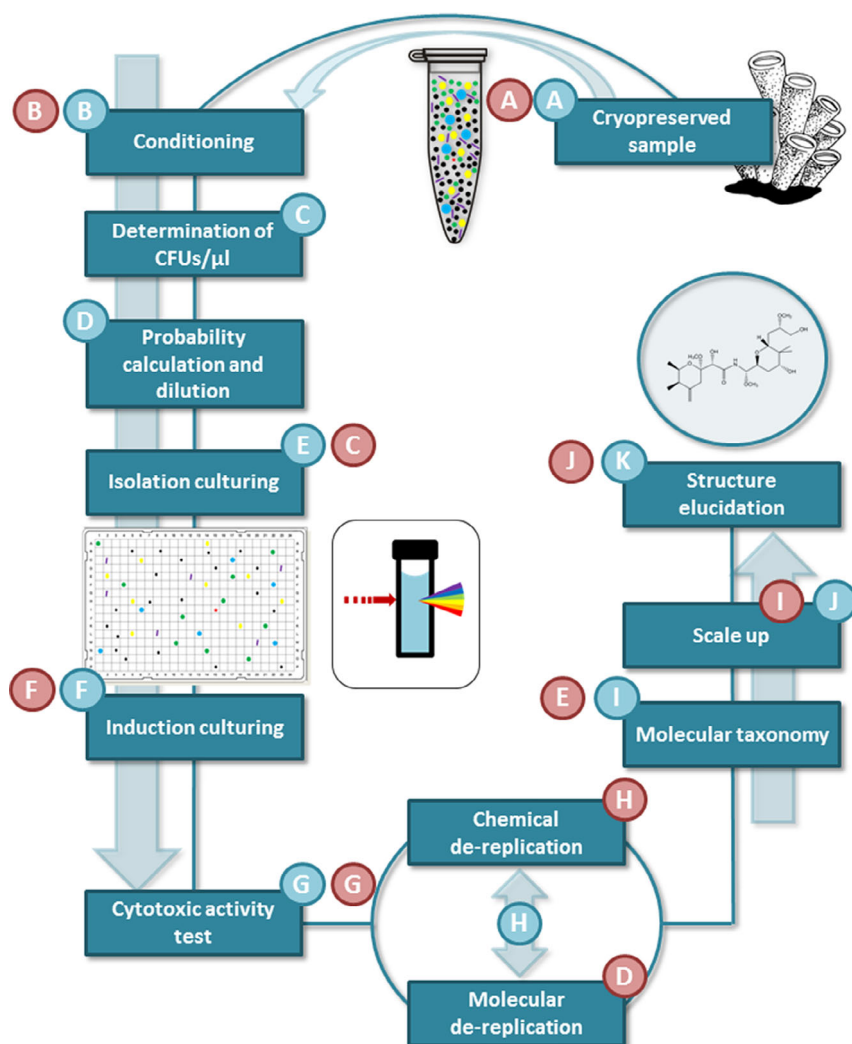


Fig. 1. Flowchart of DTE methodology steps (blue letters), from the cryopreserved sample (A) to the new molecule structure elucidation (K). Red letters (A–J) were added in order to compare solid media with DTE isolation methods. While DTE goes directly from isolation culturing (E, in blue) to induction culturing (F, in blue), solid media isolation goes usually through molecular de-replication and 16S rRNA gene sequence analysis steps (D and E, in red) to induction culturing step (F, in red).

to reach visible optical density in a short period of time (Fig. 1).

Results

Dilution calculation

The sample, a marine sponge, was homogenized, filtered and the mixture was serially diluted. A volume of the resulting aliquots was inoculated on solid media and incubated for 10 days at 28°C. Four replicates of each dilution were done and the grown colonies were counted daily in order to determine the cultivation parameters and statistical calculations. The average CFUs μl^{-1} for the homogenized and filtered sample was established in 47.58, and thus, the calculated number of expected

grown wells in each microtitre plate (384-well) for a percentage of mixed cultures of 5% was 85.86. Strong inhibition phenomena and variance between replicates were observed on inoculated solid media with high sample volumes. The range tested for optimal growth rates concluded that densities below 50 CFUs per plate improved reproducibility and proportionality between replicates and inoculated volumes. In this sample, that density was obtained with the plates inoculated with 1, 0.5 and 0.1 μl of homogenized sample (Fig. 2). Nevertheless, when the sample was inoculated on liquid media and fermented in 384 well microtitre plates, the number of grown wells was twofold more than expected. Thus, a correction factor was applied to offset the growth rate in the transition from solid to liquid media.

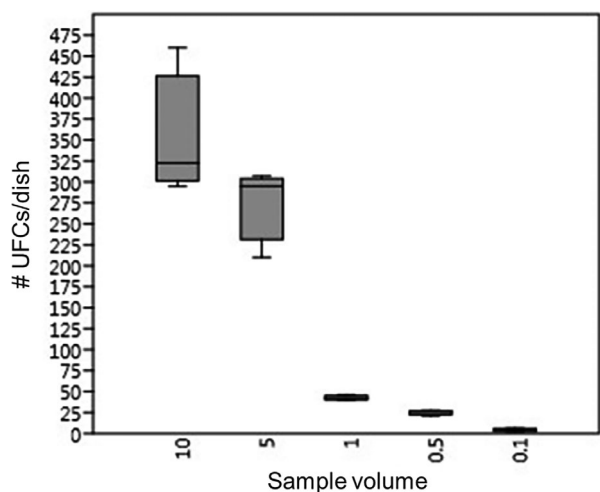


Fig. 2. Box plot representation of the number of pure colony-forming units (CFU) grown per plate using a volume of 10, 5, 1, 0.5 and 0.1 μl of the homogenized sample. Box shows median and interquartile range. Based on this information, the data for the 1, 0.5 and 0.1 μl inoculated volume were used for the dilution-to-extinction calculations.

Isolation and screening of cultures on 384-well microtiter plates based on the cytotoxic activity

Fifty microtiter plates were inoculated with the calculated dilution. Four days after, 2242 wells with potential bacterial growth were detected by optical density measurement. To avoid overgrowth and death of the fastest growing cultures, the growth wells were selected, inoculated onto 96-well plates and incubated again with fresh Marine Broth (Difco® 2216) for 96 h. The 81.5% of the cultures grew in this step (based on the optical density measurement). They were inoculated in the culture media (2MPD1 F), and after 5 days, each culture was lyophilized, extracted and tested against four human cancer cell lines. The cytotoxic assay gave a total yield of 28 samples with cytotoxic activity (Table S1).

Molecular analyses of the positive cultures

The 28 active cultures were inoculated on solid media, obtaining 25 pure cultures, 3 showed mixed cultures and were discarded. The REP-PCR fingerprint grouped the samples into 3 different clusters with 20, 4 and 1 representatives respectively (Fig. 3). Several strains from each cluster were later identified by PCR amplification, sequencing and phylogenetic analyses of a variable region of the 16S rRNA. The comparison of the sequences against the SILVA LTPs 132 database (<http://www.arb-silva.de/projects/living-tree/>) identified all the strains as the genus *Labrenzia*, with a high similarity value (> 99%). According to this result, both NJ and ML trees obtained from the phylogenetic analyses resulted

in the same topology and yielded a well-supported monophyletic *Labrenzia alexandrii* clade (Fig. 4). Most genera are highly supported, being monophyletic. Strain ANN-17-096L-003 was more closely related to the *L. aggregata* (AAUW01000023) sequence than the *L. alexandrii* clade that included the positive strains obtained with the DTE method (Fig. 4), and was classified as such.

Chemical de-replication

The chemical de-replication of the crude extract of one representative of each group determined the presence of the labrenzins (pederin analogues) PM160134 and PM160153 in 2 strains (Fig. S1). The third strain (named ANN-17-096L-003, identified as *L. aggregata*) is in the process of elucidation.

Discussion

The main aim of this study was to adapt the DTE methodology for the isolation of marine non-filamentous bacteria with the final intention of detecting the ones with the ability to produce cytotoxic compounds (Machado *et al.*, 2015). To explore this, a proof of concept was done using a marine sponge (*Haplosclerida* order) from where previously isolated pederin-like molecules were detected (Schleissner *et al.*, 2017). Another bacterial isolation technique, i.e. solid plate isolation technique, was applied in parallel for comparison purposes (Klein Jan *et al.*, 2017). To our knowledge, this is the first study to apply DTE coupled with an automatizable 384-liquid media format, followed by antiproliferative tests for human cancer cell lines, to a marine sponge-associated bacteria, in order to look for new chemical entities to fight against cancer.

Results indicated that the DTE approach has been successfully applied for the isolation of bioactive compounds and shows promise for future high-throughput optimizations for increasing the number of non-filamentous bacteria cultures that can be surveyed.

The solid media isolation method shows obvious advantages. It allows the isolation of microorganisms in a plethora of media with very simple equipment (Overmann, 2013; Bonnet *et al.*, 2020). Nevertheless, it has some limitations that the DTE method can reinforce, e.g. the difficulty in scalability and automatization of the Petri dish format. Furthermore, the microfermentations in 384-well plates format make this protocol very suitable for liquid handling equipment and thus for high-throughput screening programme (Betts and Baganz, 2006). Moreover, solid media isolation follows the sample-isolation-fermentation sequence, resulting in the isolation of a great number of redundant isolated bacteria (Fig. 1A–J

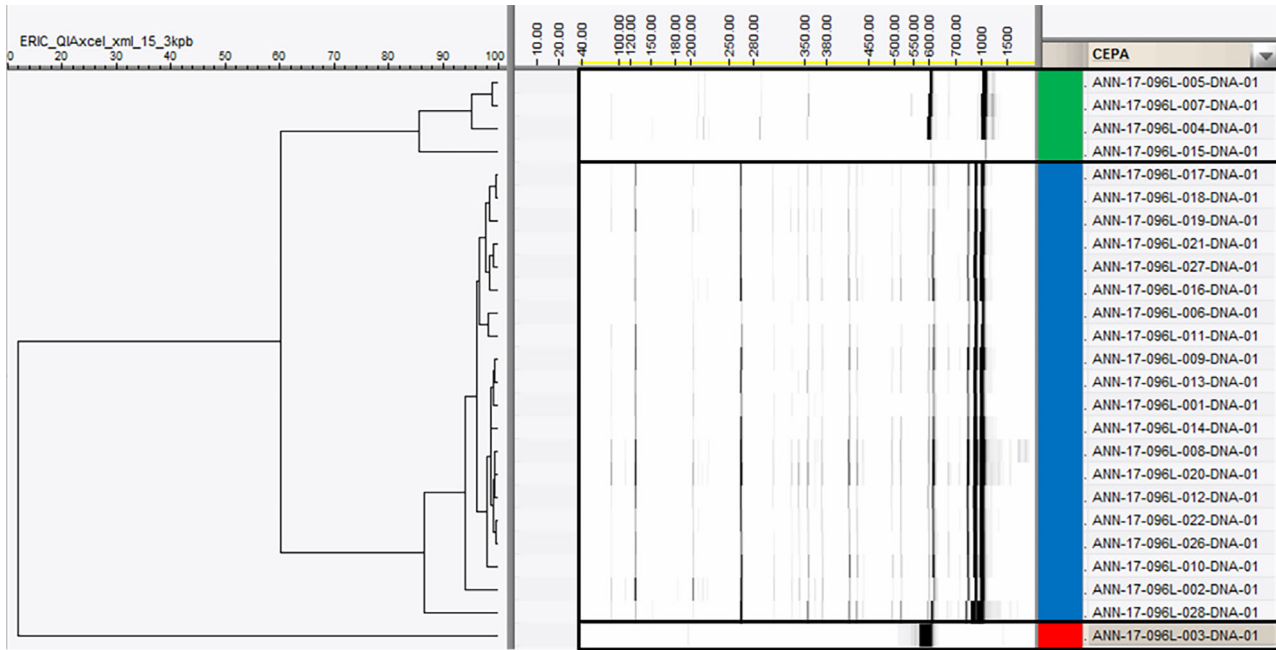


Fig. 3. Genetic fingerprint results of the 25 active pure cultures isolated with DTE. The strains were divided into 3 different groups showing similar isolates among them: I (green bar), II (blue bar) and III (red bar). Strains from groups I and II were identified as the species *Labrenzia alexandrii* and the only one from group III was identified as a *L. aggregata*, based on their 16S rRNA gene sequence analyses. The scale bar indicates percentage of similarity.

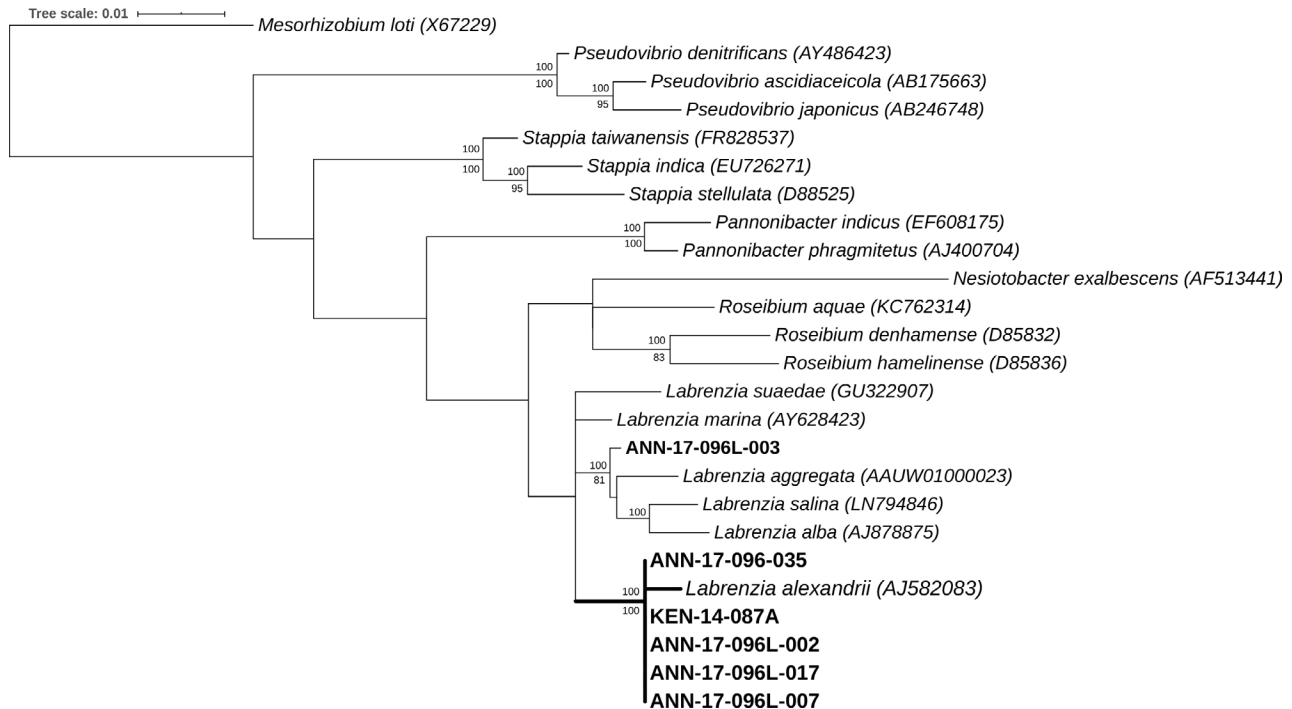


Fig. 4. Neighbour-joining (NJ) and maximum-likelihood (ML) tree of 16S rRNA gene sequences reconstructed using TIM distances. In bold, the samples sequenced for this work are included. The SILVA Accession numbers are indicated in brackets. Bootstrap values are from ML (above node) and NJ (below node) analyses. The tree is rooted with *Mesorhizobium loti*. SILVA accession numbers accompany each taxon name. The scale bar indicates evolutionary distances.

in red). However, the tested method goes directly from sample to fermentation, and only bioactive cultures with novel compounds are isolated and characterized (Fig. 1A–K in blue), allowing to test thousands of strains for activity without plate spreading, colony visual picking, isolation and/or re-isolation (Hoefman *et al.*, 2012).

Another advantage observed of applying DTE cultivation, together with the 384-liquid media format is the increase of culturability in terms of abundance of bacteria that could render in a higher biodiversity of species. For the DTE method, to determine the bacterial abundance of the sample needed for further dilution calculations, the count has been done indirectly by inoculating a volume of the homogenized sample on Petri plates filled with isolation agar medium instead of using other more common methods (e.g. microscope visualization or flow cytometry measure). Through this step, it was possible to avoid counting dead or non-viable cells, allowing for a more accurate dilution calculation. By doing this, we observed that a high density of CFUs in the same Petri dish (over 50) induced inhibition or competition phenomena that inhibited the growth of some of the microorganisms, the number of CFUs ml^{-1} observed on the 384 microtiter plates being approximately twice that expected. These two issues indicate that DTE gets better results in terms of number of grown organisms than solid media isolation. Further studies would be needed to determine if the increase happens also in terms of biodiversity (Klein Jan *et al.*, 2017). Moreover, the low 384-well microculture volume used (50 μl) provides the bacteria with a comfortable environment for growing but still allows a single cell to reach detectable population densities. Truth being that some organisms need to grow together (Joint *et al.*, 2010), it is also true that numerous microorganisms have the ability to produce chemical entities such as antibiotics that inhibit in some ways the growth of the closest individuals of other species. With the fermentation carried out in such a small volume and physically independent compartments, we prevent any kind of communication between cultures and obtain grown cultures after short periods of incubation. This conclusion is supported by twofold increase in recovered cells CFUs μl^{-1} recounted on liquid media 384-well plates, with respect to solid media Petri dishes. In our assay, the percentage of mixed bioactive culture obtained (11%) were higher than the threshold established (5%) but still being admissible, taking into account different factors that affect the dilution, such as particles or consortia.

Regarding the diversity of taxa obtained, the fact that our DTE method has been able to isolate the producer *L. alexandrii* becomes relevant. Moreover, the finding of three bioactive strains of the same genus (and different species) in comparison with the bioactive strain obtained

with the solid plate method is very significant. The bioactive strains isolated with the DTE method showed the same morphology and it would have been discarded if a colony visual picking selection were applied. In that sense, the isolation of different strains of the same species provides an opportunity to find better producers since they might synthesize different molecules (Romano *et al.*, 2018) which would help in a hypothetical improvement of the production process. However, the expansion of the number of samples to be assayed with the DTE method in parallel with a broader morphological isolation of samples obtained on solid media is needed in order to have a more reliable biodiversity rate of cultivable bacteria.

Together, these results validate the combination of DTE with a 384-plate format and antiproliferative tests for the exploration of cultures for new marine strains. We are currently expanding the potential of DTE to the exploration of cultures for new marine strains by enabling the use of different media and isolation timings.

Experimental procedures

Sample collection and conditioning

The studied organism is a marine sponge belonging to the *Haplosclerida* order. It was collected in January 2017, from a depth of 47 metres, off the shores of Palau (02°55.657'N 131°47.592'E) in the Pacific Ocean. The sample was directly preserved at -30°C in water with glycerol (20% v/v) and sea salts (Tropic Marine PRO-REEF 2.7% w/v). In the laboratory, the sample was mechanically homogenized with mortar and filtered through an 80- μm mesh to discard debris. The final volume was kept at -80°C in 200- μl Eppendorf tubes (Fig. 1B in blue).

Dilution-to-extinction calculations

To determine the average number of colony-forming units per μl (CFUs μl^{-1}) in the sample, inoculation of the homogenized sample on marine agar (Marine Broth, Difco® 2216) with cycloheximide (0.02% w/v) was performed. It was carried out through four replicate dilutions of 10, 5, 1 and 0.1 μl of the homogenized previously suspended in a total volume of 100 μl of purified water with marine salt (27 g l^{-1}) (Fig. 1C in blue). The dishes were incubated at 28°C during 2 weeks and the colonies were counted daily to determine the moment of no more colonies growth, which in our case, corresponded to ten days. The results after statistical treatment showed that means from 10 and 5 μl per plate were not reproducible because of their high standard deviation (Fig. 2). Hence, the CFUs μl^{-1} were calculated based on the 1, 0.5 and 0.1 μL dilution replicates, with a resulting average number of 47.6 CFUs μl^{-1} in the sample.

In order to maximize the number of pure cultures per plate with the lowest number of mixed cultures, a probability calculation of independent events was made based on $P_{AB} = P_A * P_B$, where P_{AB} is the calculated probability and P_A and P_B the probability of each independent event. If the accepted percentage of twice inoculated wells is established in 5% (P_{AB}) and the probability of each well of being inoculated is $N/384$ (for P_A and P_B); then, the number of calculated CFUs inoculated per plate (N) would be 85.86. For the next step of inoculation in liquid media, we corrected the volume of homogenized sample used as a factor for the higher number of colonies that grew in liquid, in comparison with solid media (Fig. 1D in blue).

Isolation, grown culture picking and induction cultures

The broadly used medium for marine bacteria, marine broth (Difco 2216), supplemented with cycloheximide (0.02% w/v), was used for growing *L. alexandrii*, since it was reported to be adequate for that species (Sipkema *et al.*, 2011). Moreover, its low absorbance made it suitable for the DTE isolate detection. Cultures were done in 384-well polystyrene plates with a volume of 50 μ l of marine broth per well. Filling and inoculation of plates were done by the liquid handling robot EVO100 (Tecan[®], Männedorf, Switzerland). The progressive appearance of grown wells was determined, based on 5 replicates. The results showed a slowdown in the appearance of new CFU after 5 days of incubation. Overall, incubation was set to 5 days at 28°C and 280 r.p.m. in a rotatory shaker (Kuhner[®], Basel, Switzerland) with 5 cm eccentricity. The detection of wells with growth was performed by optical density measurement, using an Omega POLARstar (BMG LABTECH[®], Ortenberg, Germany) reader. The detection threshold was set over 0.3 at 600 nm (Fig. 1E in blue). The recovery of the cultures from the 384-well plates and the inoculation on 96-well plates with 750 μ l of fresh medium Marine Broth (Difco[®] 2216) per well, was performed with a liquid handling robot MicroLab Star (Hamilton[®], Reno, NV, USA). The plates were incubated for 5 days at 28°C and 280 r.p.m. All the remaining volume, after inoculation of the induction cultures, was stored at -80°C with glycerol (20%) for further analyses. Finally, the induction cultures (Fig. 1F in blue) were carried out in the medium 2MPD1 F (soybean flour (Sigma[®], Saint Louis, MO, USA) 5 g l⁻¹, bacto peptone (Difco[®], Hampton, NH, USA) 2 g l⁻¹, corn steep powder (Roquette Solulys[®] 095E) 2 g l⁻¹, mannitol 20 g l⁻¹, CO₃Ca 10 g l⁻¹, sea salts (Pro Reef[®]) 36 g l⁻¹) and 3MTM F (soybean flour (Sigma[®]) 20 g l⁻¹, corn steep powder (Roquette Solulys[®] 095E) 5 g l⁻¹, glycerol 5 g l⁻¹, CO₃Ca 10 g l⁻¹, sea salts (Pro Reef[®], Wartenberg, Germany) 20 g l⁻¹)

with 5 days of incubation at 28°C and shaking at 230 r.p.m.

Extraction and antiproliferative experiments

After incubation, the broths were lyophilized and extracted with a mixture of methanol, acetone and water (1:1:0.2 v/v). The dried crude extracts were screened for cytotoxic activity (Fig. 1G in blue) against four tumour cell lines: A549 (ATCC CCL-185) (lung carcinoma, NSCLC); HT-29 (ATCC HTB-38) (colon adenocarcinoma); MDA-MB-231 (ATCC HTB-26) (breast adenocarcinoma); and PSN-1 (ATCC CRL-3211) (pancreas adenocarcinoma). All the cell lines derived from human cancer and were obtained from the American Type Culture Collection (ATCC). Cells were maintained in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) (except PSN-1 that was maintained in Roswell Park Memorial Institute 1640 Medium (RPMI)), supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS), 2 mM L-glutamine, 100 U ml⁻¹ penicillin and 100 U ml⁻¹ streptomycin at 37°C, 5% CO₂ and 98% humidity. For the experiments, cells were harvested from subconfluent cultures using trypsinization and resuspended in fresh medium before counting and plating. Crude extracts are resuspended with DMSO and DMEM and dispensed to culture plates containing the cells (final concentration of DMSO 1% (v/v)) to perform the cytotoxic assay. After 48 h of treatment, cytotoxic activity was measured based on the inhibition of cellular proliferation values in comparison with the control cells (Table S1).

DNA_Fingerprint and taxonomy

The samples that showed antitumour activity were recovered from -80°C and re-cultured on solid marine agar (Marine Broth, Difco[®] 2216). Genomic DNA from pure isolates was extracted using the Qiagen DNeasy tissue kit (Qiagen). ERIC-PCR genomic fingerprinting (Fig. 1H in blue) was performed using ERIC-2 primer (5'-AAG-TAA-GTG-ACT-GGG-GTG-AGC-G-3'), following the amplification conditions described in Versalovic *et al.* (1991). The bands generated by electrophoresis of the PCR amplifications were analysed in a QIAxcel (Qiagen), and sizes were calculated by comparison with DNA molecular size markers (100 bp–2.5 Kb marker, Qiagen). The fingerprint information from other bacteria strains of the genus *Labrenzia* that produce Labrenzin was also included in the analyses. Cluster analyses were performed in BioNUMERICS software v7.6.3, employing the Pearson correlation coefficient with a 2% curve smoothing. A cut-off value of 95% was used to separate genetically different isolates. From those that were identical isolates, the representative ones showing the higher

cytotoxic activity were selected and included in the bacterial collection at PharmaMar. These samples were also subjected to 16S rRNA gene sequence analyses to determine their taxonomy based on BLASTp comparisons with SILVA LTP132 database (www.arb-silva.de). Primers used for amplification were 63-F (5'-CAGGCC-TAACACATGCAAGTC-3') and 1387-R (5'-GGGCGGWTGTACAAGGC-3') (Marchesi *et al.*, 1998). PCR was performed with an initial denaturation step at 95°C for 1 min, followed by 30 cycles of denaturation at 94°C for 1 min, annealing at 58°C for 50 s and extension at 72°C for 1 min, with a final extension step at 72°C for 10 min. Moreover, two strains of *L. alexandrii* (ANN-17-096-035 and KEN-14-087A) from our collection were grown and sequenced for comparison purposes. Partial nucleotide sequences of the 16S rDNA gene were aligned with CLUSTAL X v2 using the default parameters and verified manually in order to maximize positional homology. All positions with gaps were omitted for the phylogenetic reconstructions. Additionally, sequences retrieved from the SILVA LTPS 132 database were also included in the analyses. The data set was subjected to the neighbour-joining (Saitou and Nei, 1987) and maximum-likelihood (ML) method of phylogenetic inference. Analyses were carried out with PAUP v4.0b10 (Swofford, 2003). The Akaike information criterion (AIC) implemented in MODELTEST v2 (Posada and Crandall, 1998) was used to select the evolutionary model that best-fitted the empirical data set. The TIM ('transitional model') was selected as the best-fitted model to the data set. Robustness of the resulting tree was tested with 1000 bootstrapping (Felsenstein, 1985).

Chemical de-replication

The remaining aliquots were further subjected to de-replication through their mass spectra to look for known compounds (Fig. 1H). (+)-ESIMS were recorded using an Agilent 1100 Series LC/MSD spectrometer. High-resolution mass spectroscopy (HRMS) was performed on an Agilent 6230 TOF LC/MS system using the ESIMS technique.

Solid media isolation and characterization of the sample

Solid media isolation of the sample was carried out in parallel to the previous method. Five different media, Benedict agar BEN (1/2 dilution), ammonium mineral salts (AMS), marine broth (Difco 2216), marine broth (Difco 2216) supplemented with streptomycin (100 mg l⁻¹) and marine broth (Difco 2216) supplemented with trimethoprim (30 mg l⁻¹) were used. Three replica plates of each condition were inoculated with 30 µl of the homogenized sample and incubated for ten

days at 28°C. After incubation, visually different colonies were selected and re-cultured in new plates to obtain pure growth. The characterization, fermentation and cytotoxic test of all the isolated bacteria were performed following the procedures described before, with some variations in the organization of the steps (Fig. 1A–J in red).

As a result, 35 morphologically different colonies were selected, and at the end of the process, one culture with a cytotoxicity assay-positive result was detected. The active organism (named ANN-17-096-035, Figs 3 and 4) was identified as *L. alexandrii*, and the cytotoxic activity was produced by the pederin-like molecule, labrenzin.

Acknowledgements

The present study was funded in part by the Ministry of Economy and Competitiveness and the Ministry of Science, Innovation and Universities of Spain under the Spanish National Research Program RETOS-Colaboración with the project numbers RTC-2016-4892-1 (DESPOL) and RTC-2017-6405-1 (MARBIOM), respectively. The authors would like to thank Gema Santamaria for performing the antiproliferative activity assays. We also thank the Subject Editor and two anonymous reviewers for their comments on a previous version of the manuscript.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

References

- Alves, C., Silva, J., Pinteus, S., Gaspar, H., Alpoim, M.C., Botana, L.M., and Pedrosa, R. (2018) From marine origin to therapeutics: the antitumor potential of marine alga-derived compounds. *Front Pharmacol* **9**: 1–24.
- Ben-Dov, E., Kramarsky-Winter, E., and Kushmaro, A. (2009) An in situ method for cultivating microorganisms using a double encapsulation technique. *FEMS Microbiol Ecol* **68**: 363–371.
- Betts, J.I., and Baganz, F. (2006) Miniature bioreactors: current practices and future opportunities. *Microb Cell Fact* **5**: 21.
- Bonnet, M., Lagier, J.C., Raoult, D., and Khelaifia, S. (2020) Bacterial culture through selective and non-selective conditions: the evolution of culture media in clinical microbiology. *New Microbes New Infect* **34**: 100622.
- Carroll, A.R., Copp, B.R., Davis, R.A., Keyzers, R.A., and Prinsep, M.R. (2019) Marine natural products. *Nat Prod Rep* **36**: 122–173.
- Castro, D.J., Llamas, I., Béjar, V., and Martínez-Checa, F. (2017) *Blastomonas quesadae* sp. Nov., isolated from a saline soil by dilution-to-extinction cultivation. *Int J Syst Evol Microbiol* **67**: 2001–2007.

- Connon, S.A., and Giovannoni, S.J. (2002) High-throughput methods for culturing microorganisms in very-low-nutrient media. *Appl Environ Microbiol* **68**: 3878–3885.
- Dias, D.A., Urban, S., and Roessner, U. (2012) A Historical overview of natural products in drug discovery. *Metabolites* **2**: 303–336.
- Felsenstein, J. (1985) Phylogenies and the comparative method. *Am Nat* **125**: 1–15.
- Hoefman, S., van der Ha, D., De Vos, P., Boon, N., and Heylen, K. (2012) Miniaturized extinction culturing is the preferred strategy for rapid isolation of fast-growing methane-oxidizing bacteria. *Microb Biotechnol* **5**: 368–378.
- Ingham, C.J., Sprengels, A., Bomer, J., Molenaar, D., van den Berg, A., van Hylckama Vlieg, J.E.T., and de Vos, W.M. (2007) The micro-Petri dish, a million-well growth chip for the culture and high-throughput screening of microorganisms. *Proc Natl Acad Sci USA* **104**: 18217–18222.
- Jimenez, P.C., Wilke, D.V., Branco, P.C., Bauermeister, A., Rezende-Teixeira, P., Gaudêncio, S.P., and Costa-Lotufo, L.V. (2020) Enriching cancer pharmacology with drugs of marine origin. *Br J Pharmacol* **177**: 3–27.
- Joint, I., Mühling, M., and Querellou, J. (2010) Culturing marine bacteria - an essential prerequisite for biodiscovery: Minireview. *Microb Biotechnol* **3**: 564–575.
- Jung, D., Seo, E.-Y., Epstein, S.S., Joung, Y., Han, J., Parfenova, V.V., et al. (2014) Application of a new cultivation technology, I-tip, for studying microbial diversity in freshwater sponges of Lake Baikal, Russia. *FEMS Microbiol Ecol* **90**: 417–423.
- Keller, M., and Zengler, K. (2004) Tapping into microbial diversity. *Nat Rev Microbiol* **2**: 141–150.
- Klein Jan, H., Jeanthon, C., Boyen, C., and Dittami, S.M. (2017) Exploring the cultivable *Ectocarpus* microbiome. *Front Microbiol* **8**: 1–13.
- Machado, H., Sonnenschein, E.C., Melchiorson, J., and Gram, L. (2015) Genome mining reveals unlocked bioactive potential of marine Gram-negative bacteria. *BMC Genom* **16**: 1–12.
- Marchesi, J.R., Sato, T., Weightman, A.J., Martin, T.A., Fry, J.C., Hiom, S.J., and Wade, W.G. (1998) Design and evaluation of useful bacterium-specific PCR Primers that amplify genes coding for 16S rRNA. *Appl and Environ Microbiol* **64**: 795–799.
- Mohamed, R. (2013) Dilution-to-extinction culturing of SAR11 members and other marine bacteria from the Red Sea. Thesis. Saudi Arabia: King Abdullah University of Science and Technology.
- Nichols, D., Cahoon, N., Trakhtenberg, E.M., Pham, L., Mehta, A., Belanger, A., et al. (2010) Use of Ichip for high-throughput in situ cultivation of “uncultivable” microbial species. *Appl Environ Microbiol* **76**: 2445–2450.
- Nigam, M., Suleria, H.A.R., Farzaei, M.H., and Mishra, A.P. (2019) Marine anticancer drugs and their relevant targets: a treasure from the ocean. *DARU J Pharm Sci* **27**: 491–515.
- Overmann, J. (2013) Principles of enrichment, isolation, cultivation, and preservation of prokaryotes. In *The Prokaryotes: Prokaryotic Biology and Symbiotic Associations*. Rosenberg, E., DeLong, E.F., Lory, S., Stackebrandt, E., and Thompson, F. (eds). Berlin, Heidelberg: Springer, pp. 149–207.
- Overmann, J., Abt, B., and Sikorski, J. (2017) Present and future of culturing bacteria. *Annu Rev Microbiol* **71**: 711–730.
- Piel, J. (2009) Metabolites from symbiotic bacteria. *Nat Prod Rep* **26**: 338–362.
- Posada, D., and Crandall, K.A. (1998) MODELTEST: testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics* **14**: 817–818.
- Rappé, M.S., Connon, S.A., Vergin, K.L., and Giovannoni, S.J. (2002) Cultivation of the ubiquitous SAR11 marine bacterioplankton clade. *Nature* **418**: 630–633.
- Romano, G., Costantini, M., Sansone, C., Lauritano, C., Ruocco, N., and Ianora, A. (2017) Marine microorganisms as a promising and sustainable source of bioactive molecules. *Mar Environ Res* **128**: 58–69.
- Romano, S., Jackson, S., Patry, S., and Dobson, A. (2018) Extending the “One Strain Many Compounds” (OSMAC) principle to marine microorganisms. *Mar Drugs* **16**: 244.
- Saitou, N., and Nei, M. (1987) The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol* **4**: 406–425.
- Schleissner, C., Cañedo, L.M., Rodríguez, P., Crespo, C., Zúñiga, P., Peñalver, A., et al. (2017) Bacterial production of a pederin analogue by a free-living marine alphaproteobacterium. *J Nat Prod* **80**: 2170–2173.
- Schut, F., de Vries, E.J., Gottschal, J.C., Robertson, B.R., Harder, W., Prins, R.A., and Button, D.K. (1993) Isolation of typical marine bacteria by dilution culture: growth, maintenance, and characteristics of isolates under laboratory conditions. *Appl Environ Microbiol* **59**: 2150–2160.
- Sipkema, D., Schippers, K., Maalcke, W.J., Yang, Y., Salim, S., and Blanch, H.W. (2011) Multiple approaches to enhance the cultivability of bacteria associated with the marine sponge *Haliclona* (gellius) sp. *Appl Environ Microbiol* **77**: 2130–2140.
- Staley, J.T., and Konopka, A. (1985) Measurement of in situ activities of nonphotosynthetic microorganisms in aquatic and terrestrial habitats. *Annu Rev Microbiol* **39**: 321–346.
- Stewart, E.J. (2012) Growing unculturable bacteria. *J Bacteriol* **194**: 4151–4160.
- Swofford, D. (2003) PAUP*. Phylogenetic Analysis Using Parsimony (*and Other Methods). Version 4.0b10. Sunderland: Sinauer Associates.
- Versalovic, J., Koeuth, T., and Lupski, R. (1991) Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. *Nucleic Acids Res* **19**: 6823–6831.
- Weber, T., and Kim, H.U. (2016) The secondary metabolite bioinformatics portal: computational tools to facilitate synthetic biology of secondary metabolite production. *Synth Syst Biotechnol* **1**: 69–79.
- Zengler, K., Toledo, G., Rappé, M., Elkins, J., Mathur, E.J., Short, J.M., and Keller, M. (2002) Cultivating the uncultured. *Proc Natl Acad Sci USA* **99**: 15681–15686.
- Zhang, H., Zhao, Z., and Wang, H. (2017) Cytotoxic natural products from marine sponge-derived microorganisms. *Mar Drugs* **15**: 68.

Supporting information

Additional supporting information may be found online in the Supporting Information section at the end of the article.

Fig. S1. Chromatographic profile and mass spectra of the strain ANN-17-096L-007 highlighting labrenzin characteristic peaks. The authenticity of labrenzin was inferred from its

HRESI and its 2D NMR spectra previously described (Schleissner *et al.*, 2017)

Table S1. Cytotoxic activity (measured as growth inhibition, in %) for the 28 active cultures obtained against the cancer cell lines. The threshold for antitumor activity was established for inhibition values below 25% in three of the four cancer cell lines tested.

Dilution-to-Extinction Platform for the Isolation of Marine Bacteria-Producing Antitumor Compounds

Xulio Benítez ¹✉

Email xbenitez@pharmamar.com

Jesús García ¹

Elena G. Gonzalez ¹

Fernando de la Calle ¹

¹ Research and Development Department, PharmaMar S.A.,
Madrid, Spain AQ1

Abstract

Gram-negative marine bacteria are an underexplored source of new chemical entities for a wide range of applications. Even though, some have shown a high antitumor activity. This chapter describes an isolation and screening protocol based on the Dilution-to-Extinction approach coupled with an antiproliferative test oriented to the discovery of new cytotoxic compounds synthesized by marine bacteria. In addition to the discovery of new bioactive secondary metabolites, this protocol provides a high-throughput isolation and screening platform for discarding no bioactive strains during the first steps of the drug discovery process.

Key words

Dilution-to-Extinction
Gram negative
Marine bacteria isolation
Antitumor activity screening

Secondary metabolites

1. Introduction

Oceans are the biggest environment on earth covering more than 70% of its surface [1]. Every year, hundreds of new marine-based chemical entities are discovered and can be used for a great variety of applications [2], many of which are natural products that were isolated from marine macro-organisms, or the microbiota living within them in a symbiotic association [3]. Although, the cultivation of this unknown bacteria is still challenging, it paves the way for future potential applications. The term “Great Plate Count Anomaly” claims that less than 1% of the microbial biodiversity in a biological sample is able to grow in artificial conditions [4]. Thus, the development of new approaches and culturing techniques is an issue of great importance for drug discovery programs. One of these isolation techniques is Dilution-to-Extinction (DTE) [5, 6, 7, 8], used mainly for the isolation of oligotrophic marine bacteria, and is known for its successful isolation of a SAR11 clade representative [6]. Nevertheless, oligotrophic bacteria are not among the best candidates for drug discovery because of their small genome sizes and slow growing rates [9]. *Streptomyces* and other genera of actinobacteria are the main source of the production of a vast majority of the natural products with bioactivity [10], attracting most of the attention and effort from researchers. However, genome mining [11] and recent discoveries [12] suggest an untapped potential of Gram-negative bacteria for secondary metabolites biosynthesis. This work describes a protocol that uses the DTE approach for the isolation of those groups.

One of the fields where marine natural products have been quite successful is in the fight against cancer with drugs such as Yondelis[®] or Aplidin[®] which are already on the market [13]. In addition, powerful anticancer compounds like labrenzin [12], prodigiosin [14], or didemnin B [15] have been isolated from marine Gram-negative bacteria.

The increasing incidence of cancer and the urgent need for new treatments make necessary the development of high-throughput isolation and screening protocols with automation and miniaturization being two cornerstones for high throughput. The new platform puts

together micro-fermentations in 384-well plates with automated liquid handling and measuring steps laying the groundwork for further scaling.

This chapter describes the isolation platform used mainly with Gram negative, coupled with an antiproliferative test, for the discovery of new anticancer compounds, described from the isolation to the final de-replication steps.

2. Materials

2.1. Sample Preparation

1. Frozen ($-30\text{ }^{\circ}\text{C}$) marine sample preserved with glycerol (20% v/v).
2. Sterilized ceramic mortar.
3. Stainless steel filter holder with (80 μm pore size filter).
4. Sterile syringe for pressure filtering.
5. Sterile 200 and 1500 μL microtubes.
6. Laminar flow cabinet.
7. Vortex mixer.

2.2. Colony Forming Unit and Dilution Calculation

1. Petri dishes with solid medium Marine Broth (Difco[®] 2216) with cycloheximide (0.02% w/v).
2. Sterile Digrafsky spreader.
3. Sterile water with 27 g/L of Sea Salts (Pro Reef[®]).
4. Micropipettes (20–200 μL and 100–1000 μL).
5. Vortex mixer.

6. Incubator.
7. Stereo microscope.
8. Laminar flow cabinet.

2.3. Isolation Cultures

1. Liquid medium Marine Broth (Difco[®] 2216) with cycloheximide (0.02% w/v).
2. Microtiter plates (clear polystyrene, flat-bottom, 384-well).
3. Laminar flow cabinet.
4. Falcon tubes.
5. Micropipettes (2–20 μ L, 20–200 μ L, and 100–100 μ L).
6. Pipettes (25 mL).
7. Vortex mixer.
8. Liquid handling robot with 96–384 channel head (Tecan[®] EVO100).
9. Sterile sealing bags.
10. Rotatory shaker.
11. Spectrophotometer.
12. High-precision liquid handler with independent channels (Hamilton[®] MLStar).
13. Deep-well plates (polypropylene, 2.2 mL, 96-well, square, round-bottom, polystyrene cover).
14. Multiplate dispenser (Thermo[™] Multidrop[™] Combi).

2.4. Induction Cultures

1. Glycerol 60% (v/v) with artificial sea water (sterilized water with 27 g/L of Sea Salts, Pro Reef[®]).
2. 2MPD1 F medium: Soybean flour 5 g/L, bacto peptone 4 g/L, corn steep powder 1 g/L, mannitol 20 g/L, CaCO₃ 15 g/L, and Sea Salts (Pro Reef[®]) 10 g/L.
3. 3MTM F medium: Soybean flour 10 g/L, corn steep powder 5 g/L, glycerol 5 g/L, CaCO₃ 5 g/L, and Sea Salts (Pro Reef[®]) 36 g/L.
4. Deep-well plates (polypropylene, 2.2 mL, 96-well, square, round-bottom, polystyrene cover).
5. Multiplate dispenser (Thermo[™] Multidrop[™] Combi).
6. Liquid handling robot with 96–384 channel head (Tecan[®] EVO100).
7. Rotatory shaker.

2.5. Extraction

1. Liquid handling robot with 96–384 channel head (Tecan[®] EVO100).
2. Lyophilizer (LyoBeta 25 Telstar[®]).
3. Organic solvent mixture: Methanol:acetone:water (1:1:0.2 v/v/v).
4. Rotatory shaker.
5. Desktop centrifuge.
6. Deep-well plates (1.2 mL, round well).
7. Vacuum concentrator (Speed Vac[®] Savant).

2.6. Screening Test

2.6.1. Antitumor Activity Test

1. Human tumor cell lines: A549 (ATCC CCL-185, lung carcinoma NSCLC), PSN-1 (ATCC CRL-3211, pancreas adenocarcinoma), MDA-MB-231 (ATCC HTB-26, breast adenocarcinoma), HT-29 (ATCC HTB-38, colon adenocarcinoma).
2. Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM) supplemented with fetal bovine serum (FBS, 10%), L-glutamine (2 mM), penicillin (100 U/mL), and streptomycin (100 U/mL).
3. Multiplate dispenser (Thermo™ Multidrop™ Combi).
4. Microtiter plates (96-well, flat-bottomed).
5. Liquid handling robot with 96–384 channel head (Tecan® EVO100).
6. Spectrophotometer.

2.6.2. Antibacterial Activity Test

1. Target strains, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, and *Candida albicans*.
2. Liquid medium Marine Broth (Difco® 2216).
3. Multiplate dispenser (Thermo™ Multidrop™ Combi).
4. Microtiter plates (96-well, flat-bottomed).
5. Liquid handling robot with 96–384 channel head (Tecan® EVO100).
6. Spectrophotometer.

2.7. Molecular De-Replication

1. Solid Marine Broth (Difco[®] 2216) medium.
2. Sterile inoculation loops.
3. DNA extraction kit (DNeasy Blood & Tissue Kit, Qiagen).
4. ERIC-2 primer (5'-AAG-TAA-GTG-ACT-GGG-GTG-AGC-G-3'). Dissolve with AMBION water to obtain a 10- μ M stock solution. Store in aliquots at -20 °C.
5. Purified water (AMBION, ThermoFisher[®]).
6. Thermocycler.
7. Capillary electrophoresis analyser (QIAxcel advanced, Qiagen[®]).
8. 500 U GoTaq DNA Polymerase (Promega[®]).
9. 100 mM deoxynucleotide triphosphates (dNTPs) (Promega[®]). A 10 mM working solution is obtained by adding one part of the mix (100 mM) to nine parts of AMBION water. Store in aliquots at -20 °C.
10. QIAxcel DNA High Resolution Kit (Qiagen[®]).
11. QX Alignment Marker 15 bp/3 kb (Qiagen[®]).
12. QX DNA size marker 100 bp–2.5 kb. (Qiagen[®]).
13. Mineral oil.
14. 96-well PCR plate.
15. PCR Foil Seal. Adhesive Seal Sheets (4Tititude[®]).

2.8. Chemical De-Replication

1. Vacuum concentrator (Speed Vac[®] Savant[®]).

2. Methanol HPLC grade.
3. Vortex mixer.
4. LC/MS 6230 TOF (Agilent®).
5. Column Acquity® UPLC BEH C18 1.7 µm.
6. Mobile phase: water/acetonitrile (0.4% v/v)/formic acid (0.4% v/v).
7. Marine natural products profiles database.

2.9. 16S rRNA Taxonomy

1. Solid Marine Broth (Difco® 2216) medium.
AQ2
2. Sterile inoculation loops.
3. 16S rDNA primers (63-F, 5' -CAGGCCTAACACATGCAAGTC-3' and 1387R 5' -GGGCGGWGTGTACAAGGC-3'). Dissolve with AMBION water to obtain a 10-µM stock solution. Store in aliquots at -20 °C.
4. Thermocycler.
5. DNA sequencer for Sanger sequencing (3730 DNA Analyser, ThermoFisher Scientific).
6. 500 U GoTaq DNA Polymerase (Promega®).
7. 100 mM deoxynucleotide triphosphates (dNTPs) (Promega®). A 10 mM working solution is obtained by adding one part of the mix (100 mM) to nine parts of AMBION water. Store in aliquots at -20 °C.

3. Methods

The method described here is based on the use of the homogenized sample as inoculum after a probability and dilution calculation in order to get pure cultures from microfermentations on 384-well microtiter plates. Grown cultures are retrieved from the isolation plates and cultured for secondary metabolism induction and antiproliferative activity detection. This method takes advantage of the low number of Gram-negative strains with antitumor activity in marine samples, placing the induction cultivation and antiproliferative tests right after isolation culturing avoiding the capture of non-interesting strains in the process. Only strains that show antitumor activity go on to de-replication steps improving the performance of the process. The method could also be suitable for antibacterial compound detection replacing the antitumor activity test by a liquid antibiogram (*see Note 1*).

3.1. Sample Preparation

1. Defrost the marine sample at 4 °C overnight.
2. Homogenize thoroughly the sample with the help of a mortar (*see Note 2*).
3. Filter the homogenized volume through an 80- μ m mesh in order to discard debris and bigger particles (*see Note 3*).
4. Distribute the final volume in 200 μ L aliquots and preserve it at -80 °C.

3.2. Colony-Forming Unit and Dilution Calculation

1. Defrost one 200 μ L aliquot of the homogenized sample.
2. Prepare 1 mL serial dilutions with 100 μ L, 10 μ L, and 1 μ L of the homogenized and filtered sample (*see Note 4*).
3. Spread on Petri dishes with Marine Agar three replicates of 100 μ L from each dilution.
4. Incubate the plates for 7 days at 28 °C.

5. Count the colonies on each plate and calculate the average number of colony-forming units (CFUs) (*see Note 5*).
6. Calculate the sampled volume to be inoculated per 384-well microtiter plate with a probability calculation of independent events: $P_{AB} = P_A * P_B$ (*see Note 6*).

3.3. Isolation Cultures

3.3.1. Inoculation and Culturing

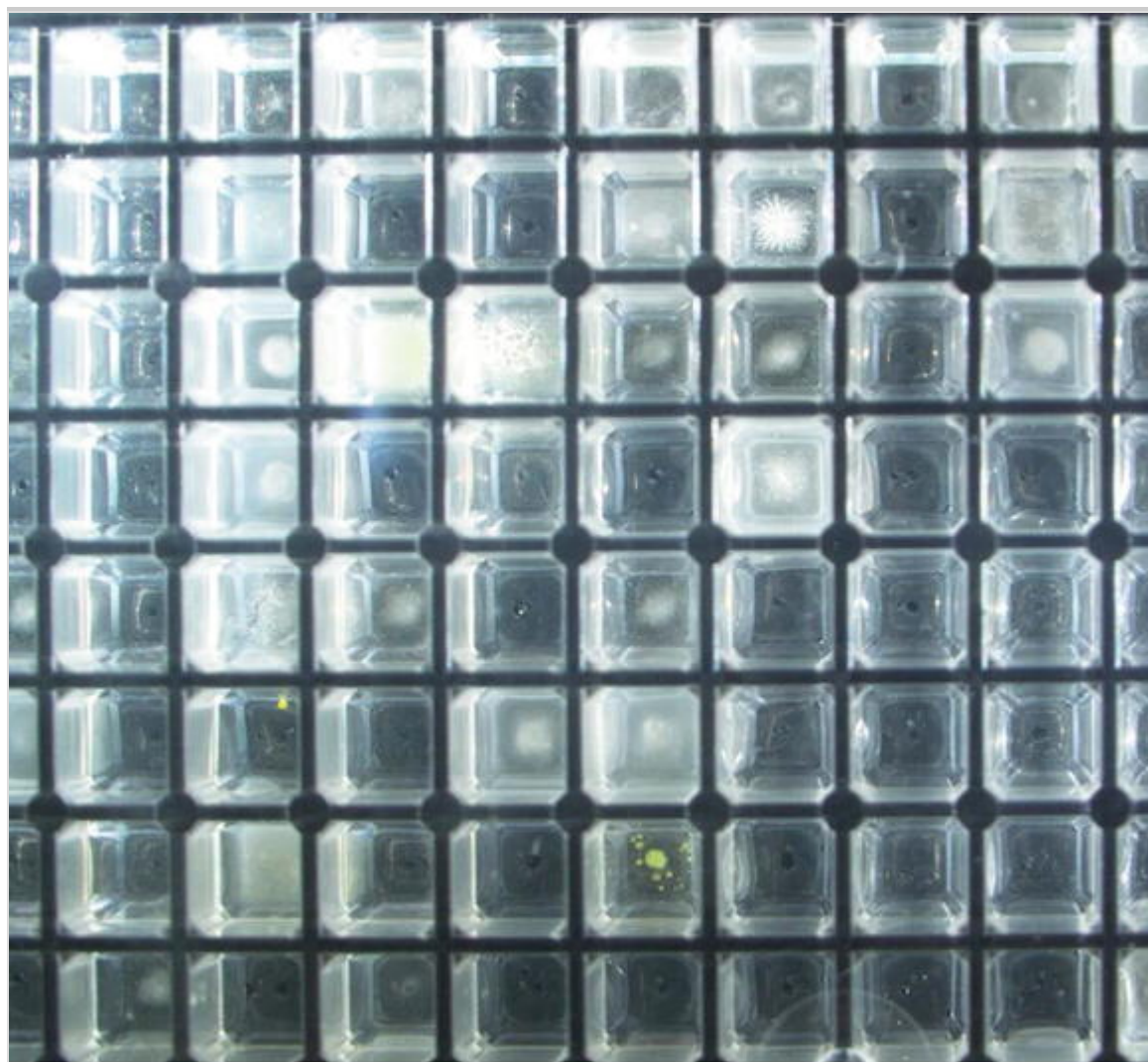
1. Dilute the calculated volume of filtered sample into the volume of Marine Broth needed for the inoculation of a number of 384-well microtiter plates (*see Note 4*).
2. Fill the microtiter plates with 40 μL /well of Marine Broth medium.
3. Inoculate the filled plates with 10 μL /well of the dilution prepared in **step 1** (*see Note 7*).
4. Seal all plates into sterile bags to prevent evaporation.
5. Incubate the plates for 5 days at 28 °C and 4 g on a rotatory shaker.

3.3.2. Isolation

1. Measure cultures absorbance at 600 nm (Fig. 1).
2. Create a worklist with all wells with an absorbance value over an OD_{600} 0.3 threshold (*see Note 8*).
3. Inoculate all culture volume retrieved from the grown wells and inoculate 96-well plates filled with 500 μL /well of marine broth medium.
4. Incubate the cultures for 72 h at 28 °C and 4 g on a rotatory shaker.

Fig. 1

Example of a 384-well plate with colonies growth



3.4. Induction Cultures

1. Inoculate 15 μL of each culture from the previous step into two induction mediums (3MTM F and 2MPD1 F) (500 μL /well) (*see Note 9*).
2. Add 150 μL of glycerol 60% (v/v) with artificial sea water on the remaining volume and shake for mixing.
3. Preserve by freezing the inoculums with glycerol at $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$ (*see Note 10*).

4. Incubate the induction cultures for 5 days at 28 °C and 3 g in a rotatory shaker.
5. After incubation, mix 300 µL of each culture from the same inoculum in a 96-well plate and freeze at −30 °C.

3.5. Extraction

1. Lyophilize the cultures.
2. Pour 1500 µL of a mixture of methanol, acetone, and water (1:1:0.2 v/v) into each lyophilized well.
3. Shake the mixture for 1 hour at 2 g in a rotatory shaker.
4. Centrifuge the plates at 4 °C and 1800 × g for 10 min.
5. Transfer 1000 µL of each supernatant to a deep-well plate.
6. Evaporate the extracts for 16 h in a vacuum dryer.
7. Preserve the dried extracts at −30 °C.

3.6. Screening Test

3.6.1. Antitumor Activity Tests

1. Grow human tumor cell lines in supplemented DMEM medium at 37 °C, 5% CO₂, and 98% humidity.
2. Trypsinization of the cell cultures for harvesting.
3. Resuspend the cancer cells in fresh DMEM medium.
4. Count cells in Neubauer chamber for plating.
5. Dispense 5000 cells/well in 150 µL aliquots in 96-well microtiter plates.

6. Incubate cells for 18 h to allow them to attach (37 °C, 5% CO₂, and 98% humidity).
7. Dissolve dried extracts in fresh DMEM medium with DMSO (4%) (*see Note 11*).
8. Treat the culture plates with 50 µL aliquots of the extract solutions.
9. Incubate treated plates for 48 h (37 °C, 5% CO₂, and 98% humidity).
10. Measure OD₄₉₀ for cell growing.
11. Estimate cell growth and survival by applying the NCI algorithm [16].

3.6.2. Antibacterial Activity Tests

1. Grow target strains *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, and *Candida albicans* in Marine Broth (Difco® 2216) at 37 °C for 48 h.
2. Dilute grown cultures to an OD₆₀₀ below 0.2.
3. Dispense 100 µL aliquots of the diluted cultures in 96-well microtiter plates.
4. Dissolve dried extracts in fresh Marine Broth (Difco® 2216) with DMSO (4%) (*see Note 11*).
5. Treat the culture plates with 50 µL aliquots of the extract solutions.
6. Incubate treated plates for 48 h at 37 °C.
7. Measure OD₆₀₀ for cell growing (OD₆₀₀ > 0.3).

3.7. Molecular De-Replication

1. Defrost at room temperature the frozen cultures whose extracts showed antiproliferative activity.
2. Spread 20 μL of every culture which had showed anticancer activity on Petri dishes with solid marine broth medium.
3. Incubate for 7 days at 28 $^{\circ}\text{C}$ and check for purity with the help of a stereomicroscope (*see Note 12*).
4. Extract genomic DNA from pure isolates with the extraction kit.
5. Perform PCR for ERIC-PCR genomic fingerprinting. Prepare a PCR reaction containing 10 μL of the standard 10 \times Taq Reaction Buffer, 1 μL of 10 mM dNTPs (200 μM final concentration), 5 μL of 10 μM ERIC-GTG5 (1 μM final concentration), 0.25 μL of Taq DNA Polymerase (1.25 U final concentration), 5 μL of DNA extract from Subheading 3.7, and AMBION water to a final volume of 50 μL . PCR parameters: Initial Denaturation 95 $^{\circ}\text{C}$ 30 s. 34Cycles 94 $^{\circ}\text{C}$ 3 min/52 $^{\circ}\text{C}$ 30 s/72 $^{\circ}\text{C}$ 4 min. Final Extension 72 $^{\circ}\text{C}$ 10 min. Hold 4–10 $^{\circ}\text{C}$.
6. Electrophoretic analysis of PCR amplification fragments using the capillary-system QIAxcel (Qiagen).
7. Analysis of the band sizes profile to discard repeated strains.

3.8. Chemical De-Replication

1. Collect the spare volume of the extracts with cytotoxic activity that belong to the remaining strains and vacuum dry for 24 h.
2. Dissolve the dried extract with 100 μL of HPLC-grade methanol and inject 1 μL for HPLC analysis. HPLC run parameters: 25 $^{\circ}\text{C}$ /0.65 mL/min/wavelengths 215 and 254 nm.
3. Discard strains that synthesize known compounds and select those with unidentified activity for the next step.

3.9. Molecular Taxonomy

1. Perform a PCR reaction containing 10 μL of the standard $10\times$ Taq Reaction Buffer, 1 μL of 10 mM dNTPs (200 μM final concentration), 10 μL of 10 μM ERIC-GTG5 (1 μM final concentration), 0.25 μL of Taq DNA Polymerase (1.25 U final concentration), 5 μL of the purified DNA obtained in Subheading 3.7, and AMBION water to a final volume of 50 μL . PCR parameters: Initial Denaturation 95 $^{\circ}\text{C}$ 1 min. 30 cycles 95 $^{\circ}\text{C}$ 1 min/58 $^{\circ}\text{C}$ 50 s/72 $^{\circ}\text{C}$ 1 min. Final Extension 72 $^{\circ}\text{C}$ 10 min. Hold 4–10 $^{\circ}\text{C}$.
2. Sanger sequencing of the DNA fragments from PCR.
3. Analysis of the resulting sequences for homology with sequence databases and assign taxonomy to the isolated strains.

4. Notes

1. For antibacterial screening, skip Subheading 3.6.1.
2. Marine macro-organisms are extremely diverse; therefore, a good homogenization could require higher or lower efforts depending on the sample.
3. Filtration helps with reproducibility of the solid media plating replicates by removing the biggest particles. Even though, thinner pore size than 80 μm could affect the number of UFCs/ μL . Use a sterile filter for each sample.
4. Shake the homogenized sample for at least 30 s to improve reproducibility at every step that involves homogenized sample pipetting.
5. The first dilution plates were inoculated with 10 μL of the homogenized sample, the second with 1 μL , and the third with 0.1 μL . Calculate the average number of colonies per μL obtained each dilution. Note that colony numbers per plate over 100 involve inhibition phenomena leading to incorrect

calculations. For calculation purposes, select dilutions with an average number between 20 and 100 colonies per plate.

6. PAB is the calculated probability, being PA and PB the probability of each independent event. For a 5% of twice inoculated wells (PAB), the calculated number of colony-forming units per plate would be 85.86 (N), given that PA and PB probability for a 384-well is N/384. Once the number of colonies per μL is known, the dilution for plate inoculation can be performed.
7. A 20% v/v inoculum dilution volume is set in order to improve accuracy. This volume could be changed depending on the liquid handling device used at this step.
8. OD600 values about 0.2 are also suitable assuming a lower number of grown cultures in the next step.
9. Both induction mediums had been developed specifically for antitumor activity induction. Although some antibiotics synthesis could be elicited, specific media should be used for antibiotic screening.
10. For long preservation periods (over 3 months) $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ would be preferable.
11. Extracts must be shaken until it is sure that they are completely dissolved. The shaking time that is needed could change depending on the extract.
12. A number of mixed cultures would be expected (5%).

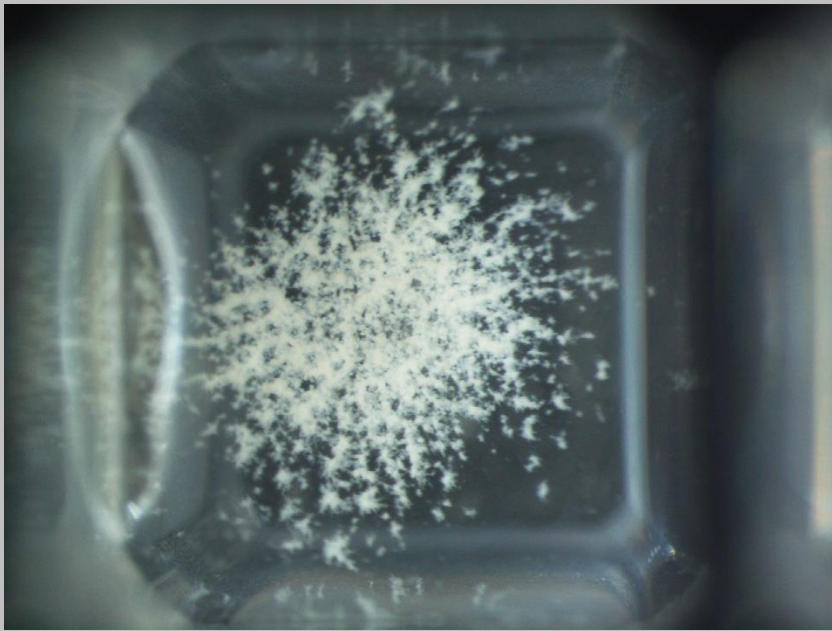
Acknowledgments

The authors wish to thank the Research and Development Area of PharmaMar with special thanks to Microbiology, Screening and Natural Products departments, all of them involved in this protocol development.

References

1. Ameri A (2014) Marine microbial natural products. *Jundishapur J Nat Pharm Prod* 9:8–9
2. Carroll AR, Copp BR, Davis RA et al (2019) Marine natural products. *Nat Prod Rep* 36:122–173
3. Nigam M, Suleria HAR, Farzaei MH et al (2019) Marine anticancer drugs and their relevant targets: a treasure from the ocean. *DARU, J Pharm Sci* 27:491–515
4. Staley JT, Konopka A (1985) Measurement of in situ activities of nonphotosynthetic microorganisms in aquatic and terrestrial habitats. *Annu Rev Microbiol* 39:321–346
5. Schut F, Vries EJ, de Gottschal JC et al (1993) Isolation of typical marine bacteria by dilution culture: growth, maintenance, and characteristics of isolates under laboratory conditions. *Appl Environ Microbiol* 59:2150–2160
6. Rappé MS, Connon SA, Vergin KL et al (2002) Cultivation of the ubiquitous SAR11 marine bacterioplankton clade. *Nature* 418:630–633
7. Mohamed R (2013) Dilution-to-extinction culturing of SAR11 members and other marine bacteria from the Red Sea
8. Castro DJ, Llamas I, Béjar V et al (2017) *Blastomonas quesadae* sp. Nov., isolated from a saline soil by dilution-to-extinction cultivation. *Int J Syst Evol Microbiol* 67:2001–2007
9. Overmann J, Abt B, Sikorski J (2017) Present and future of culturing Bacteria. *Annu Rev Microbiol* 71:711–730
10. Takahashi Y, Nakashima T (2018) Actinomycetes, an inexhaustible source of naturally occurring antibiotics 7:45

11. Machado H, Sonnenschein EC, Melchiorson J et al (2015) Genome mining reveals unlocked bioactive potential of marine Gram-negative bacteria. *BMC Genomics* 16:1–12
12. Schleissner C, Cañedo LM, Rodríguez P et al (2017) Bacterial production of a pederin analogue by a free-living marine alphaproteobacterium. *J Nat Prod* 80:2170–2173
13. Jimenez PC, Wilke DV, Branco PC et al (2020) Enriching cancer pharmacology with drugs of marine origin. *Br J Pharmacol* 177:3–27
14. Darshan N, Manonmani HK (2015) Prodigiosin and its potential applications. *J Food Sci Technol* 52:5393–5407
15. Tsukimoto M, Nagaoka M, Shishido Y et al (2011) Bacterial production of the tunicate-derived antitumor cyclic depsipeptide didemnin B. *J Nat Prod* 74:2329–2331
16. Shoemaker RH (2006) The NCI60 human tumour cell line anticancer drug screen. *Nat Rev Cancer* 6:813–823



UAM

Universidad Autónoma
de Madrid

*Pharma
Mar*

