

PROSPECCIÓN DE MOLECULAS BIOACTIVAS PRODUCIDAS POR LEVADURAS Y HONGOS FILAMENTOSOS PSICROFILOS MARINOS ORIGINARIOS DE LA ANTÁRTIDA ARGENTINA SOMETIDOS A ESTRÉS BIOLÓGICO

OBJETIVO GENERAL

Estudio del potencial biotecnológico para la producción de compuestos bioactivos, de levaduras y hongos filamentosos provenientes de ecosistemas marinos antárticos.

OBJETIVOS PARCIALES

1. Desarrollar y sistematizar una colección de levaduras y hongos filamentosos aislados a partir de muestras obtenidas de diversos biotopos marinos antárticos durante las campañas antárticas de verano (CAVs) organizadas por el Instituto Antártico Argentino.
2. Identificar, aplicando taxonomía molecular y técnicas de espectrometría de masas (MALDI-TOF), los nuevos aislamientos obtenidos. Construcción de bases de datos que vinculen y den coherencia a las diferentes metodologías.
3. Realizar co-cultivos y cultivos puros de los hongos filamentosos pertenecientes a diferentes géneros y especies, como mecanismo para estimular la expresión de metabolitos codificados por grupos de genes silentes.
4. Identificar y caracterizar, en los extractos obtenidos de estos cultivos puros y co-cultivos, la presencia de compuestos bioactivos (antimicrobianos, antivirales, antitumorales, etc.) mediante espectrometría de masas y de compuestos antimicrobianos por técnicas convencionales.

RELEVANCIA DEL PROBLEMA

Búsqueda de moléculas bioactivas en microorganismos

Los compuestos bioactivos presentan una mayor diversidad estructural en comparación a los obtenidos por síntesis química, representando una fuente potencialmente infinita de diversidad química y, como consecuencia, con una amplia gama de potenciales actividades biológicas (Demain, 2014). Los productos naturales o compuestos derivados de ellos, constituyeron más del 35% de las drogas aprobadas y/o pre-candidatas para nuevas aplicaciones medicinales en el período entre 1981 y 2010, y el 48,6% desde 1940 en el caso de fármacos contra el cáncer desde 1940 (Newman y Cragg, 2012).

De aproximadamente 1 millón de productos naturales, cerca de un 25% son biológicamente activos. De éstos, un 60% provienen de plantas, y la mayoría del resto, de microorganismos. Dentro de este último grupo, los hongos se destacan como los productores más prolíficos de compuestos bioactivos, con cerca de un 42% del total de los compuestos (Demain, 2014).

Resistencia antimicrobiana

Una problemática mundial emergente es la resistencia antimicrobiana, que disminuye las posibilidades de prevención y tratamiento de enfermedades infecciosas causadas por virus, bacterias,

parásitos y hongos. Un informe de la Organización Mundial de la Salud (OMS) presentó un aumento de la morbilidad y mortalidad de las enfermedades infecciosas debidas a la resistencia antimicrobiana, lo que podría causar una pérdida económica mundial de hasta 100 billones de dólares estadounidenses en 2050 como resultado de un 2% -3% de pérdida del producto bruto interno (PBI). Actualmente se estima que la resistencia a antimicrobianos produce 700000 muertes al año y que ese número podría llegar a 10 millones en 2050 (Indraningrat y col., 2017).

En esa lucha entre los seres humanos y los agentes infecciosos, el desarrollo de nuevos tipos de compuestos antimicrobianos con pronunciada bioactividad es urgente. Los esfuerzos para modificar los medicamentos existentes a menudo no son eficaces para superar la tasa de mutación de patógenos y no conducen a la introducción de nuevas clases de antimicrobianos (Indraningrat y col., 2017).

Hongos y levaduras de ambientes extremos marinos como fuente de nuevos compuestos bio-activos

Cada hongo tiene un metabolismo que le es particular. Una estrategia efectiva para encontrar nuevos compuestos es el estudio de todo el metaboloma de nuevas especies, así como el estudio de aquellos que no han sido investigados. Las posibilidades de que se aislen nuevas especies de hongos son mayores si las muestras provienen de ambientes no mesófilos, tales como aquellos con alta salinidad, alta radiación, nutrientes limitados, temperaturas y presiones extremas y acidez variable (Nosanchuk y Casadevall, 2003; Timling y Taylor, 2012; Gunde-Cimerman y Zalar, 2014). Debido a que los hongos de hábitats extremos están sometidos a condiciones ambientales muy alejadas de aquellas que son habituales para los hongos mesófilos (que representan la fracción mejor conocida y más explorada), se espera que muchos de los compuestos que sintetizan sean específicos y por ende novedosos.

Con relación al hábitat elegido como objeto de estudio, por muchos años las actividades de prospección de hongos filamentosos y levaduras marinas fueron muy escasas en comparación con las que se centraron en las bacterias. El motivo fundamental fue la baja abundancia de estos microorganismos en los ambientes marinos, así como las dudas acerca de si son estrictamente marinos, o se adaptaron a esas condiciones. A pesar de eso, varios grupos de hongos estrictamente marinos han sido descritos y estudiados. Si bien varios hongos marinos se han obtenido a partir de sedimentos o del agua libre, la mayoría de ellos se aislaron asociados a macroorganismos, como ser algas y esponjas, ya que al filtrar el agua acumulan en su interior una gran cantidad de individuos pertenecientes a géneros abundantes en la mayoría de los ambientes marinos, como ser *Penicillium*, *Aspergillus*, *Fusarium* o *Trichoderma*, pero por el proceso de acumulación, suelen encontrarse en su interior géneros menos comunes, como ser *Beauveria*, *Botryosphaeria*, *Epicoccum*, *Tritirachium* y *Paraphaeosphaeria*. Para estimar el potencial de los hongos marinos para la producción de compuestos bioactivos es importante conocer la diversidad filogenética del ambiente a estudiar (Imhoff, 2015).

Según bibliografía disponible, en los últimos 50 años, se han aislado más de 20.000 compuestos bioactivos a partir de organismos marinos. En el año 2012, fueron reportados 1241 nuevos compuestos, lo que indica que el mar es una fuente casi infinita de nuevos compuestos con actividad biológica. Sin embargo, de estos compuestos sólo ocho están aprobados para su uso (Cytarabine (Cytosar-U®, Depocyt®), Vidarabine (Vira-A®), Ziconotide (Prialt®), étil ésteres de ácidos Omega 3

(Lovaza®), Trabectedin (Yondelis®), Mesilato de eribulina (Halaven®), Brentuximab vedotin (Adcetris®), Iota carrageenan (Carragelose®). Además existen otros 12 en diferentes fases clínicas. Se estima que el mercado global de compuestos bioactivos marinos llegó a 8.600 millones de dólares en 2016. Para entender más la importancia de estos temas se debe tener en cuenta que en Europa existen casi 600 proyectos de investigación de bioprospección de compuestos marinos, subvencionados por los programas FP6 y FP7 de la Comisión Europea de Investigación e Innovación (los que manejan aproximadamente 70.000 millones de euros (Martins et al., 2014). En conclusión, el estudio de compuestos bioactivos de origen marino constituye un área de investigación estratégica, de gran impacto tanto económico como social, a nivel mundial.

Por todo lo antes expuesto, los hongos de ambientes extremos y marinos son excelentes candidatos potenciales para el aislamiento de nuevos compuestos bioactivos y este interés se ha reflejado en el progresivo aumento de los artículos publicados que reportan nuevos compuestos a partir de hongos de ambientes extremos (Chavez y col., 2015)

Microorganismos psicrófilos marinos de Antártida Argentina y su potencial aplicación biotecnológica

Uno de los ambientes extremos más extensos y menos explorados del planeta lo representan las regiones permanentemente frías, tales como las áreas polares del Ártico y el continente Antártico. Dentro de los diferentes grupos de extremófilos, los microorganismos adaptados al frío, o psicrófilos pueden desarrollarse incluso a 0°C. Estos microorganismos, a diferencia de sus pares mesófilos, presentan sistemas biológicos activos a baja temperatura. Esta característica representa una gran ventaja tecnológica ya que, por ejemplo, un proceso industrial que utilice un microorganismo psicrófilo o algún producto de su metabolismo presentará, en general, menores requerimientos energéticos y menores costos asociados (Schmidt y Stougaard 2010, Wierzbicka-Woś y col., 2011). Diferencias en la composición de las membranas, enzimas menos rígidas y moléculas anticongelantes son muestras de los mecanismos de adaptación de estos organismos.

La Antártida representa el sitio más adecuado para la búsqueda y el estudio de microorganismos psicrófilos marinos. La misma se encuentra durante todo el año sometida a temperaturas que raramente superan el punto de congelamiento del agua y, si bien puede considerarse más accesible que los grandes fondos marinos (junto con las regiones polares, la otra gran región del planeta con condiciones de "psicrofilia" permanente), su situación geográfica, su difícil acceso e incluso la legislación internacional a nivel diplomático y político de sus tierras y mares, la hacen una región aún muy poco explorada en cuanto a su biodiversidad microbiana. La importancia de contar con colecciones de microorganismos provenientes de este ambiente fue reafirmada recientemente por el Comité del Tratado Antártico como paso fundamental para la bioprospección (ATCM 2010, 2014).

Sin el conocimiento de la biodiversidad presente en los diferentes ecosistemas Antárticos, no sería posible el descubrimiento de microorganismos con nuevas rutas metabólicas que permitan el desarrollo de nuevos compuestos con aplicación biotecnológica.

Técnicas para explotar el potencial metabólico de hongos extremos

Como se mencionó anteriormente, los hongos filamentosos producen una gran cantidad de compuestos que pueden tener actividad biológica. El número creciente de genomas de hongos filamentosos que se ha secuenciado confirma la presunción de que el potencial metabólico de los mismos ha sido escasamente explorado. Actualmente se sabe que muchos de los genes involucrados en la síntesis de metabolitos secundarios en hongos se encuentran agrupados en clústeres (Brakhage y col., 2008, Brakhage y Schuemann, 2011) y muchos de ellos son silentes en condiciones estándar de cultivo. Este comportamiento hace que, aunque el hongo posea el potencial genético para sintetizar una molécula determinada, no sea posible obtener la misma (y ni siquiera saber de su existencia) ya que no es sintetizada en las condiciones estándar de cultivo (Netzker y col., 2015). El stress, o el cambio de las condiciones de crecimiento, pueden resultar en un comportamiento fisiológico significativamente distinto, con la consecuente producción diferencial de metabolitos.

En los últimos diez años, varios métodos han sido desarrollados para intentar activar estas rutas biosintéticas silentes. Además de las técnicas que requieren el conocimiento previo del genoma de los microorganismos estudiados, se desarrollaron varias herramientas genoma-independientes. Uno de estos enfoques es el co-cultivo de microorganismos, que implica el desarrollo de dos o más microorganismos en un mismo ambiente confinado. Esta interacción tiene el potencial de generar un estrés biológico que resulte en la activación de grupos de genes silentes. Esta técnica se inspira en lo que sucede en las comunidades microbianas naturales, donde los microorganismos interactúan a través de moléculas de señalización o defensa. Esos compuestos, producidos de forma dinámica, son de interés potencial, especialmente para el desarrollo de nuevos fármacos. El co-cultivo se puede lograr en medios sólidos o líquidos y, en los últimos años se ha acrecentado su utilización para estudiar las interacciones naturales y descubrir nuevos metabolitos bioactivos (Bertrand y col., 2013, 2014a,b).

RESULTADOS PRELIMINARES Y APORTES AL TEMA DE LOS DIRECTORES Y DEL GRUPO DE INVESTIGACIÓN

El **Grupo de Microbiología del Instituto Antártico Argentino**, que tiene como sede institucional los laboratorios ubicados en el predio de la Universidad Nacional de San Martín y que trabaja en convenio con el Instituto de Nanobiotecnología (NANOBIOTEC-UBA-CONICET), ha desarrollado investigaciones relacionadas con la bioprospección de compuestos de interés biotecnológico producidos por organismos psicrófilos desde hace más de 10 años. El aislamiento, caracterización y estudio de la producción de proteasas de bacterias antárticas permitió la publicación de numerosos trabajos científicos sobre el tema (Vazquez y col., 2004, 2005, 2008a, b, Tropeano y col., 2012, 2013).

El estudio y caracterización de hongos antárticos también ha sido foco de investigación del grupo de trabajo desde hace más de 10 años. Se han descrito nuevas especies (Stchigel y col. 2003, 2013) y se han reportado y caracterizado numerosos hongos obtenidos de diversos ambientes de clima frío extremo (Comerio y Mac Cormack 2004, Stchigel y col., 2004, 2007, 2008, 2009).

Finalmente, el grupo ha participado de un programa de bioprospección, aislamiento, caracterización bioquímica y molecular de cepas bacterianas antárticas. Este proyecto conjunto entre la Dirección Nacional del Antártico-Instituto Antártico Argentino (DNA-IAA) y la empresa Biosidus ha permitido al

grupo describir una nueva especie bacteriana: *Bizionia argentinensis* (Bercovich y col., 2008) y realizar la secuenciación completa de su genoma (Lanzarotti y col 2011), la primera completamente realizada en el país. A partir de dicho proyecto, el grupo ha avanzado en el estudio de la estructura de una enzima (una fosfatasa) seleccionada a partir del genoma de *B. argentinensis*, la cual fue clonada, expresada y su estructura molecular analizada por RMN y cristalografía de rayos X, aportando información inédita acerca de los detalles estructurales de las proteínas adaptadas al frío (Aran y col. 2014).

La experiencia del grupo también es amplia en otras áreas de la biotecnología de microorganismos psicrófilos, especialmente en lo referente a la degradación de hidrocarburos (alifáticos y aromáticos) y el desarrollo y optimización de procesos de biorremediación a bajas temperaturas de suelos contaminados, (Ruberto y col., 2005, 2006, Mestre y col., 2007, Shukor y col 2009, Vazquez y col., 2013, Martínez y col., 2015, 2017).

El **Grupo Biotecnología Fúngica de PROIMI-CONICET**, a su vez, cuenta con una importante experiencia en recolección, aislamiento, bioprospección e identificación de hongos y levaduras de interés biotecnológico tanto para la biorremediación de metales pesados y compuestos orgánicos recalcitrantes (colorantes sintéticos, compuestos fenólicos, aminas aromáticas) (Pajot y col., 2007, 2008, 2011a,b, Martorell y col., 2012a; b, c, 2016; Fernández y col., 2009, 2010, 2012, 2013,2016; Villegas y col., 2005, 2008, 2009a, b) como para la producción, purificación y caracterización de metabolitos de importancia biotecnológica (estatinas, enzimas fibrinolíticas y exopolisacáridos) (Rovati y col., 2010; Viñarta y col., 2006, 2007, 2013a, b; Fariña y col., 2009, Cabral y col., 2010, 2013). La colaboración científica entre el **Instituto Antártico Argentino** y **PROIMI-CONICET**, permitió la presencia de becarios doctorales y postdoctorales y de investigadores asistentes de CONICET en hasta el momento cuatro Campañas Antárticas de Verano, lo que se vio reflejado en la publicación de cuatro artículos en revistas internacionales con referato (Rovati y col., 2013, Viñarta y col., 2015, Fernandez y col., 2017, Martorell y col., 2017) y numerosos trabajos presentados en congresos nacionales e internacionales.

Por último, el **Laboratorio ThoMSon de Espectrometría de Masas**, con el que se trabaja desde hace un año, posee sólida experiencia en microbiología aplicada (Angolini y col., 2015; Domingos y col., 2015; Zampieri y col., 2013; Braga y col., 2013; Barreiro y col., 2012). La determinación de metabolitos producidos por varios géneros de bacterias, incluyendo *Streptomyces wadayamensis*, *Streptomyces coelicolor*, *Bacillus subtilis*, *Mycobacterium smegmatis* y *Pseudomonas aeruginosa*, se llevó a cabo con éxito por IMS (Angolini y col., 2015, Watrous y col., 2012, 2013). A su vez, Tata y col., (2015) demostraron la aplicación de MSI (Mapeo por espectrometría de masas, del inglés *Mass Spectrometry Imaging*) para la identificación de los metabolitos de co-cultivos de hongos que habitan en plantas de cacao, *Monoliophthora roreri*, hongo patógeno endofítico y *Trichoderma harzianum*. Debe tenerse en cuenta también que, durante un Curso CABBIO y una posterior pasantía en el laboratorio ThoMSon de la UNICAMP (Campinas, San Pablo, Brasil), realizados por quien presenta éste proyecto, se llevaron a cabo algunas determinaciones de lípidos intracelulares de hongos y levaduras de Antártida. Estos resultados preliminares, son los que abrieron las puertas a la posibilidad de trabajar en colaboración con este grupo de Brasil, liderado por el Dr. Eberlin, en el área de espectrometría de masas.

Considerando todos estos antecedentes, y combinando el conocimiento hasta ahora desarrollado por los diferentes integrantes de los grupos de trabajo, el presente proyecto constituye una herramienta para continuar con la búsqueda de desarrollos biotecnológicos basados en la actividad de hongos filamentosos marinos antárticos utilizando una herramienta de enorme poder analítico como es la espectrometría de masas. Los resultados serán de gran relevancia en diferentes áreas como ser microbiología aplicada, bioquímica, biotecnología, farmacología y química de productos naturales.

Este plan de trabajo se enmarca en torno al proyecto nacional **Pampa Azul**, una iniciativa del Estado argentino, en el cual intervienen diversas áreas. Está coordinada desde el Ministerio de Ciencia Tecnología e Innovación Productiva y además participan: el Ministerio de Relaciones Exteriores y Culto (ministerio del que depende el Instituto Antártico Argentino, lugar de trabajo propuesto para este plan); el Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca; el Ministerio de Turismo; el Ministerio de Defensa; el Ministerio de Seguridad; y el Ministerio de Ambiente y Desarrollo Sustentable. El objetivo de Pampa Azul es contribuir a profundizar el conocimiento científico como fundamento de las políticas de conservación y manejo de los recursos naturales; promover innovaciones tecnológicas aplicables a la explotación sustentable de los recursos naturales y al desarrollo de las industrias vinculadas al mar; fortalecer la conciencia marítima de la sociedad argentina; y respaldar con información y presencia científica la soberanía de nuestro país en el área del Atlántico Sur. A través de estas investigaciones se podrán comprender los mecanismos que controlan las condiciones ambientales locales y su impacto sobre la producción y la diversidad biológica. Por todo ello se entiende que este proyecto tendrá en el corto plazo un impacto local y, a mediano y largo plazo, podría tener un impacto regional y/o mundial.

Por otro lado, la comercialización de nuevas moléculas bioactivas es un foco de gran interés para las industrias farmacéuticas y biotecnológicas nacionales e internacionales. Por ello, puede considerarse que las mismas son potenciales usuarios de los resultados de este proyecto. En ese sentido, y como se mencionó previamente, los grupos nacionales participantes tienen antecedentes y experiencia en la generación y desarrollo de convenios con la industria, y podrán generar nuevos lazos a partir de los resultados que se vayan obteniendo durante el desarrollo de este proyecto.

HIPÓTESIS DE LA INVESTIGACIÓN

Hongos filamentosos y levaduras aislados de ambientes marinos extremos son una fuente nueva y muy amplia de recursos genéticos, capaces de producir moléculas biológicamente activas de interés biotecnológico y/o farmacéutico.

JUSTIFICACIÓN GENERAL DE LA METODOLOGÍA DE TRABAJO

1. La identificación molecular de hongos filamentosos y levaduras de la Antártida Argentina permitirá no solo comprender mejor la ecología microbiana de ésta región, sino que también aumentará el conocimiento sobre los recursos genéticos existentes en nuestro territorio, afianzando así la soberanía de la nación.

2. La construcción y el mantenimiento de colecciones de hongos filamentosos y levaduras de la Antártida Argentina permitirá un acceso rápido a aquellas cepas que sean de interés en posibles estudios de bioprospección.
3. La detección de metabolitos utilizando espectrometría de masas a partir de hongos de ambientes extremos, permitirá detectar e identificar nuevas moléculas bioactivas con aplicación biotecnológica.
4. El estudio de la actividad antimicrobiana de levaduras y hongos filamentosos de la Antártida Argentina permitirá disponer de nuevas alternativas para resolver los inconvenientes ocasionados por la resistencia bacteriana a antibióticos comúnmente usados en medicina, hecho cada vez más frecuente y que conlleva a pérdidas económica en lo referido al tratamiento y prevención de enfermedades.

ACTIVIDADES Y METODOLOGÍA

Identificación fisiológica y molecular de hongos filamentosos y levaduras marinos provenientes de Antártida Argentina

Se trabajará con aislamientos obtenidos a partir de macroalgas y sedimentos marinos obtenidos de Caleta y Península Potter, en las inmediaciones de la Base Científica Carlini, localizada en Isla 25 de Mayo, Islas Shetland del Sur. Dichos aislamientos se obtuvieron durante las campañas antárticas de Verano 2015/2016 y 2016/2017. Se tomaron muestras de 19 (diecinueve) especies de macroalgas características de la caleta: *Gigartina skottsbergii*, *Plocanium cartilagineum*, *Ballia calliatrichia*, *Georgiella confluens*, *Piconiella plumosa*, *Pantoneura plocamioides*, *Himantothallus grandifolius*, *Desmarestia anceps*, *Halopteris obovata*, *Desmarestia menziesii*, *Palmaria decipiens*, *Adenocystis utricularis*, *Curdiea recovitzae*, *Iridaea cordata*, *Ascoseira mirabilis*, *Pachymenia orbicularis*, *Neuroglossum delessereae*, *Phaeurus antarticus* y *Desmarestia antartica* y 7 muestras de sedimento marino a diferentes profundidades (3-50 metros), de estas muestras se obtuvieron aproximadamente 200 aislamientos de hongos y levaduras.

Se contempla realizar nuevos aislamientos a partir de otros organismos marinos, como esponjas, peces, lapas (*Nacella concina*) y latérnulas (*Laternula elliptica*), para aislar los hongos y levaduras asociados a ellos.

La identificación primaria de los nuevos aislamientos se realizará mediante el análisis del espectro de proteínas ribosomales mediante MALDI-TOF (Autoflex III, Flex Control 3.0 y Biotyper, Bruker Daltonics) (Rellosos y col., 2015).

Una vez obtenido el fingerprint de cada una de las cepas, utilizando programas de estadística se construirán dendrogramas donde se agrupen a los aislamientos en base al perfil de proteínas que hayan presentado y se seleccionará un aislamiento de cada grupo para la confirmación de la identidad mediante biología molecular. De esta manera se reducirá considerablemente el número de aislamientos a analizar mediante esta metodología. Se podrá obtener además, el grado de concordancia existente entre ambas metodologías para las especies en estudio.

Para el análisis por biología molecular se amplificarán por PCR y se secuenciarán el dominio D1/D2 del gen del ARNr 26S (con primers NL1 y NL4) y la región ITS (ITS1-5.8s-ITS2) con primers universales ITS1-ITS4. Si es necesario, para confirmar una potencial especie nueva, se amplificará y secuenciará el gen completo del ARNr 18S (primers NS1-NS8-NS20-NS21) (Martorell y col., 2012a).

Para los hongos filamentosos se utilizará principalmente la amplificación de la región ITS, empleando los primers ITS4 e ITS5. Además, se podrán utilizar primers adicionales, de acuerdo a los criterios específicos para cada grupo taxonómico (tubulina, factor de elongación, citocromo oxidasa, etc.) (Maza y col., 2014).

Las cepas serán conservadas por liofilización y criopreservación (-80°C). También podrán conservarse en glicerol al 40%.

Obtención de extractos celulares de cultivos puros y co-cultivos

Los hongos que representen diferentes géneros y especies serán cultivados en medio PDA (agar papa-dextrosa) a 15°C. Para los cultivos puros se colocará un taco de micelio (obtenido de un cultivo previo en PDA) en el medio de la placa de Petri. Para los co-cultivos, se colocará un taco de micelio de cada hongo en la misma placa de Petri con una distancia entre ellos de 4 cm. Con las levaduras que representen diferentes géneros y especies se trabajará en cultivos puros, en medio YM (*Yeast Mold* agar). Las placas serán incubadas a 15°C y observadas periódicamente para detectar el tipo de crecimiento que presenten y, en el caso de los hongos filamentosos, para la detección de posibles interacciones entre las especies en co-cultivo. Las zonas de interacción de los co-cultivos y la zona que rodea a los cultivos puros (tanto hongos como levaduras), de 2 x 4 cm, serán recortadas con un bisturí estéril, transferidas a tubos Falcons de 15 mL y liofilizadas (Bertrand y col., 2013). El material seco será sometido a procesos de extracción con solventes orgánicos en base a la polaridad de las moléculas de interés. Para terpenos y compuestos de polaridad baja se realizarán extracciones con hexano, para policétidos, alcaloides y compuestos de polaridad más alta se utilizará acetato de etilo y por último, para péptidos y compuestos de mediana polaridad, se empleará metanol (Duarte y col., 2012).

Evaluación de la actividad antimicrobiana de los extractos

La actividad antibacteriana se estudiará a partir de los extractos de cultivos puros y co-cultivos los que serán evaluados con distintas bacterias de referencia utilizando el método de difusión en placa. Para ello se realizará, en cada placa, un “overlay” con agar Müller-Hinton blando (agar 1,5%) conteniendo una de las siguientes cepas indicadoras a una concentración final de aproximadamente 10⁵ UFC/mL: *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Escherichia coli* ATCC 8739, *Candida albicans* ATCC 10231 o *Enterococcus faecalis* ATCC 25212.. Se aplicará una metodología similar para la búsqueda de actividad antifúngica, utilizando como microorganismos “blanco” hongos de relevancia clínica y agrícola (*Aspergillus niger* ATCC 16404, *Diplodia maydis*, *Fusarium subglutians*, *Fusarium graminearum*, *Aspergillus flavus*, *Pastototiopsis ylee*, *Lasiodiplodia theobromae*, *Bipolaris revenelli*). En los casos que sean necesarios, se aplicará también el método de macrodilución propuesto por Fromtling y col (1993). La producción de actividad antimicrobiana o antifúngica se detectará por la producción de halos de inhibición alrededor del

desarrollo de los aislamientos, que se forman como resultado de la inhibición del crecimiento de la cepa indicadora.

Identificación y caracterización de las moléculas bioactivas utilizando HPLC-MS y ESI-MS

Para la detección y determinación de la masa molecular de los compuestos producidos en los cultivos puros y en los co-cultivos, las muestras se analizarán en un sistema HPLC (Agilent 1290 Infinity Sistema LC) acoplado a un espectrómetro de masa Q-ToF-MS (6550 iFunnel, Agilent Technologies). Las masas serán obtenidas por electrospray, en modo positivo (ESI). El análisis de datos se realizará con el programa MetaboAnalyst 3.0 (Xia y col., 2015). Si bien en primera instancia se evaluará la actividad antimicrobiana de los extractos, se prestará especial atención a aquellos metabolitos que se produzcan en co-cultivo, y si son compuestos conocidos, mediante bibliografía se propondrá su posible actividad biológica y a su vez, su rol ecológico en el co-cultivo y en el ambiente natural del cual fueron aislados los microorganismos que lo produjeron. En caso que el metabolito no sea conocido, se evaluará que técnicas utilizar a futuro para determinar su posible actividad biológica.

REFERENCIAS

- Angolini CFF, Vendramini PH, Da Silva Araujo, FD, Wellington L (2015) Anal. Chem., v. 87 (13), 6925-6930.
- ATCM (Antarctic Treaty Consultative Meeting) (2010).
- ATCM (Antarctic Treaty Consultative Meeting) (2014).
- Barreiro JR, Braga PAC, Ferreira CR, Kostrzewa M (2012) Proteomics, 12: 2739–2745. doi:10.1002/pmic.201200053.
- Bentley SD, Chater KF, Cerdeno-Tarraga AM, Challis GL (2002). Nature, 417(6885), 141-147.
- Bercovich A, Vazquez SC, Yankilevich P, Coria SH (2008) Int J Syst Evol Bact, 58:2363-2367.
- Bertrand S, Bohni N, Schnee S, Schumpp O (2014b). Biotechnol Adv 32, 1180-1204.
- Bertrand S, Schump O, Bohni N, Bujard A (2013) J Chromatogr A 1292, 219-228.
- Bertrand S; Azzollini A, Schumpp O, Bohni N (2014a). Mol Biosyst 10, 2289-2298.
- Braga PAC, Tata A, Dos Santos VG, Barreiro JR (2013) RSC Adv. 3,994-1008.
- Brakhage A, Schroeckh V (2011). Fungal genetics and Biology 48, 15-22.
- Brakhage A, Schuemann J, Bergmann S, Sherlach K (2008) Progress in Drug Research, 60: 1-11.
- Cabral ME, Delgado OD, Sampietro SA, Catalán CAN (2010) Res J Microb, 5:833-848.
- Cabral ME, Figueroa LIC, Fariña JI (2013) Revista Iberoamericana de Micología, 30:31-38.
- Chávez R, Fierro F, García-Rico RO, Vaca I (2015) Front. Microbiol. 6:903. doi: 10.3389/fmicb.2015.00903.
- Comerio, RM, Mac Cormack W (2004) Revista Iberoamericana de Micología 21, 128-134.
- Demain AL (2014) J. Ind. Microbiol. Biotechn. 41(2), 185-201.
- Domingos DF, De Faria AF, Galaverna RS, Eberlin MN (2015) Appl. Microbiol. Biotechnol. 99 (7), 3155-3167.
- Duarte K, Rocha-Santos TA, Freitas AC, Duarte AC. (2012). Trends in Analytical Chemistry, 34, 97-110.

- Fariña JI, Viñarta SC, Cattaneo M, Figueroa LIC (2009). J Appl Microb 106: 221-232.
- Fernandez PM, Cabral ME, Deslgado OD, Fariña JI, Figueroa LIC (2013) Int Biodet Biodeg, 79:28-35.
- Fernández PM, Cruz EL, Viñarta SC, de Figueroa LIC. (2016). Bulletin of environmental contamination and toxicology, 1-7.
- Fernández PM, Fariña JI, Figueroa LIC (2010). Water Air Soil Poll., 212, 275-279.
- Fernandez PM, Figueroa LIC, Fariña JI (2009) Water Air Soil Poll, 206:283-293.
- Fernandez PM, Martorell MM, Fariña JI, Figueroa LIC (2012) The Scientific World Journal Article ID 708213.
- Fernández PM, Martorell MM, Blaser GM; Ruberto LAM, Figueroa LIC, Mac Cormack WP (2017) Extremophiles, DOI 10.1007/s00792-017-0915-5.
- Fromtling RA, Galgiani JN, Pfaller MA, Espinel-Ingroff A (1993). Antimicrob. Agents Chemother. 37,39-45.
- Gunde-Cimerman N, and Zalar P (2014) *Food Technol. Biotechnol.* 52, 170-179.
- Imhoff (2015) Marine drugs, 14(1), 19.
- Indraningrat AAG Smidt, H., & Sipkema, D. (2016). Marine drugs, 14(5), 87.
- Keller NP, Turner G, & Bennett JW (2005) Nature Rev. Microbiol. 3(12), 937-947.
- Lanzarotti E, Pellizza L, Bercovich A, Foti M (2011) J Bacteriol, 193(23):6797-6798.
- Martins A, Vieira H, Gaspar H, Santos, S. (2014). Marine drugs, 12(2), 1066-1101.
- Martínez Álvarez LM, Balbo AL, Mac Cormack WP, Ruberto LAM (2015). Cold Regions Science and Technology, 119, 61-67.
- Martínez Álvarez, L.M, Ruberto LAM, Balbo AL, Mac Cormack WP (2017) Sci Total Environ <http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.02.204>
- Martorell MM, Fernandez PM, Fariña JI, Figueroa LIC (2012c) Int Biodet Biodeg, 71:80-85.
- Martorell MM, Pajot HF and Figueroa LIC (2012). Int Biodet Biodeg 66: 25-32.
- Martorell MM, Pajot HF, Ahmed PM, Figueroa LIC (2016) J Environ Science [doi:10.1016/j.jes.2016.01.033](https://doi.org/10.1016/j.jes.2016.01.033)
- Martorell MM, Pajot HF, Rovati JI; Figueroa LIC (2012b) Yeast, 29:137-144.
- Martorell MM, Ruberto LAM, Figueroa LIC, Mac Cormack WP (2016) Congreso Latinoamericano de Ciencia Antártica.
- Martorell MM, Ruberto LAM, Fernández PM, Figueroa LIC, Mac Cormack WP (2017) Journal of Basic Microbiology, DOI 10.1002/jobm.201700021.
- Maza M, Pajot H, Amoror J, Yasem M (2014). Int Biodet Biodeg 87, 18-25.
- Mestre MC, Vázquez SC, Ruberto L, Mac Cormack, WP (2007) <http://www.dna.gov.ar/CIENCIA/SANTAR07/CD/PDF/CVRE406.PDF>.
- Netzker T, Fischer J, Weber J, Mattern D (2015). Front Microbiol 6:299. DOI: 10.3389/fmicb.2015.00299 .
- Newman D, Cragg G. (2012) J. Nat. Prod., 75(3), 311-335.
- Nosanchuk JD, Casadevall A (2003). *Cell. Microbiol.* 5, 203-223. doi: 10.1046/j.1462-5814.2003.00268.x.
- Pajot HP, Delgado OD, Figueroa LIC, Fariña JI (2011b) Anton Leeuw Int. J. G, 99: 443-456.

- Pajot HP, Fariña JI, Figueroa LIC (2011) *Int Biodet Biodeg*; 65:1199 -1207.
- Pajot HP, Figueroa LIC, Fariña JI (2007) *EnzymeMicrob Tech*, 40:1503-1511.
- Pajot HP, Figueroa LIC, Spencer JFT, Fariña JI (2008) *Anton Leeuw Int. J. G*, 94:233 – 244.
- Rovati JI, Delgado OD, Figueroa LIC, Fariña JI (2010) *World J Microb Biot*, 26:55-62.
- Rovati JI, Pajot HP, Ruberto L, Mac Cormack W, Figueroa LIC (2013) *Yeast* 30(11):459-470.
- Ruberto LAM, Vazquez S, Lobalbo A, Mac Cormack WP (2005). *Antarctic Science*; 17:47–56.
- Ruberto LAM, Vazquez SC, Curtosi A, Mestre MC (2006) *Bioremed J*, 10(4):191-201.
- Schmidt M, Stougaard P (2010). *Environ Technol* 31(10), 1107-1114.
- Shukor MY, Hassan NAA, Jusoh AZ, Perumal N (2009) *J Environ Biol*, 30(1):1-6.
- Stchigel A, Cano J, Mac Cormack WP, Guarro J (2013) *Mol Phyl Evol Fungi* 31:188-206.
- Stchigel AM, Caldach M, Guarro J, Ruberto L (2009) *Boletín Micológico*, 24(1):21-25.
- Stchigel AM, Caldach M, Mac Cormack WP (2008) *Rep Polar Marine Res*, 571:184-189.
- Stchigel AM, Caldach M, Mac Cormack WP, Guarro J (2004) *Boletín Micológico*, 19:111-115.
- Stchigel AM, Caldach M, Mac Cormack WP, Ruberto LAM (2007) www.dna.gov.ar/CIENCIA/SANTAR07/CD/PDF/CVRE406.PDF.
- Tata A, Perez C, Campos ML, Bayfield MA (2015) *Anal. Chem.* 87, 12298-12305.
- Timling I, Taylor DL (2012) *Fungal Ecol.* 5, 419–429. doi: 10.1016/j.funeco.2012.01.009.
- Tropeano M, Coria S, Turjanski A, Cicero D (2012) *Polar Res*, 31, 18507, <http://dx.doi.org/10.3402/polar.v31i0.18507>.
- Tropeano M, Vazquez SC, Coria S, Turjanski A (2013) *Polish Polar Res*, 34(3):253-267.
- Vazquez SC, Coria SH, Mac Cormack WP (2004) *Microb Res*, 159:(2):157-166.
- Vazquez SC, Coria SH, Mac Cormack WP (2008a) *Rep Polar Marine Res*, 571:223-231.
- Vazquez SC, Hernández E, Mac Cormack WP (2008b) *Revista Argentina de Microbiología*, 40(1):63-71.
- Vázquez SC, Nogales B, Ruberto L; Mestre C (2013) *Int Biodet Biodeg*, 77, 22-30.
- Vazquez SC, Ruberto LAM, Mac Cormack WP (2005) *Polar Biol*, 28:319-325.
- Villegas LB, Amoroso MJ, Figueroa LIC, Siñeriz F (2009b) *Water Sci Technol*, 60:1225-1232.
- Villegas LB, Amoroso MJ, Figueroa LIC (2005) *J Basic Microb*, 45:381-391.
- Villegas LB, Amoroso MJ, Figueroa LIC (2009a) *J Basic Microb*, 49:395-403.
- Villegas LB, Fernandez PM, Amoroso MJ, Figueroa LIC (2008) *Biometals*, 251-600.
- Viñarta SC, Delgado OD, Figueroa LIC, Fariña J.I. (2013a). *Carbohydrate Polymers* 94, 496-504.
- Viñarta SC, François NJ, Daraio ME, Figueroa LIC (2007). *Int J Biol Macromol*, 41, 314-323.
- Viñarta SC, LIC Figueroa, Molina OE, Fariña JI (2006). *Food Hydrocolloids* 20, 619-629.
- Viñarta SC, Yossen M, Vega JR, Figueroa LIC, Fariña JI(2013b). *Carbohydrate Polymers* 92, 1107-1115.
- Viñarta SC, Angelicola MV, Barros JM, Fernández PM (2016) *J. Basic Microbiol* 56(12), 1360-1368.
- Wang B, Guo G, Wang C, Lin Y, Wang X (2010). *Nucleic acids research*, 38(15), 5075-5087.
- Watrous J, Roach P, Alexandrov T, Heath BS (2012) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 109, E1743-E1752.
- Watrous J, Roach P, Heath B, Alexandrov T. *Anal. Chem.*, 2013, v. 85 (21), 10385-10391.
- Wierzbicka-Woś A, Cieśliński H, Wanarska M, Kozłowska-Tylingo K (2011). *Microb Cell Fact* 13; 10:18.
- Xia J, Sinelnikov IV, Han B, Wishart DS (2015). *Nucleic acids research*, 43(W1), W251-W257.

- Zampieri D, Santos VG, Braga PAC, Ferreira CR (2013) Theriogenology 80 (4), 337-345.

CRONOGRAMA

Etapas	Meses 1-2	Meses 3-4	Meses 5-6	Meses 7-8	Meses 9-10	Meses 11-12	Meses 13-14	Meses 15-16	Meses 17-18	Meses 19-20	Meses 21-22	Meses 23-24
Muestreo y aislamiento de nuevas cepas en Antártida	X						X					
Identificación por MALDI-TOF y/o técnicas moleculares		X	X					X	X			
Realización de co-cultivos y obtención de extractos				X	X	X				X	X	X
Evaluación de la actividad antimicrobiana				X	X	X				X	X	X
Evaluación de la producción de metabolitos secundarios				X	X	X				X	X	X