



---

---

Universidad Autónoma del Estado de México  
Facultad de Ciencias de la Conducta

Doctorado en Ciencias de la Salud

**Detección de sistemas biosintéticos implicados en la producción  
de metabolitos secundarios en actinobacterias de origen clínico**

## **TESIS**

Para Obtener el Grado de:  
Doctora en Ciencias de la Salud

Presenta:

Mtra. Janette Berenice González Nava

Cuenta: 1830563

Comité Tutorial:

Dra. Ninfa Ramírez Durán

Tutor Académico

Dr. Ángel Horacio Sandoval y Trujillo

Tutor Interno

Dra. Gabriela Scarlett Alonso Carmona

Tutor Externo



Toluca, Estado de México, noviembre de 2021.

# ÍNDICE

	Pag.
Resumen.....	6
<b>1. Introducción .....</b>	<b>7</b>
1.1 Actinobacterias.....	7
1.1.1 Composición celular y clasificación quimiotaxonómica....	7
1.1.2 Actinobacterias de importancia médica.....	12
1.2 Genética microbiana.....	16
1.3 Sistemas biosintéticos.....	19
1.3.1 Sistemas NRPS .....	20
1.3.2 Sistemas PKS.....	25
1.3.3 Sistemas híbridos NRPS-PKS.....	29
1.4 Biosíntesis de metabolitos secundarios.....	31
<b>2. Planteamiento del problema.....</b>	<b>33</b>
<b>3. Justificación.....</b>	<b>33</b>
<b>4. Hipótesis.....</b>	<b>34</b>
<b>5. Objetivos.....</b>	<b>34</b>
<b>6. Diseño metodológico .....</b>	<b>35</b>
6.1 Diseño del estudio.....	35
6.2 Universo y muestra.....	35
6.3 Criterios de inclusión y exclusión .....	35
6.4 Procedimiento.....	36
6.4.1 Obtención de cepas.....	36
6.4.2 Crecimiento de las cepas.....	36
6.4.3 Descripción morfológica.....	36
6.4.4 Extracción de ADN.....	38
6.4.5 Amplificación del inserto del gen 23S rRNA.....	38
6.4.6 Búsqueda de los sistemas biosintéticos.....	39
6.4.7 Identificación molecular de las cepas.....	39
6.4.8 Cuantificación del amplicón.....	41
6.4.9 Purificación del amplicón.....	42

6.4.10 Análisis de secuencias.....	43
6.4.11 Análisis filogenético.....	43
6.4.12 Prueba de actividad antimicrobiana.....	43
6.5 Implicaciones bioéticas.....	44
7. Resultados.....	45
7.1 Artículo aceptado.....	45
7.1.1 Título del artículo.....	45
7.1.2 Página frontal del artículo.....	45
7.1.3 Carta de aceptación.....	46
7.1.4 Resumen.....	46
7.2 Artículo enviado.....	47
7.2.1 Título del artículo.....	47
7.2.2 Carta de envío.....	47
7.2.3 Resumen.....	47
8. Resultados adicionales.....	48
9. Discusión.....	53
10. Referencias bibliográficas .....	55

## RESUMEN

Las actinobacterias están presentes en el suelo y representan una alta porción de la microbiota del medio, principalmente de la rizosfera jugando un papel importante en las comunidades microbianas asociadas a plantas. Algunos géneros predominan como saprófitos, mientras que otros son endófitos, simbiontes benéficos o incluso patógenos de plantas y animales, y son ampliamente reconocidos por su potencial en control biológico.

La diversidad del filo es amplia e incluye especies benéficas, viviendo como microbiota en animales y personas; pero también especies patógenas. *Mycobacterium tuberculosis* está presente en 2 mil millones de personas en el mundo y es el agente causal de la tuberculosis, matando millones de personas cada año. *Streptomyces* causa “costra” en plantas y se conoce por su habilidad para causar necrosis y lesiones en cultivos de tubérculos económicamente importantes como la papa. *Nocardia* puede ser oportunista infectando a personas inmunocomprometidas causando infecciones como la nocardiasis y el actinomicetoma.

Por otro lado, las actinobacterias tienen un claro potencial como fuente de nuevos antibióticos, antifúngicos, agentes anticancerígenos y otros metabolitos secundarios que podrían ser utilizados en medicina humana y animal; son degradadores de hidrocarburos y pueden ser usados para el control biológico de plagas en cultivos y como promotores de crecimiento en plantas.

Con el rápido desarrollo en los campos de genómica, biología sintética, ecología y aunado al requerimiento de nuevos compuestos antimicrobianos para combatir la resistencia antimicrobiana, la biología de *Actinobacteria* es ampliamente dinámica y se están realizando importantes estudios en este campo.

En el proyecto actual se estudiaron actinobacterias de origen clínico, utilizando técnicas de biología molecular y herramientas bioinformáticas para buscar en las cepas de estudio uno o más sistemas biosintéticos, tales como PKS (policétido sintasa) y NRPS (policétidos sintetasa no ribosomales), que nos permiten predecir la producción de metabolitos secundarios con

actividad farmacológica y se evaluó su actividad antimicrobiana contra cepas de algunas bacterias multirresistentes.

## 1.INTRODUCCIÓN

### 1.1 ACTINOBACTERIAS

Los actinomicetos o actualmente llamadas actinobacterias son microorganismos procariotes Gram positivos, que pertenecen al dominio Bacteria y al filo *Actinobacteria*, incluye 6 clases, 46 órdenes, 79 familias y 425 géneros (1).

#### 1.1.1 Composición celular y clasificación quimiotaxonómica

El filo *Actinobacteria* está delimitado con base en su posición en el árbol filogenético del 16S rRNA; pero actualmente se han usado marcadores genéticos como los “house keeping” o genes de mantenimiento como *rpoB* y *ssgB* propios de cada género que permite discriminar entre géneros muy similares (2).

Gracias al desarrollo en biología molecular ha sido posible el descubrimiento de nuevas especies o el correcto reacomodo de especies mal clasificadas; esto ha permitido un mejor conocimiento de la biología de cada especie, sus aspectos patogénicos, epidemiología, un mejor diagnóstico y tratamiento en clínica, aplicaciones en biotecnología y más.

Las actinobacterias fueron considerados pertenecientes al grupo de los hongos, debido a que algunos presentan crecimiento filamentoso y producen micelio con esporulación, sin embargo, por eso se les nombró en un principio como actinomicetos, pero la comparación con los hongos es solo superficial; ya que las células de las actinobacterias son delgadas con un cromosoma que está organizado en un núcleo procariote, una pared celular de peptidoglicano y las células son susceptibles a antibióticos (3), a diferencia de las células eucariotas.

Las actinobacterias crecen por la extensión de su pared celular desde un extremo y así generan la formación de hifas como se ejemplifica en la Figura 1.

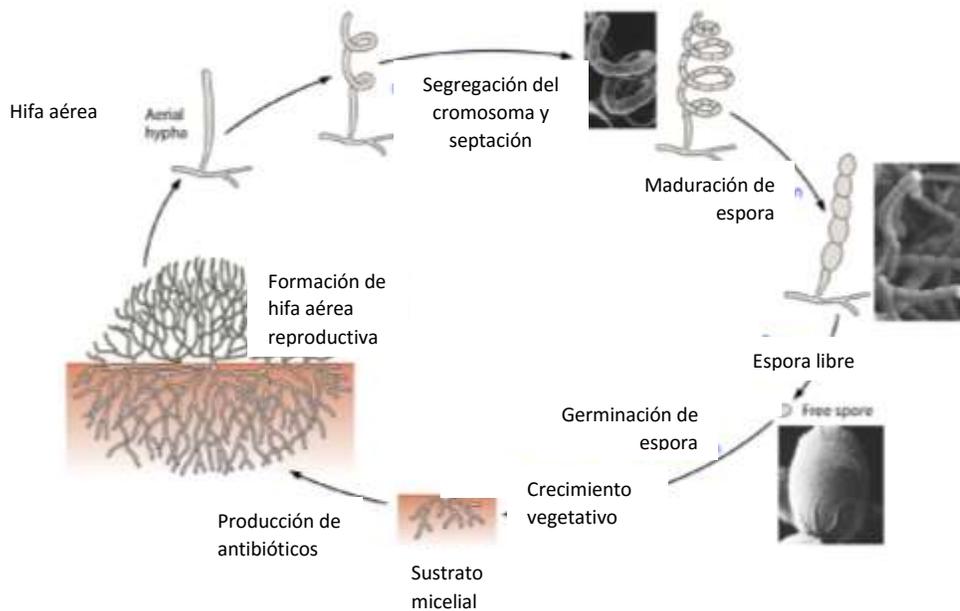


Figura 1. Ciclo de vida de algunos géneros de actinobacterias (4).

Son mesófilas, con un crecimiento óptimo de 25° a 30°C, y su crecimiento es favorecido cuando hay baja humedad. Crecen a pH entre 6 a 9, con un máximo de crecimiento alrededor de la neutralidad. Forman el 20% de la microbiota del suelo en primavera y más del 30% en otoño porque hay mayor residuo de materia orgánica disponible en esa época del año, y durante el invierno reducen su concentración hasta 13% del total de la microbiota (4).

Las principales características usadas para su taxonomía a nivel de género y especie son morfología microscópica y quimiotaxonomía (la composición de su pared celular, el contenido y variedades de azúcares, composición de fosfolípidos y tipo de menaquinonas).

Las actinobacterias exhiben una amplia variedad de características morfológicas, diferenciadas por la presencia o ausencia de un micelio aéreo, la forma del micelio, el color del micelio, la producción o difusión de pigmentos melanoides y la estructura y apariencia de sus esporas. La morfología de las colonias es diversa incluyendo formas cocoides (*Micrococcus*), rodococoides (*Arthrobacter*), así como fragmentación de hifas (*Nocardia*) y formas permanentes de micelio ramificado o hifas (*Streptomyces* o *Frankia*). Son productores de pigmentos melanoides, polímeros con diversas estructuras moleculares negras o cafés y

son formadas por la polimerización oxidativa de compuestos fenólicos o indólicos. Las actinobacterias producen pigmentos los cuales puede ser rojos, amarillos, naranjas rosados, café, verde-café, azul o negros, dependiendo de las cepas, el medio usado y la edad del cultivo (5).

La información de la arquitectura química del peptidoglicano de la pared celular es valiosa para la clasificación de las actinobacterias porque facilita la discriminación entre grupos de actinobacterias a nivel de género; incluyendo la identificación de aminoácidos en posición 3 de la cadena lateral del tetrapéptido por la presencia o ausencia de glicina en los puentes peptídicos, y la cantidad de azúcar en el peptidoglicano. La presencia o ausencia de isómeros ópticos específicos en el aminoácido no proteínico quiral del ácido 2,6-diamino-pimélico (DAP) es otra característica importante quimiotaxonómica de la pared celular de las bacterias Gram positivas: el peptidoglicano de actinobacterias contiene LL- o DL- (meso)-DAP, dependiendo del género. Considerando los isómeros de DAP y la presencia o ausencia de otros aminoácidos y (amino) azúcares, se identifican 8 distintos quimiotipos de pared celular actinobacterial (tabla 1)(6).

<b>COMPONENTES DE LOS TIPOS DE PARED CELULAR DE ACTINOBACTERIAS</b>			
<b>Tipo de pared celular</b>	<b>Principales características</b>	<b>Género de <i>Actinobacteria</i></b>	<b>Algunas especies de importancia clínica</b>
I	LL-DAP, glicina, sin azúcares.	<i>Arachnia,</i> <i>Nocardioides,</i> <i>Pimelobacter,</i> <i>Streptomyces.</i>	<i>S.somaliensis</i>
II	<i>meso</i> -DAP, glicina, azúcares arabinosa y xilosa.	<i>Actinomyces,</i> <i>Actinoplanes,</i> <i>Micromonospora,</i> <i>Ampulariella, etc.</i>	

III	<i>meso</i> -DAP, azúcar madurosa (3-O-metil-D-galactosa).	<i>Actinomadura</i> , <i>Dermatpophylus</i> , <i>Frankia</i> , etc.	<i>A.maduræ</i> <i>A.pelletieri</i>
IV	<i>Meso</i> -DAP, azúcares arabinosa y galactosa.	<i>Microspolyspora</i> , <i>Nocardioformes</i>	<i>N.asteroides</i> <i>N.brasiliensis</i> <i>N.otitidiscaviarum</i> <i>M.tuberculosis</i> <i>R.equi</i> <i>R.rhodocrous</i>
V	Sin DAP, aminoácidos lisina y ornitina.	<i>Actinomyces</i>	
VI	Sin DAP, puede o no contener aminoácido ácido aspártico, azúcar galactosa.	<i>Actinomyces</i> , <i>Microbacterium</i> , <i>Oerskovia</i> , <i>Aracnobacterium</i>	<i>A.bovis</i> <i>O.</i> <i>xanthineolytica</i>
VII	Sin DAP, aminoácidos ácido diaminobutírico, glicina y puede o no contener lisina.	<i>Agromyces</i> , <i>Clavibacter</i>	
VIII	Sin DAP, aminoácido ornitina	<i>Aureobacterium</i> , <i>Curtobacterium</i> , <i>Cellulomonas</i>	

Tabla 1. Componentes de la pared celular de las actinobacterias y ejemplos de géneros y especies de estos quimiotipos (6)

Los patrones de ácidos grasos celulares son también indicadores quimiotaxonómicos para la identificación de géneros de actinobacterias. El rango de longitud de la cadena de ácidos grasos va desde 2 (C<sub>2</sub>) hasta 90 (C<sub>90</sub>) átomos de carbono, pero sólo aquellos entre 10-24 son de particular valor taxonómico. Las quinonas isoprenoides son otro tipo de características taxonómicas, se encuentran envolviendo la célula de las actinobacterias. Las menaquinonas cíclicas son características de miembros del género *Nocardia* (6). Otra clasificación de las actinobacterias ha sido con base en los fosfolípidos. Finalmente, la composición de azúcares es también importante en quimiotaxonomía clasificándolos de la siguiente manera (7):

Tipo A comprende especies que contienen en su pared celular arabinosa y galactosa

Tipo B contienen en la pared celular madurosa (3-O-metil-D-galactosa)

Tipo C son aquellos que no se diagnostican con azúcares

Tipo D contienen en su pared celular arabinosa y xilosa

Tipo E contienen en su pared celular galactosa y ramnosa

<b>PERFIL QUIMIOTAXONÓMICO</b>				
<b>Género de las actinobacterias</b>	<b>Longitud de cadena de ácidos grasos</b>	<b>Tipo de menaquinona (mk)</b>	<b>Tipo de fosfolípido</b>	<b>Tipo de azúcar</b>
<i>Nocardia</i>	C 16:0 C 18:0 C 18:1	MK -8(H <sub>2</sub> ) MK -9(H <sub>2</sub> ) menaquinonas cíclicas	Fosfatidiletanolamina Fosfatidilinositol Fosfatidilmonósido	Tipo A
<i>Actinomadura</i>		MK -9(H <sub>4</sub> ) MK -9(H <sub>6</sub> )	Fosfatidilglicerol Fosfatidilinositol	
<i>Streptomyces</i>	C 16:0 iso C 17:0 C17:0 anteiso	MK -9(H <sub>6</sub> ) MK -9(H <sub>8</sub> )	Difosfatidilglicerol Fosfatidiletanolamina Fosfatidilinositol Manósido	Tipo C
<i>Rhodococcus</i>	10-metil ramificado	MK -8(H <sub>2</sub> )	Difosfatidilglicerol Fosfatidiletanolamina Fosfatidilinositol-dimanósidos	

Tabla 2. Ejemplos de características quimiotaxonómicas de géneros de las actinobacterias de importancia médica (6)

### 1.1.2 Actinobacterias de importancia médica y biotecnológica

## ***Nocardia***

El género *Nocardia* es una bacteria aerobia que se encuentra comúnmente en el suelo y el agua. Tiene 119 especies identificadas de las cuales, al menos 40 son patógenas. Aunque se encuentra en todos los ambientes; es el género de actinobacteria con más reportes como patógeno, causante de infecciones oportunistas en pacientes inmunocomprometidos principalmente. Las infecciones por *Nocardia* son inducidas a través de inhalación o inoculación percutánea de fuentes ambientales, pero también se han reportado transmisiones nosocomiales (8).

El microorganismo puede esparcirse por el cerebro, riñones, articulaciones, hueso, tejido blando y ojos, causando diseminación de nocardiosis en humanos y animales. Aunque las especies de *Nocardia* son raras se reportan entre el 1 y el 2% de abscesos cerebrales. Además, la velocidad de mortalidad por abscesos cerebrales asociados con *Nocardia* son sustancialmente muy elevados (31%) (9).

En las últimas dos décadas, las infecciones por esta bacteria han aumentado, convirtiéndose en enfermedades emergentes entre humanos y animales domésticos alrededor del mundo, ya sea porque los métodos de aislamiento e identificación molecular han mejorado, y actualmente se sabe diagnosticar con mayor precisión; o también porque ha habido un crecimiento en la población inmunocomprometida (9). En 2015, Emecy y Denning realizaron un estudio de la distribución global de actinomicetoma, reportaron 19,494 casos a nivel mundial, de los cuales, en México hubieron 4,155 casos.

Las especies de *Nocardia* comprometen las funciones del sistema inmunológico, la infección ha sido asociada a mayores casos en pacientes con trasplantes de médula, uso de esteroides por tiempo prolongado, enfermedades del tejido conectivo, infecciones con virus de inmunodeficiencia humana (VIH), infecciones pulmonares obstructivas crónicas, alcoholismo, cirrosis, vasculitis sistémica, colitis ulcerativa y fallas renales (11).

La mayoría de las infecciones nocardiales han sido atribuidas a *N. nova*, *N. brasiliensis*, *N. farcinica*, *N. cyriacigeorgica* y *N. abscessus*. (12, 13).

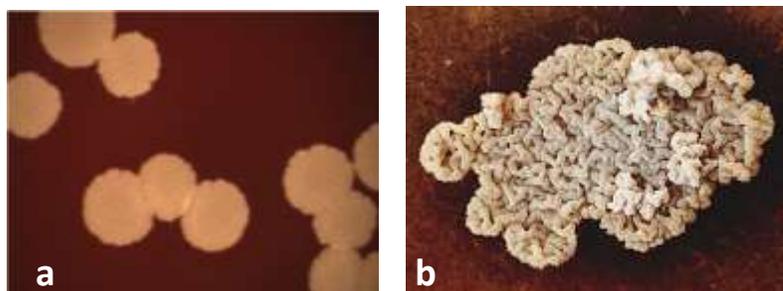


Figura 2. Foto colonial de (a) *N.cyriacigeorgica* y (b) *N.brasiliensis* Se observa que las colonias son diferentes dependiendo de la especie.

Este género produce importantes moléculas bioactivas. Vera-Cabrera y colaboradores (2013) analizó el genoma de *Nocardia brasiliensis* HUJEG-1 obteniendo como resultado que esta cepa posee aproximadamente 30 genes que codifican NRPS. Dos genes codifican para la síntesis de un compuesto similar a la piroverdina, el pigmento verde típico de *Pseudomonas aeruginosa*. *N. brasiliensis* HUJEG-1 codifica para 20 genes de PKS; y codifica un policétido sintasa que es altamente homóloga (80%) a una proteína de *Streptomyces venezuelae* involucrada en la síntesis de jadomicina, un antibiótico policétido. También codifica para 4 terpenos, y otros genes de biosíntesis de antibióticos que están presentes en el genoma de *N. brasiliensis* HUJEG-1 incluyen aquellos involucrados en la síntesis de eritromicina, higromicina, puromicina, saframicina, estreptomina y tetracenomicina. Dicha cepa utiliza aproximadamente una cuarta parte de su genoma para sintetizar metabolitos secundarios (2.157.079 pb).

*N.brasiliensis*, *N.cyriacigeorgica* y *N.farcinica* son las especies que más se han estudiado y comparado con base en sus genes biosintéticos, por lo que valdría la pena seguir buscando los sistemas PKS y NRPS en otras especies para observar su diversidad genética y de producción de moléculas bioactivas en el amplio género de *Nocardia*.

### ***Rhodococcus***

Es un grupo de microorganismos cuyos miembros están estrechamente relacionados con *Nocardia*. Especies de *Rhodococcus* incluyen simbioses como *R. rhodnii* (15); y patógenos de animales como *R. equi* (16), de plantas como *R. fascians* (17) y de humanos como *R. rhodochrous* (6). *R. equi* es la especie que más actúa como patógeno pulmonar en caballos

jóvenes y en personas infectadas con VIH. *Rhodococcus* también se ha reportado en personas con alguna condición inmunosuprimida como infección por VIH, cáncer, lupus eritematoso sistemático, enfermedad de Crohn, y otros (16).

Es un organismo con versatilidad catabólica remarcable, porque ellos contienen genes que codifican enzimas que pueden degradar compuestos orgánicos y xenobióticos. Además de su potencial de remediación, ellos tienen sistemas biosintéticos PKS y NRPS que producen metabolitos con potencial industrial, como carotenoides, bisurfactantes y agentes para bio-floculación, y especies como *R.rhodochrous* pueden sintetizar productos comerciales como la acrilamida (18). *Rhodococcus* ha sido bien estudiado y puede seguir sorprendiéndonos con su capacidad de producción.



Figura 3. Foto macroscópica y microscópica de *R.rhodochrous*.

### ***Streptomyces***

Este género ha recibido particular atención por tres principales motivos; primero, se encuentra en abundancia en el suelo y juega un importante rol en el ciclo del carbono, puede hidrolizar un amplio rango de polisacáridos (celulosa, quitina y xilano) y otras macromoléculas naturales, esta acción es por la producción de diversas exoenzimas hidrolíticas; segundo, el género exhibe amplia extensión filogenética, representado por más de 500 especies identificadas; y tercero, producen una diversidad de metabolitos secundarios bioactivos, así, son los más interesantes para la industria y la medicina (19). Las actinobacterias producen aproximadamente la tercera parte de todos los antibióticos conocidos, la mayoría de los cuales son producidos por estreptomicetos. Por ello, estos microorganismos son muy importantes en la batalla contra patógenos multirresistentes emergentes (20).

Cuando la secuencia del genoma de *S.coelicolor* fue publicado se observó que tiene un gran potencial para producir metabolitos secundarios, ya que fueron identificados 18 clústers

genéticos biosintéticos para producirlos, incluyendo uno que surgió para la producción de antibióticos policétidos crípticos (Cpk). Algunas cepas de *Streptomyces* albergan más de 50 clusters genéticos para metabolitos secundarios (21, 22). Esto ha sugerido una extensiva investigación en genómica aplicada en los antibióticos crípticos, silenciosos o dormidos y métodos para la activación de su biosíntesis (23).

<b>CARACTERÍSTICAS DEL GENOMA DE <i>S.coelicolor</i></b>	
Características del cromosoma	Propiedades
Longitud total	8,667,507pb
Contenido de G+C	72.12%
Densidad de codificación	88.9%
Genes codificantes	7,825
Clusters de metabolitos secundarios	18

Tabla 3. Características del cromosoma de *S.coelicolor* (21).

Las especies *S.pelletieri*, *S.griseus*, *S.lanatus* y *S.albus* son patógenas, aislados de pacientes inmunocomprometidos, principalmente con alguna patología pulmonar (24), aunque este género tiene mayor relevancia biotecnológica, debe conocerse su patogenia para diagnosticar y dar tratamiento eficaz.

### ***Actinomadura***

Este género tiene importancia en patogenia principalmente por especies como *A. madurae* y *A.pelletieri* que son agentes etiológicos de actinomicetoma y que se distinguen por provocar lesiones graves que llegan hasta los tendones y huesos debido a su alta capacidad proteínolítica. Las infecciones por *A. madurae* y por *A. pelletieri* son comunes en países como Venezuela, México, Brasil, India y Sudán (25,26).

El género *Actinomadura* es responsable de la producción de metabolitos secundarios como muestran algunos estudios. El genoma de *Actinomadura sp.* K4S16 contiene 4 clusters para PKS, 2 clusters para PKS II y 3 clusters para NRPS, entre los genes que codifican para un PKS se encontró el gen t1pks para la síntesis de nomicina (27). La cepa rara *Actinomadura sp.* KC191, es productora del metabolito secundario llamado actinomadurol que ha presentado actividad inhibitoria contra *B.subtilis*, *S.aureus*, *K. rhizophila*, *P. hauseri* y

*S. enterica* (28). *Actinomadura* tiene potencial para el aislamiento de nuevos productos naturales, pues se sabe que su genoma codifica para diversos sistemas biosintéticos.

## 1.2 GENÉTICA MICROBIANA

En las últimas dos décadas, la microbiología se ha desarrollado rápidamente, con los estudios sobre las propiedades genéticas de los microorganismos, se desarrollaron nuevos campos en biología molecular, ingeniería genética y genómica. Estas subdisciplinas moleculares han revolucionado las ciencias de la vida y han engendrado nuevas generaciones de herramientas experimentales con las que atacar los problemas más complejos de la biología (29).

Muchos de los avances en microbiología están impulsados por la genómica, que es el mapeo, la secuenciación y el análisis de los genomas (ver figura 4). Los nuevos métodos de secuenciación de ADN y la mejora en herramientas bioinformáticas han generado grandes cantidades de datos genómicos que pueden servir para resolver problemas en diversas áreas.

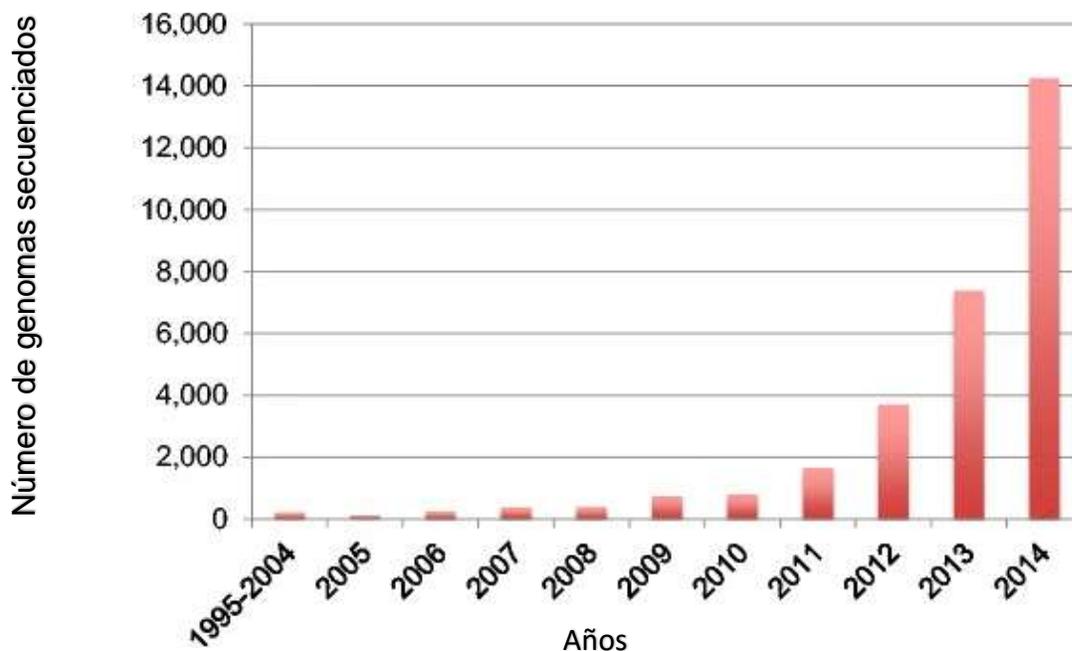


Figura 4. Ejemplo de como a través de los años hay más secuencias de bacterias y arqueas depositadas en la base de datos del GenBank (30).

La biología molecular ha generado varias subdisciplinas de gran especificidad, como la genómica, la transcriptómica, la proteómica y la metabolómica, que exploran los patrones de expresión de ADN, las proteínas y las rutas metabólicas, respectivamente.

La unidad funcional de la información genética es el gen, y todas las formas de vida, incluidos los microorganismos, contienen genes. Físicamente, los genes están localizados en los cromosomas o en otras grandes moléculas conocidas colectivamente como elementos genéticos. Estos elementos constituyen la dotación total de información genética, o genoma, de una célula o un virus. Si queremos entender cómo funcionan los microorganismos, debemos entender cómo codifican la información los genes (29).

La información genética en las células está integrada en los ácidos nucleicos: ADN y ARN. El ADN contiene el patrón genético de la célula, mientras que el ARN es una molécula intermediaria que convierte este patrón en secuencias definidas de aminoácidos y luego en proteínas. La información genética reside en la secuencia de monómeros que constituyen los ácidos nucleicos, que son macromoléculas de información. La secuencia genómica de un organismo nos ofrece importantes pistas acerca de cómo funciona dicho organismo y de su historia evolutiva; y no sólo comprende la secuenciación completa del ADN y la identificación de todos los genes, también estudia la expresión de estos. Los avances en esta área dependen en gran medida de las mejoras en las tecnologías moleculares y el poder de la informática. Los principales avances incluyen la automatización de la secuenciación del ADN, la miniaturización de las técnicas analíticas, así como el desarrollo de potentes métodos informáticos para el análisis de los genomas (29).

El término secuenciación se refiere a determinar el orden preciso de las subunidades de nucleótidos, ya sea en el ADN o ARN. La tecnología de secuenciación ha avanzado rápidamente, por ejemplo, el coste de la secuenciación de 1 megabase (Mb) de ADN ha disminuido, desde el 2001 a 2011 es 10,000 veces más barato. Una vez completados la secuenciación y el ensamblaje, el siguiente paso es el registro o anotación del genoma, la conversión de los datos iniciales de la secuencia en una lista de los genes y otras secuencias funcionales presentes en el genoma; para ello utilizamos la bioinformática para almacenar y analizar las secuencias y estructuras de los ácidos nucleicos y de las proteínas (31).

Después de la secuenciación, el ensamblado y la anotación, se puede usar la genómica comparativa para comparar los genomas en cuanto a su tamaño, su organización y su contenido génico. En el sitio web Microbes Online (<http://www.microbesonline.org>) se pueden visualizar más de 4,000 genomas microbianos; además de entender cómo funcionan los genes y cómo interaccionan los organismos con el ambiente. Además, la genómica comparativa pone de manifiesto relaciones evolutivas entre organismos. La reconstrucción de las relaciones evolutivas ayuda a distinguir entre características primitivas y características derivadas, y puede resolver ambigüedades en los árboles filogenéticos (32).

En el futuro, la secuenciación de muestras metagenómicas de pacientes podría revolucionar la medicina en términos de velocidad y precisión para encontrar patógenos y su tratamiento. El gen 16S rRNA es usado ampliamente porque está presente en al menos una copia en cada genoma bacteriano, sus regiones conservadas permiten la identificación simple de muestras, y su secuencia proporciona información confiable sobre la familia bacteriana, el género o la especie en la mayoría de los casos, porque incluso dentro de una especie, puede haber un alto grado de variación genética (30).

### **1.3 SISTEMAS BIOSINTÉTICOS**

Cuando las técnicas de manipulación de ADN fueron desarrollándose, la enzimología fue comprendiéndose más, los genes biosintéticos fueron secuenciados y los ingenieros informáticos fueron construyendo los pasos bioquímicos que predecían las estructuras enzimáticas.

Los sistemas biosintéticos son un conjunto de genes que codifican a estructuras químicas que al unirse forman una molécula con probable actividad biológica, estas moléculas no son necesarias para el crecimiento celular por lo que se les llaman metabolitos secundarios.

La secuenciación del genoma de *S. avermitilis* reveló que codifica para 29 metabolitos secundarios, incluyendo 8 péptidos producidos por sistemas sintetasa de péptidos no ribosomales (NRPS) y 11 policétidos producidos por sistemas de policétido sintasa (PKS) (21). El genoma de *Saccharopolyspora erythraea* codifica para 25 metabolitos secundarios,

incluyendo 7 péptidos no ribosomales y 11 policétidos, ésta especie es la responsable del antibiótico eritromicina, uno de los más utilizados en clínica (33, 34). El genoma de *Salinospora tropica* codifica para 17 metabolitos secundarios algunos con propiedades anticancerígenas u otra actividad usada en salud humana (35, 36). El genoma de *Rhodococcus sp.* RHA1 codifica para 24 potenciales péptidos no ribosomales y 7 policétidos; sus características biosintéticas han permitido que los rodococos sean utilizados como agentes de bioremediación (37, 38). Estos datos establecieron que las rutas bioquímicas dependen de funciones específicas de las enzimas y que existen complejos enzimáticos multifuncionales que llevan a cabo etapas o pasos ordenados.

Ahora se sabe que menos del 10% de los “cluster” genómicos de metabolitos secundarios o cluster de genes biosintéticos (BGC) son expresados y el resto de ellos requieren condiciones especiales o manipulaciones genéticas para expresar sus productos. Se estima que las actinobacterias más dotados tienen la capacidad de producir alrededor de 30-50 metabolitos secundarios por ejemplo, *Streptomyces rapamycinicus* codifica para 48 BGC (39).

Las actinobacterias tienen genomas más largos que los de otras bacterias, y se considera que de este genoma entre el 5-10% se encuentra relacionado con la producción de metabolitos secundarios (40).

### **1.3.1 Sistemas NRPS**

Los sistemas de sintetasa de péptidos no ribosomales (NRPS) son compuestos por un grupo de genes que codifican para módulos con múltiples actividades enzimáticas. Cada módulo está formado por 1,000-1,100 aminoácidos de largo y están compuestos por dominios responsables de la incorporación de una unidad monomérica del péptido (41).

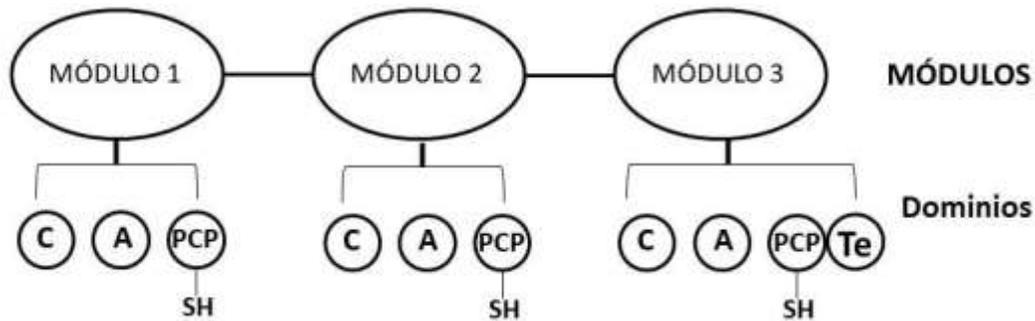


Figura 5. Módulos que comprende a los sistemas NRPS: contienen tres dominios básicos(C, A y PCP), y en algunos casos dominios auxiliares (Te, E, M, Cy y Ox).

Los módulos contienen cuatro dominios catalíticos básicos (42):

- El dominio de adenilación (A), formado por 550 aminoácidos aproximadamente, es responsable del reconocimiento y activación de un aminoácido como sustrato, lo activa convirtiéndolo en un aminoacil-adenilato mediante hidrolización del ATP.

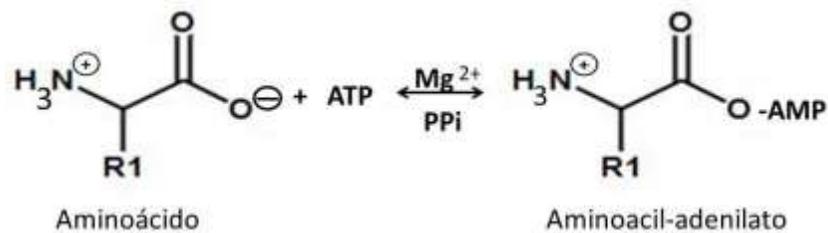


Figura 6. Reacción 1.

- El dominio de la proteína transportadora peptidil (PCP) o dominio de tiolación (T), formado por 80-100 aminoácidos, se encuentra unido covalentemente a un cofactor de 4'fosfopanteteína (4'PP) que contiene un residuo de serina, el dominio PCP une la serina al aminoácido activado mediante la enzima 4'PP-transferasa;

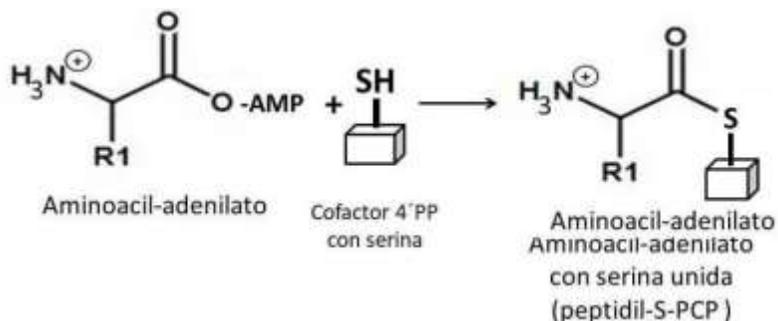


Figura 7. Reacción 2.

- El dominio de condensación (C), formado por 450 aminoácidos aproximadamente, cataliza la formación de uniones del péptido, es decir, forma la unión entre un peptidil-S-PCP de un módulo con el peptidil-S-PCP del módulo siguiente con uniones C-N.

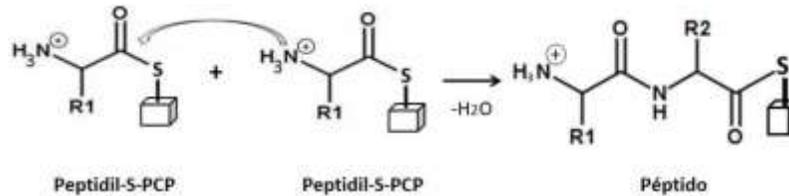


Figura 8. Reacción 3.

- Algunos sistemas bacterianos tienen un cuarto dominio, el dominio de terminación-tioesterasa (Te), formado por 250 aminoácidos aproximadamente, su función es la liberación del péptido biosintetizado mediante el rompimiento de las uniones tioéster del último módulo, y da forma lineal, cíclica o ramificada al producto.

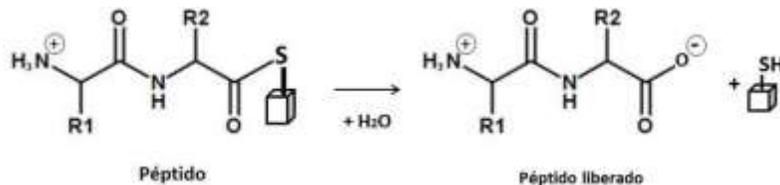


Figura 9. Reacción 4.

En algunos casos, un módulo podría incorporar dominios auxiliares adicionales en los NRPS que llevan a cabo modificaciones mediante glicosiltransferasas, halogenasas y oxigenasas, tales como.

- El dominio de epimerización (E), de aproximadamente 400 aminoácidos, el cual cambia un L-aminoácido en un D-aminoácido cambiando la unión del tioéster del aminoácido;

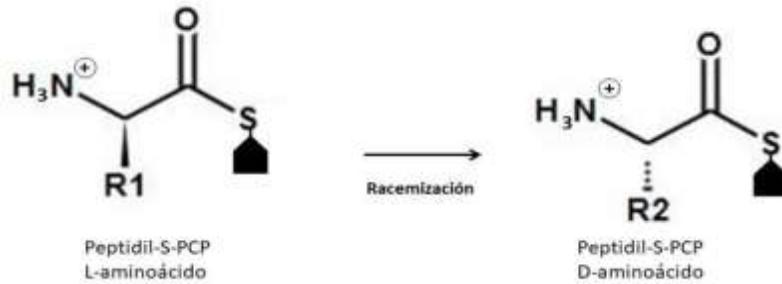


Figura 10. Reacción 5.

- Dominio de ciclización (Cy), su función es incorporar un residuo de cisteína, serina o treonina en el dominio C, este dominio es el responsable de la formación de anillos heterocíclicos, oxazolininas y tiazolininas, se encuentra unido al dominio-C;
- El dominio de oxidación (Ox) consta de 250 aminoácidos y está asociado al dominio-Cy, ayuda en la formación de anillos usando como cofactor al flavin-mononucleótido (FMN), los dos dominios forman anillos aromáticos.



Gura 11. Reacción 6.

El número de dominios descubiertos en los sistemas NRPS ha ido aumentando gracias a los tantos estudios realizados, y los antes mencionados son algunos de los conocidos.

Existen tres tipos de NRPS que dependen del tipo de biosíntesis que producen:

- NRPS tipo A lineal. El número y secuencia de los módulos es co-lineal al número y orden de los aminoácidos en el péptido.

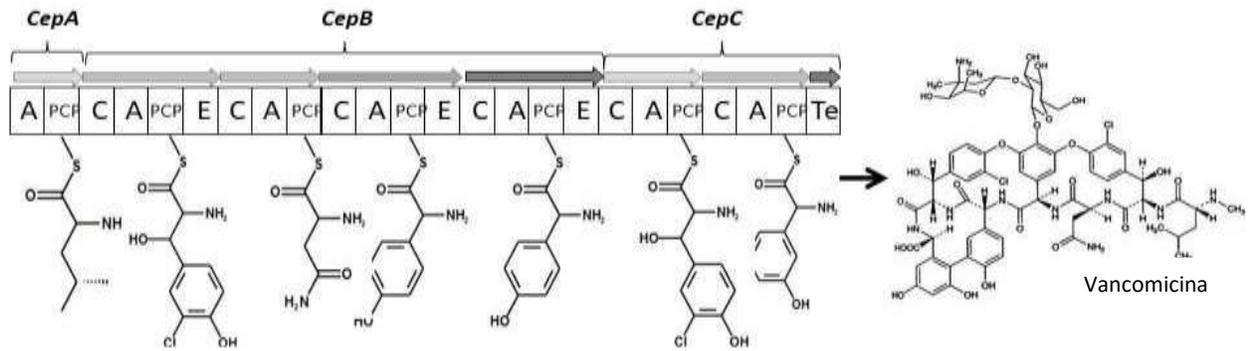


Figura 12. Biosíntesis lineal de la vancomicina. Los genes (*CepA*, *CepB* y *CepC*) hechos por módulos (flechas) que contienen módulos (A, PCP, C, E y Te) sintetiza una porción del producto final (43).

- NRPS tipo B iterativo. Los módulos y dominios son usados más de una vez para sintetizar el péptido, lo cual, consiste de varias secuencias.

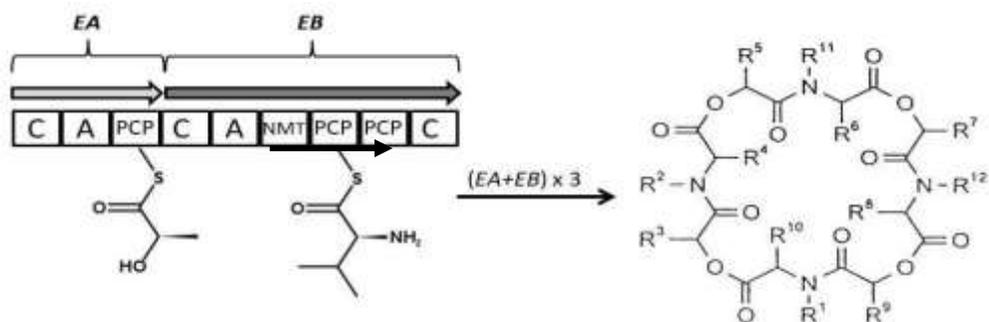


Figura 13. Biosíntesis iterativa de la micotoxina eniatina; la síntesis de cada estructura primaria se lleva a cabo tres veces para crear el metabolito (43).

- NRPS tipo C no lineal. Genera péptidos en los cuales la secuencia de los aminoácidos no está correlacionada al acomodo de los módulos.

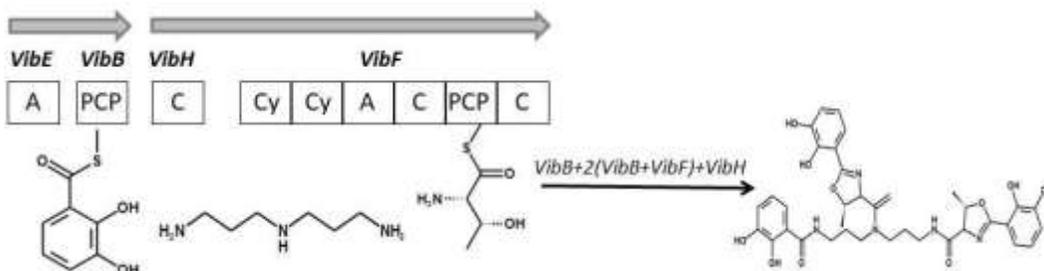


Figura 14. Biosíntesis no lineal del sideróforo vibriobactina. Se pueden repetir los procesos al azar para formar el producto final (43).

Algunos metabolitos biosintetizados por sistemas NRPS se pueden ver en la siguiente tabla.

<b>Metabolito</b>	<b>Microorganismo productor</b>	<b>Tipo de microorganismo</b>	<b>Actividad del metabolito</b>
Holomicina	<i>Streptomyces clavuligerus</i>	Actinobacteria	Antibiótico (44)
Salinosporamida K	<i>Salinispora pacifica</i>	Actinobacteria marina	Antitumoral (45)
Retimicina A	<i>Salinispora arenicola</i>	Actinobacteria marina	Antitumoral (45)
Actinomicina	Varias especies del género <i>Streptomyces</i> y	Actinobacteria	Antibiótico y antitumoral (46)
Anfomicina	<i>Streptomyces canus</i>	Actinobacteria	Antibiótico (47)
Daptomicina	<i>Streptomyces roseosporus</i>	Actinobacteria	Antibiótico (48)

Tabla 4. Ejemplos de metabolitos secundarios creados por el sistema NRPS, el microorganismo que lo produce y el uso que se le da al producto.

### 1.3.2 Sistemas PKS

Los sistemas de policétido sintasa (PKS) son sistemas multifuncionales expresados por un grupo de genes que al igual que NRPS codifican para módulos con múltiples actividades enzimáticas.

Estos productos se producen utilizando acetato o propionato únicamente como sustrato y mediante condensación-descarboxilación de ácidos carboxílicos por las policétido sintasas.

Los PKS forman tres grupos dependiendo de su secuencia, estructura primaria y mecanismo catalítico (49):

- El PKS tipo I tiene un mecanismo similar a la síntesis de ácidos grasos (FAS) y es responsable de la producción de una gran cantidad de metabolitos; en hongos los dominios se pueden usar repetidamente para sintetizar el policétido, mientras que en bacterias cada módulo se usa una sola vez.
- El PKS tipo II es responsable de producir compuestos aromáticos bacterianos y fúngicos, contiene enzimas que forman homodímeros y su único sitio activo cataliza la unión de sustrato, la elongación de la cadena y la ciclación de las reacciones para formar los policétidos.
- El PKS tipo III se han encontrado principalmente en plantas, aunque también están presentes en bacterias e incluso en hongos, las enzimas que participan en la biosíntesis de metabolitos tienen mayor diversidad funcional.

En una analogía estructural y funcional, los módulos del sistema PKS contienen cuatro dominios bases catalíticos (50):

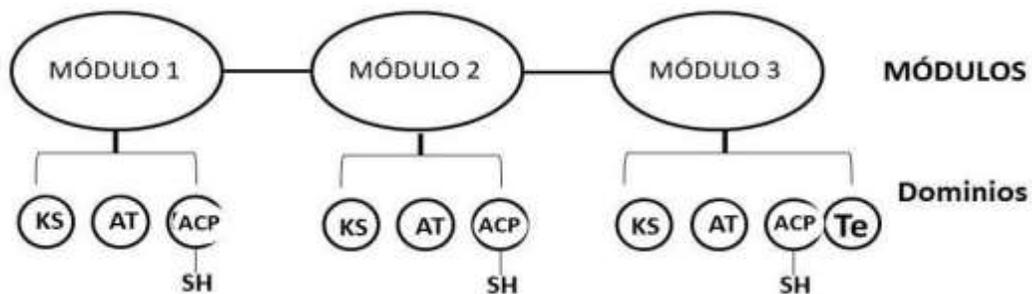


Figura 15. Cada módulo que comprenden la formación de policétidos contienen tres dominios básicos (C, A y PCP) y el dominio de liberación (Te), y en algunos casos pueden contener dominios auxiliares (KR, DH y ER) (50).

- el dominio acil-transferasa (AT) formado por cerca de 350 aminoácidos cuya función es seleccionar y activar el sustrato convirtiéndolo a malonil o metilmalonil-CoA;
- el dominio ACP es la proteína transportadora de acilos, está formada por 80-100 aminoácidos, su función es similar al dominio PCP del sistema NRPS, la cual sirve para comenzar la elongación de la cadena del policétido;

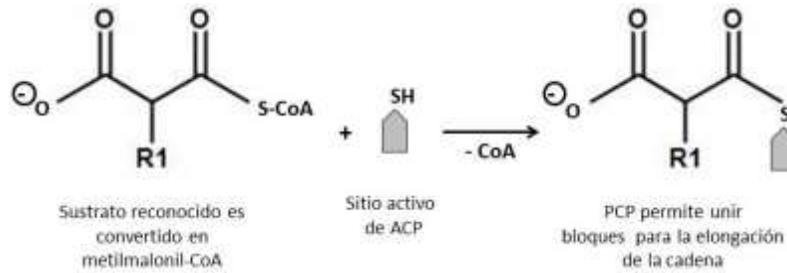


Figura 16. Reacción 7.

- el dominio cetosintasa (KS), formado por 450 residuos aproximadamente, cataliza la elongación descarboxilando el malonil unido a ACP formando un nucleófilo que reacciona con un grupo tioéster de la cadena adjunta, esta condensación genera una unidad de acetato con un grupo  $\beta$ -ceto;

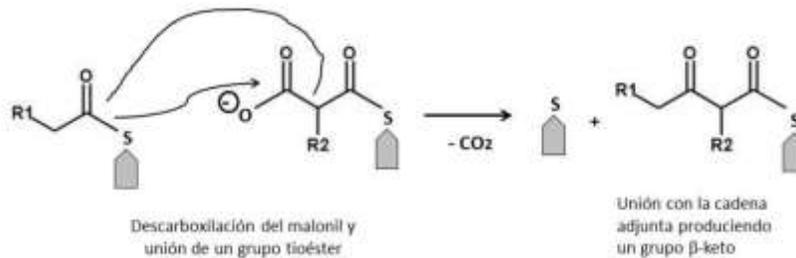


Figura 17. Reacción 8.

- y el dominio tioesterasa (Te), de 250 aminoácidos aproximadamente y que se encuentra al final de la cadena, su función es liberar el producto como una macrolactona que después puede cambiar a anillos cíclicos.



Figura 18. Reacción 9.

PKS también puede contener dominios auxiliares que se encuentran unidos a los dominios AT y ACP (51, 52).

- el dominio (KR) que se encarga de reducir el grupo  $\beta$ -ceto a un grupo hidroxilo, esta reacción es dependiente de NADPH;

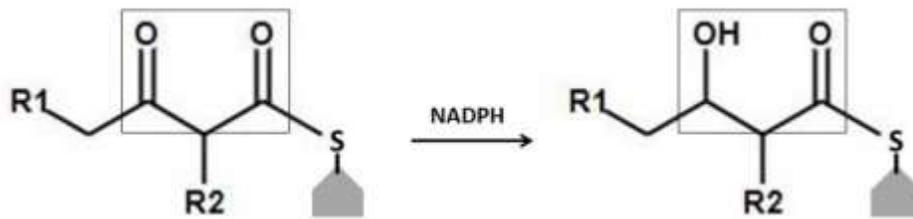


Figura 19. Reacción 10.

- el dominio de la deshidratasa (DH) actúa sobre el grupo  $\beta$ -hidroxilo resultando en un doble enlace entre la posición 2 y 3 de la cadena;

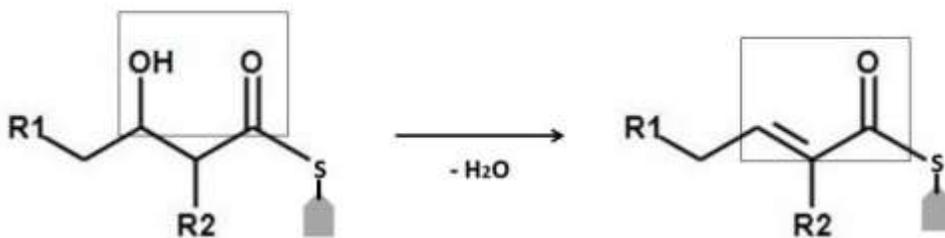


Figura 20. Reacción 11.

- El dominio de enoilreductasa (ER) se encarga de saturar la cadena en posición 2 y 3 que promueve la elongación del producto.

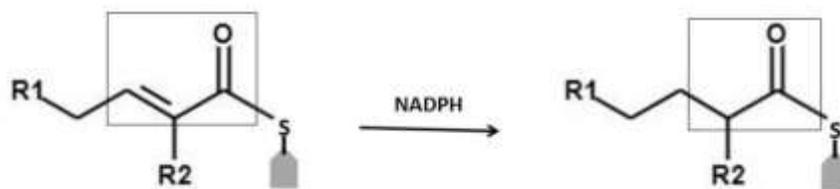


Figura 21. Reacción 12.

Los policétidos son metabolitos de gran importancia farmacológica, lo cual podemos observar en la siguiente tabla.

<b>Metabolito</b>	<b>Tipo de PKS</b>	<b>Organismo productor</b>	<b>Tipo de organismo</b>	<b>Actividad del metabolito</b>
Anfotericina B	PKS I	<i>Streptomyces nodosus</i>	Actinobacteria	Antifúngico (53)
Avermectina	PKS I	<i>Streptomyces avermitilis</i>	Actinobacteria	Antihelmítico (54)
Eritromicina	PKS I	<i>Saccharopolyspora erythraea</i>	Actinobacteria	Antibiótico (34)
Daunorubicina	PKS II	<i>Streptomyces</i> sp.	Actinobacteria	Antitumoral (55)
Tetraciclina	PKS II	<i>Streptomyces rimosus</i>	Actinobacteria	Antibiótico (56)
Pradimicina	PKS II	<i>Actinomadura hibisca</i>	Actinobacteria	Antifúngico (57)
Chalcone	PKS III	<i>Polygonum cuspidatum</i>	Planta	Varias propiedades farmacológicas (58)
Curcuminoides	PKS III	<i>Curcuma longa</i>	Planta	Varias propiedades farmacológicas (59)

Tabla 5. Ejemplos de metabolitos secundarios creados a partir de los diferentes tipos de sistema PKS donde podemos observar el organismo que lo produce y el uso que se le da al producto.

### 1.3.3 Sistemas híbridos NRPS-PKS

Existen compuestos bioactivos sintetizados por hibridación de los sistemas NRPS-PKS que crean diversidad estructural y pueden ser divididos en dos principales clases. El primero incluye productos naturales sintetizados individualmente por NRPS y PKS y acoplados eventualmente dentro de un producto final. En la segunda clase las enzimas de NRPS y PKS están funcionalmente conectadas entre sí dirigiendo la producción de un metabolito péptido-policétido híbrido.

Un ejemplo de esto es la producción de mixotiazol de *Stigmatella aurantica*.

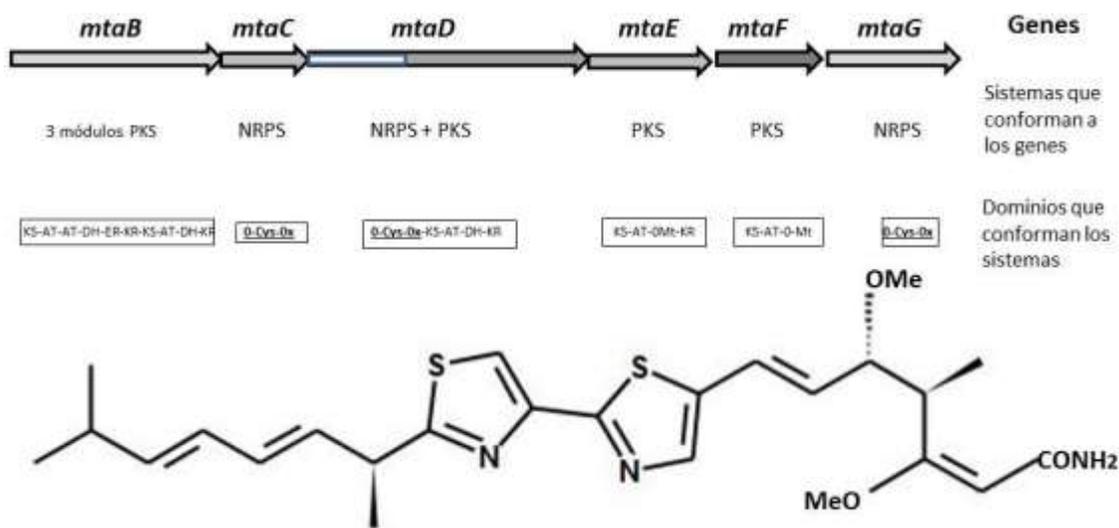


Figura 22. Ejemplo de la mezcla de los sistemas NRPS-PKS en la biosíntesis de mixotiazol de la bacteria *Stigmatella aurantica* (60).

Algunos ejemplos de metabolitos producidos por la combinación de los dos tipos de sistemas se pueden ver en la tabla siguiente.

Metabolito	Organismo productor	Tipo de microorganismo	Actividad del metabolito
Kirromicina	<i>Streptomyces collinus</i>	Actinobacteria	Antibiótico (61)

Rapamicina	<i>Streptomyces higoscopicus</i>	Actinobacteria	Antibiótico (62)
Virginiamicina	<i>Streptomyces virginiae</i>	Actinobacteria	Antibiótico (63)
Mixotiazol	<i>Stigmatella aurantica</i>	Mixobacteria	Antifúngico (64)
Haliamida	<i>Haliangium ochraceum</i>	Mixobacteria	Citotoxina (65)
Onnamida	<i>Theonella swinhoei</i>	Bacteria simbionte de esponja marina	Antitumoral (66)
Apratoxina A	<i>Lyngbya boullonii</i>	Cianobacteria marina	Antitumoral (67)

Tabla 6. Metabolitos producidos por la hibridación de los sistemas PKS-NRPS.

#### 1.4 BIOSÍNTESIS DE METABOLITOS SECUNDARIOS

Los genes de PKS y NRPS están ausentes en genomas menores a 3MB, y la capacidad de tener genes PKS y NRPS aumenta cuando el tamaño del genoma es mayor, como en las actinobacterias (68).

Estudios sugieren que la síntesis de péptidos no ribosomales está relacionado a la síntesis de proteínas ribosomales, indicando una unión en la evolución ancestral entre esas rutas metabólicas. Por ejemplo, la evolución aparente de la ruta metabólica de la avermectina, por genes de duplicación e intercambios en los dominios de PKS presente en *S. avermitilis* provoca más de una ruta sintética del metabolito (69).

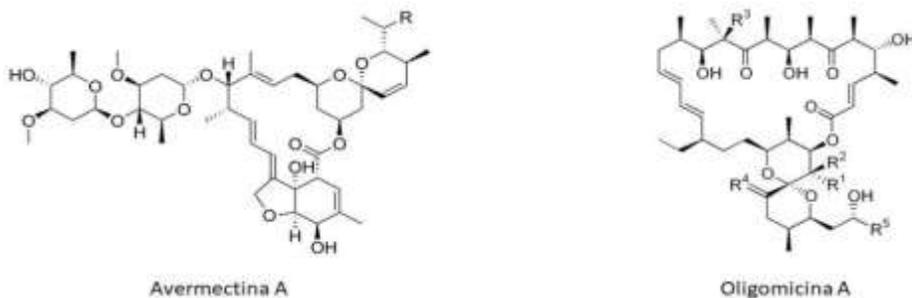


Figura 23. La avermectina A y la oligomicina A son estructuras básicas que puede producir la maquinaria biosintética de *S. avermitilis* (69).

Para la activación de rutas crípticas se utilizan métodos genéticos como mutagénesis químicas y transposones, amplificación y duplicación de genes, sobreexpresión de reguladores positivos, ruptura de reguladores negativos, modulación del aparato de traducción, modulación de post traducción de proteínas acarreadoras, expresión heteróloga, refactorización biológica sintética de promotores y sitio de unión a ribosomas y combinación de todos los anteriores. Para el ensamble de los sistemas NRPS y PKS en ingeniería genómica se utilizan técnicas de biosíntesis dirigida de precursores, manipulación de enzimas, manipulación de los módulos, dominios e intercambio de subdominio, modificación de sitios activos, y evolución dirigida de módulos específicos (70).

Los genes que codifican metabolitos secundarios pueden ser clonados dentro de cósmidos o cromosomas artificiales bacterianos (BAC) y se introducen en hospederos de expresión heteróloga, incluyendo cepas que crecen rápido, cepas que se pueden manipular con facilidad, o cepas que producen grandes cantidades o clases particulares de metabolitos secundarios. Por ejemplo, el gen biosintético de daptomicina de 128kb se insertó en un BAC y después se incorporó en el cromosoma de *Streptomyces lividans* y la recombinación produjo un mayor rendimiento, cerca de 60mg/L de daptomicina (71).

Los más recientes avances en ingeniería molecular sugieren que la biosíntesis combinada de rutas metabólicas mejora las propiedades de antibióticos. Por ejemplo, daptomicina, un antibiótico contra patógenos Gram positivos difíciles de combatir, es producida por el sistema NRPS de *Streptomyces roseosporus* y su ruta biosintética fue, para producir nuevos metabolitos derivados; algunos de los cuales son antibióticos muy activos (72).

La genómica también ha estado enfocada en enzimas que modifican el núcleo de las estructuras de metabolitos secundarios; otra opción en la manipulación de la biosíntesis de metabolitos han sido los mecanismos de halogenación, por ejemplo, se insertaron genes de halogenasas al gen de PKS tipo II de *S.albus* y *S. coelicolor* y ambos produjeron antibióticos policétidos halogenados (73), lo que permitió crear metabolitos nuevos.

Hay estudios recientes de la aplicación de este enfoque molecular combinado con otras técnicas para la identificación y producción de metabolitos. Hamedi J. y colaboradores (2015) aislaron 60 cepas de actinobacterias ambientales de suelos de Irán y se les aplicó técnicas moleculares para detectar el sistema NRPS, como resultado obtuvieron 30 cepas con la presencia del sistema (700pb), su secuencia se comparó en la base de datos del NCBI confirmando entre 60-80% de similitud con 10 secuencias existentes. Posteriormente realizaron la fermentación en medio ISP2 y la extracción de metabolitos de las cepas que dieron positivo a NRPS, usaron cloro o-dianisidina como reactivo para detectar péptidos del extracto crudo y analizaron la diversidad química de los metabolitos mediante HPLC-MS con espectroscopía UV-visible. Finalmente realizaron ensayos antimicrobianos contra *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Aspergillus niger* y *Candida albicans*; y se realizó la amplificación del gen 16S rRNA para identificar las cepas productoras de metabolitos. Obtuvieron resultados positivos en la detección de péptidos en 5 cepas; algunos compuestos identificados fue la insostamicina o monencina, micolactona y miamicina, además de detectar 5 nuevos metabolitos con diferentes pesos moleculares los cuales no se encontraban registrados en las bases de datos. La identificación con 16S rRNA identificó a los géneros *Nocardia*, *Saccharothrix*, *Micromonospora* y *Streptomyces* entre las cepas productoras, teniendo *Nocardia* amplio espectro antimicrobiano.

La técnica molecular de detección de sistemas es muy útil para búsqueda de compuestos bioactivos, eliminando desde el primer paso cepas que no son potencialmente productoras y evitando el análisis completo, pérdida de tiempo y recursos en los ensayos bioquímicos.

La creciente preocupación por la aparición de resistencia a los antibióticos obliga a la industria farmacéutica a buscar nuevos agentes antimicrobianos. La disponibilidad de secuencias genómicas ha permitido el desarrollo de la minería computacional como una herramienta importante en el descubrimiento de productos naturales con efecto antibiótico.

## **2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

Un grave problema a nivel mundial es la resistencia microbiana a los antibióticos que está provocando un incremento en el riesgo de propagación de la enfermedad, la incapacidad para tratar enfermedades infecciosas comunes, así como el aumento de la discapacidad y las muertes. Por otra parte, también hay una búsqueda de antiparasitarios y antifúngicos como control biológico en los cultivos. Y podríamos mencionar otras enfermedades endémicas (cardiovasculares, parasitarias, dérmicas, entre otras.) que se reportan en mayor o menor medida dependiendo del país o región geográfica.

Por lo anterior, es de gran importancia nuevos compuestos que combatan las enfermedades de este siglo: la búsqueda de anticancerígenos con especificidad para cada tipo de cáncer (75), antibióticos eficaces contra las cepas más peligrosas de bacterias resistentes (76) antifúngicos y antiparasitarios naturales en cultivos para evitar la contaminación ambiental y riesgos sanitarios a personas (77) y otras moléculas bioactivas.

Aunque el desarrollo y la producción de nuevos fármacos conlleva periodos prolongados de estudios, la biología molecular es una herramienta que ha avanzado y permite acortar el tiempo de búsqueda de moléculas bioactivas.

## **3.JUSTIFICACIÓN**

Se ha observado que las actinobacterias son un grupo de bacterias con capacidad para producir metabolitos secundarios, estas bacterias son responsables de casi el 50% de los antibióticos naturales y son capaces de producir antifúngicos, antihelmínticos, inmunosupresores, etc. Por ello, las actinobacterias siguen siendo una alternativa para la búsqueda de nuevos fármacos como opción al combate de enfermedades y para el control biológico de plagas.

El estudio analizó 122 cepas de actinobacterias de origen clínico para buscar los sistemas PKS-I, PKS-II, NRPS-I y NRPS-II para predecir la producción de metabolitos biosintéticos. Se evaluará la actividad antimicrobiana de las cepas de estudio contra cepas de bacterias multirresistentes.

#### **4.HIPÓTESIS**

Las actinobacterias de origen clínico presentan sistemas biosintéticos para la producción de metabolitos secundarios.

#### **5.OBJETIVOS**

General: Detectar los sistemas biosintéticos implicados en la producción de metabolitos secundarios en cepas de actinobacterias de origen clínico.

Específicos:

- Buscar los sistemas biosintéticos en las cepas de estudio.
- Hacer la identificación molecular por amplificación del 16S rRNA de las cepas que presenten uno o más sistemas biosintéticos.
- Detectar actividad antimicrobiana contra cepas multirresistentes.

## 6.DISEÑO METODOLÓGICO

### 6.1 Diseño del estudio

Descriptivo. Se determinó si se encuentran presentes sistemas biosintéticos NRPS I, NRPS II, PKS I y PKS II en el genoma de actinobacterias.

Transversal. Los datos se obtuvieron haciendo una sola medición para la identificación de los sistemas biosintéticos.

Observacional. Descripción de la ausencia o presencia de una característica en los microorganismos.

Prospectivo. Las mediciones se hicieron con bacterias en crecimiento.

**6.2 Universo de trabajo:** Bacterias de la familia *Actinomycetaceae* de origen clínico.

**Tamaño de muestra:** 122 cepas

**Variables del estudio:** Presencia de sistemas biosintéticos NRPS I, NRPS II, PKS I y PKS II.

### 6.3 Criterios:

Inclusión. Bacterias de origen clínico de la familia *Actinomycetaceae*.

Exclusión. Bacterias que no sean de la familia de las actinobacterias y actinobacterias de origen ambiental.

Eliminación. Cepas que no se encuentren en estado puro y cepas que no presenten crecimiento.

## **6.4 Procedimiento**

### **6.4.1. Obtención de las cepas**

Las cepas de estudio fueron donadas por el Q.B.P. Cudberto Contreras del Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológica de la Ciudad de México, aisladas de diferentes casos clínicos de actinomicetoma y nocardiosis desde el año 1942 hasta 2015.

### **6.4.2 Crecimiento de las cepas**

Para comenzar a trabajar las cepas de estudio se activaron en medios de cultivo y en condiciones óptimas para su crecimiento, el cual se llevó a cabo de la siguiente manera:

- Se realizaron placas estériles con medio Agar BHI (Marca BDBioxon, cat.6063965) con polvo de papa deshidratada (comercial) al 1%.
- Las cepas se sembraron por estría cruzada en las placas de medio y se incubaron a 37°C hasta su crecimiento. Las cepas que no presentaron crecimiento se descartaron.

### **6.4.3 Descripción morfológica.**

La descripción morfológica de las cepas nos permite comparar similitudes a simple vista en su crecimiento y en ocasiones podemos observar contaminación. Se desarrolló de la siguiente manera:

- Para la descripción macroscópica se observaron y anotaron las características de las colonias en placa. Si hubo más de dos tipos de colonias significa contaminación, y se resembró hasta obtener un tipo de colonia.

<b>Color</b>	<b>Forma</b>	<b>Textura</b>	<b>Tamaño</b>
Blanco	Redonda	Plana	Chica
Crema	Irregular	Elevada	Mediana
Amarillo	Estrella	Rugosa	Grande
Anaranjado		Suave	
Rojo		Dura	
Café			

Tabla 7. Características coloniales.

- En la descripción microscópica se observaron las células y se anotaron sus características. Dos tipos de células, o células Gram negativas significa contaminación y se hizo purificación. Se realizó la tinción de Gram y se observó al microscopio (Marca Leika, mod.1349521X) con el objetivo 100X

<b>Forma de la célula</b>	<b>Tipo de Gram</b>
Cocos	
Bacilos	Gram-positivas
Hifas	Gram-negativas
Cocobacilares	

Tabla 8. Características celulares

#### **6.4.4 Extracción de ADN**

Se llevó a cabo siguiendo el protocolo especificado por el fabricante del kit Promega Wizard® del laboratorio Genomic.

- Se resuspendieron las células con 480 µl de EDTA 0.5 M en un tubo eppendorf de 2 ml.
- Se adicionó 120 µl de lizozima y se mezcló cuidadosamente.
- La muestra se incubó a 37°C por 1 hora, se centrifugó a 14000 rpm durante 2 minutos y se removió el sobrenadante.
- Se agregó 600 µl de solución de lisis nuclear de paquete de purificación de ADN y se mezcló.
- Se incubó a 80°C durante 5 minutos y se dejó enfriar a temperatura ambiente.
- Se adicionó 3 µl de solución de RNAsa y se mezcló por inversión del tubo por 3 veces.
- Se incubó el tubo a 37°C por 1 hora, y se dejó enfriar a temperatura ambiente.
- 200 µl de solución de precipitación de proteínas se añadió y agitó con vortex durante 20 segundos.
- Se incubó la mezcla en hielo durante 5 minutos.
- Posteriormente se centrifugó a 14000 rpm por 3 minutos y se transfirió el sobrenadante a un tubo eppendorf de 1.5 ml estéril el cual contenía 600 µl de isopropanol
- Después se mezcló suavemente hasta que se observó la formación de hebras de DNA.
- Se centrifugó a 14000 rpm durante 2 minutos
- Fue drenado cuidadosamente el tubo en papel absorbente.
- Se adicionó 600 µL de etanol al 70% y se agitó varias veces el tubo delicadamente cuidando de no despegar el pellet de DNA.
- Se centrifugó a 14000 rpm durante 2 minutos, se eliminó cuidadosamente el etanol y se dejó secar al aire de 10 a 15 minutos.
- Finalmente, se agregó 100 µl de solución de rehidratación y fue colocado en refrigeración a 4°C por una noche.

#### **6.4.5 Amplificación del inserto del gen 23S rRNA**

Esta técnica sirve para verificar la pureza de las cepas, debido a que todas las actinobacterias amplifican un inserto de 350 pb y las eubacterias de 250pb (78), ver tabla 9.

Si se vio una banda de 350pb se continuó con el estudio de cada cepa, si presentó una banda de 250pb se elimina la cepa, y si presentó las dos bandas se resembró hasta su purificación.

#### **6.4.6 Búsqueda de los sistemas biosintéticos**

La amplificación nos permite encontrar mediante PCR uno o varios genes específicos. Una vez extraído el ADN se buscaron los sistemas PKS I, PKS II, NRPS I y NRPS II bajo las condiciones que se describen en la tabla 9 en un termociclador marca Axygen (mod.maxygen II). Para visualizar la longitud del gen amplificado, se realizó una electroforesis en agarosa a 120 Volts y 300  $\mu$ Amperes.

#### **6.4.7 Identificación molecular de las cepas**

Para conocer el género y la especie de las cepas que presentaron uno o más sistemas biosintéticos se amplificó el gen 16S *r*RNA que tiene un tamaño de 1500-1600 pb, bajo las condiciones que se indican en la tabla 9.

<b>GEN AMPLIFICADO</b>	<b>PRIMERS</b>	<b>TAMAÑO DEL GEN</b>	<b>CONDICIONES DE PCR</b>	<b>REF.</b>
Inserto del gen 23S rRNA	InsF (5'-MADGCGTAGNCG AWGG-3') InsR (5'-GTGWCGGTTNBGG TA-3')	350 pb	Desnaturalización a 94°C por 5 minutos, y 34 ciclos de 94°C por 30 segundos, 50°C por 20 segundos, 72°C por 40 segundos y 72°C por 7 minutos.  Visualizar en agarosa al 2%.	78
PKS I	K1f(5'-TSAAGTCSAACATCGGBCA-3') M6r (5'-CGCAGGTTSCSGTACCAGTA-3')	1100-1200 pb	Desnaturalización a 95°C por 5 minutos, y 34 ciclos de 95°C por 30 segundos, 55°C por 2 minutos, 72°C por 4 minutos y 72°C por 10 minutos  Visualizar en agarosa al 1.5%.	79
PKS II	KS $\alpha$ (5'-TSGRCTACRTCAACGGSCACGG-3') KS $\beta$ (5'- TACSAGTCSWTCGCCTGGTTC-3')	1000 pb	Desnaturalización a 95°C por 5 minutos, y 35 ciclos de 95°C por 30 segundos, 58°C por 20 segundos, 72°C por 4 minutos y 72°C por 10 minutos  Visualizar en agarosa al 1%.	80
NRPS I	A3f (5'-GCSTACSYSATSTACACSTCSGG-3') A7r (5'-SASGTCVCCSGTSCGGTAS-3')	700-800 pb	Desnaturalización a 95°C por 5 minutos, y 35 ciclos de 95°C por 30 segundos, 59°C por 2 minutos, 72°C por 4 minutos y 72°C por 10 minutos.  Visualizar en agarosa al 1.5%.	79
NRPS II	NRPSF2 (5'-CGCGCGCATGTACTGGACNGGNGAYYT-3')	250pb	Desnaturalización a 95°C por 5 minutos, y 40 ciclos de 95°C por 30 segundos, 63°C por 45	81

	NRPSR1 (5'-GGAGTGGCCGCCCARNYBRAARAA -3')		segundos, 72°C por 90 segundos y 72°C por 10 minutos. Visualizar en agarosa al 0.8%.	
Gen 16S rRNA	8f (5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3') 1492R(5'-TACGGYTACCTTGTTACGACTT-3')	1500-1600pb	Desnaturalización a 94°C por 5 minutos, y 40 ciclos de 94°C por 1 minuto, 59°C por 30 segundos, 72°C por 1 minuto y 72°C por 10 minutos Visualizar en agarosa al 1%.	82

Tabla 9. Condiciones para la amplificación de los genes buscados.

#### **6.4.8 Cuantificación del amplicón**

Una vez que se amplificó el gen 16S rRNA se hizo una cuantificación para saber la concentración del ADN y posteriormente secuenciar. Se utilizó un espectrofotómetro marca BIOTECH®, modelo EPOCH siguiendo el protocolo del fabricante.

- Se limpió la microplaca para el espectrofotómetro con agua destilada para quitar contaminantes.
- Se agregó 2µl de la solución blanco en un pocillo, y 2µl de cada amplicón en pocillos diferentes.
- La microplaca se cerró, después se colocó sobre la bandeja del espectrofotómetro y se cerró la bandeja.
- Abrimos el programa EPOCH y seleccionamos el protocolo preestablecido para la “Cuantificación de ADN”.
- Se anotaron los resultados de pureza (relación 230/260 y 260/280) y cuantificación de ADN (µg/µl).

Los resultados que esperamos obtener para asegurar la pureza y concentración óptima fueron:

- En la relación 260/280 con valores entre 1.6 a 2.
- En la relación 230/260 con valores >1.5
- ≈ 60 µg/µl de ADN

#### **6.4.9 Purificación del amplicón**

Se purificó el producto de amplificación del gen 16S rRNA para enviarlo a secuenciar, se siguió el protocolo del fabricante:

- Se colocó una columna de purificación (filtro) en el tubo para centrifuga de Amicón Ultra-0.5.
- Se adicionó la muestra (producto de amplificación) y se agregó 400µl de agua libre de nucleasas al tubo con la columna.

- Se colocaron los tubos tapados en la centrífuga, alineando la tapa del tubo al centro de la centrífuga.
- Se centrifugó a 14,000 rpm por 30 min.
- Se removió la columna (filtro) y se colocó de manera invertida sobre un tubo para centrífuga de Amicon Ultra-0.5 nuevo.
- Se colocó el tubo con la columna invertida en la centrífuga colocando la tapa del tubo en el centro de la centrífuga.
- Se centrifugó a 1,000 rpm por 2 min., posteriormente se retiró la columna y se almacenó a 4°C hasta el envío a secuenciar.
- Se mandó secuenciar al laboratorio MacroGen en Maryland, Estados Unidos.

#### **6.4.10 Análisis de secuencias**

Una vez que obtuvimos las secuencias del gen 16S RNA se realizó correcciones y alineamientos con el programa BioEdit (83)

Las secuencias corregidas se compararon en la base de datos Blast (Basic Local Alignment Search Tool) del GenBank (84) y en la base de datos EzBioCLOUD (85) para obtener el nombre de género y especie de cada cepa.

#### **6.4.11 Análisis filogenético**

Se realizó un alineamiento múltiple de las secuencias con el programa BioEdit. Después se construyó el árbol filogenético por el método de máxima parsimonia con el programa MEGA (versión 6.0) (86) utilizando secuencias de cepas de referencia obtenidas de la base de datos GenBank para agrupar y para usar como raíz.

#### **6.4.12 Prueba de actividad antimicrobiana.**

1. Sembrar con una línea media 30 cepas al azar en medio en placa de agar dextrosa Sabouraud.

2. Sembrar las cepas resistentes/multirresistentes por método de cruzamiento de líneas para observar el efecto inhibitor de las cepas de estudio (87).

- *Escherichia fergusonii*
- *Klebsiella varicola*
- *Klebsiella oxytoca*
- *Klebsiella pneumoniae sub. ozanae*
- *Klebsiella pneumoniae sub. pneumoniae*

### **6.5 Implicaciones bioéticas**

La investigación se realizó con base a la siguiente normativa nacional:

1. La Ley General de Salud en Materia de Investigación para la Salud, título IV Bioseguridad de las Investigaciones, Capítulo 1 de la Investigación con microorganismos patógenos (88).
2. La Norma Oficial Mexicana NOM-087-ECOL-SSA1-2002, Protección ambiental, Salud ambiental, Residuos peligrosos biológico-infecciosos, Clasificación y especificaciones de manejo, Capítulo 4, 5 y 6. (89)
3. La Norma Oficial Mexicana NOM-065-SSA1-1993 que establece las especificaciones sanitarias de los medios de cultivo en microbiología. (90)

La investigación también cumple con la siguiente normativa internacional:

1. El Manual de Bioseguridad en el Laboratorio de la Organización Mundial de la Salud (OMS). Siguiendo los lineamientos referentes a la manipulación microbiológica (91)
2. Reglamento de Bioseguridad en Laboratorios Microbiológicos y Médicos del Centro para el Control y Prevención de Enfermedades- Instituto Nacional de Salud (CDC-NIH) de Estados Unidos, Sección II, III y VI.

## 7. RESULTADOS

### 7.1 Artículo aceptado

#### 7.1.1 Título del artículo aceptado

Current techniques for the search for natural products in actinobacteria

#### 7.1.2 Página frontal del artículo

---

---

**ACG** *Rec. Nat. Prod. X:X (202X) XX-XX* records of natural products

**publications**

---

---

**Current Techniques for the Search for Natural Products in Actinobacteria**

Janette Berenice González-Nava <sup>1</sup>, Scarlett Alonso-Carmona <sup>1</sup>,  
Gaudy Lizeth Manzanares-Leal <sup>1</sup>, Horacio Sandoval-Trujillo <sup>2</sup>  
and Ninfa Ramírez Durán <sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> *Faculty of Medicine, Universidad Autónoma del Estado de México, Toluca, Estado de México, México*  
<sup>2</sup> *Department of Biological Systems, Universidad Autónoma Metropolitana, Ciudad de México, México*

*(Received July 15, 2021; Revised September 24, 2021; Accepted September 28, 2021)*

---

**Abstract:** The actinobacteria, also referred to as actinomycetes, have been the most widely used bacteria to produce industrial interest compounds due to their great biosynthetic capacity to generate structural diversity molecules. The actinobacteria with the most significant biosynthetic potential are the genus *Streptomyces*, *Saccharopolyspora*, and *Micromonospora* containing groups of biosynthetic genes such as polyketide synthase systems, non-ribosomal peptide synthase systems, terpenoid systems, ribosomally synthesized and post-translationally modified peptide systems, among others. This review focuses on genomic mining techniques and current helpful software to search for new natural products in actinobacteria. Currently, molecular techniques have been developed to improve the isolation of natural products, and bioinformatics programs, many are free to access, have been designed to analyze genes and microbial genomes that predict new molecule production. Thanks to these techniques, new natural products of industrial interest have been found in rare actinobacteria such as *Nocardia* and *Rhodococcus*.

**Keywords:** Actinobacteria; bioinformatics; genomic mining. © 2021 ACG Publications. All rights reserved.

---

### 1. Introduction

In the 1980s, there were significant advances in genetics and phylogenetic analysis, such as sequencing the *rrs* gene, which codes for ribosomal RNA, used to identify bacterial species; this led to the discovery of new species and the taxonomic reassignment of others already known. In the 1990s, the improved PCR and DNA sequencing techniques had a rapid expansion, leading to the sequencing of complete bacterial genomes, promoting research, and discovering new natural products [1]. In 2000, biosynthetic gene clusters (BGC) were searched for in the genome of microorganisms, mainly in actinobacteria, to predict secondary metabolites' production with pharmacological activity. The study of genomic sequences made it clear that actinobacteria have greater biosynthetic capacity than previously known; however, it was also discovered that there are cryptic gene clusters even in widely studied species biosynthetic pathways [2].

The best studied BGCs are the polyketide synthase systems (PKS) and non-ribosomal peptide synthase systems (NRPS) that are distributed in the genomes of actinobacteria; however, despite the

\* Corresponding author: E-Mail [ninfard@hotmail.com](mailto:ninfard@hotmail.com)

### 7.1.3 Carta de aceptación

Records of Natural Products

Dear Professor Ninfa Ramírez-Durán,

I am happy to inform you that your manuscript has been accepted for publication in Records of Natural Products. The Production office and billing office of ACG publications will inform you within 2-10 days for proof copy and other required issues.

I would like to thank you for your support to the journal and wish to get new submissions from you and your colleagues in future.

Sincerely yours

Ahmet C. Gören

Records of Natural Products

### 7.1.4 Resumen

**Abstract:** The actinobacteria, also referred to as actinomycetes, have been the most widely used bacteria to produce industrial interest compounds due to their great biosynthetic capacity to generate structural diversity molecules. The actinobacteria with the most significant biosynthetic potential are the genus *Streptomyces*, *Saccharopolyspora*, and *Micromonospora* containing groups of biosynthetic genes such as polyketide synthase systems, non-ribosomal peptide synthase systems, terpenoid systems, ribosomally synthesized and posttranslationally modified peptide systems, among others. This review focuses on genomic mining techniques and current helpful software to search for new natural products in actinobacteria. Currently, molecular techniques have been developed to improve the isolation of natural products, and bioinformatics programs, many are free to access, have been designed to analyze genes and microbial genomes that predict new molecule production. Thanks to these techniques, new natural products of industrial interest have been found in rare actinobacteria such as *Nocardia* and *Rhodococcus*.

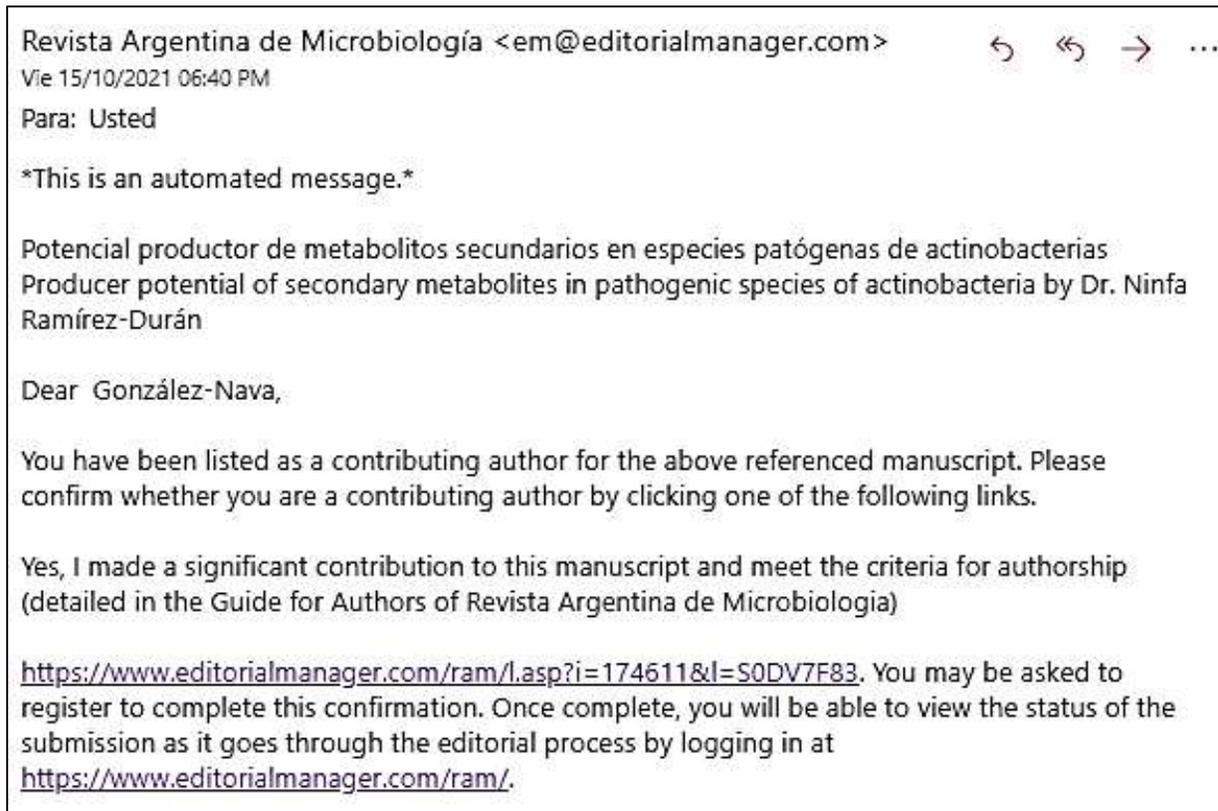
**Keywords:** Actinobacteria; bioinformatics; genomic mining. © 2021 ACG Publications. All rights reserved.

## 7.2 Artículo enviado

### 7.2.1 Título del artículo enviado

**Potencial productor de metabolitos secundarios en especies patógenas de actinobacterias**

### 7.2.2 Carta de envío



### 7.2.3 Resumen

El estudio de actinobacterias para encontrar nuevas alternativas terapéuticas ha surgido en los últimos años por su gran capacidad biosintética de metabolitos secundarios de interés farmacológico. Se ha observado que las actinobacterias aisladas de entornos poco explorados contienen genes capaces de sintetizar nuevos productos naturales como los antimicrobianos. El objetivo de este estudio fue buscar mediante técnicas moleculares sistemas biosintéticos NRPS-I NRPS-II, PKS-I y PKS-II en 112 cepas de actinobacterias de origen clínico y probar su actividad antimicrobiana contra cepas multirresistentes. Se detectó por lo menos un sistema biosintético en 110 cepas de estudio, el sistema NRPS-I fue el más frecuente, seguido de PKS-II, luego PKS-I y el menos frecuente fue el sistema

NRPS-II. El género *Nocardia* se identificó en 109 cepas dividido en 12 especies: *N. brasiliensis* (78 cepas), *N. farcinica* (7 cepas), *N. vulneris* (3 cepas), *N. beijingensis* (2 cepas), *N. nova* (3 cepas), *N. cyriacigeorgica* (4 cepas), *N. exalbida* (1 cepa), *N. otitidiscaviarum* (5 cepas), *N. arthritidis* (2 cepas), *N. veterana* (2 cepas), *N. wallacei* (1 cepa) y *N. mexicana* (1 cepa). También se identificó la especie *Streptomyces albus* en 3 cepas. Se demostró la actividad antimicrobiana de 15 cepas de actinobacterias contra las cepas multirresistentes: 8 cepas inhibieron el crecimiento de *K.oxytoca* H793, 6 cepas inhibieron a *E. fergusonii* Sec23, 4 cepas inhibieron a *K. pneumoniae sub. ozaenae* H759, 4 cepas inhibieron a *K. pneumoniae sub. pneumoniae* H1064 y 2 cepas inhibieron a *K. variicola* H776.

**Palabras clave:** Sistemas biosintéticos; antimicrobianos; actinobacterias; alternativas terapéuticas.

## 8.Resultados adicionales

La figura 24 muestra el árbol filogenético de las especies de *N. brasiliensis*. Se usó el método neighbor-joining, bootstrap de 1000 repeticiones y distancia evolutiva con Kimura 2-parámetros. Se observan 16 grupos (marcados de colores), donde 5 grupos (marcados con rojo) tienen cepas con un porcentaje de identidad < 98.6% y 8 cepas que no tienen grupo.

Podemos observar diferencias grupos entre cepas de la misma especie, debido a las posibles diferencias evolutivas.

En la figura 25 podemos observar el árbol filogenético de las especies *N. farcinica*, *N. beijingensis*, *N. nova*, *N. otitidiscaviarum*, *N. exalbida*, *N. cyriacigeorgica*, *N. mexicana*, *N. wallacei*, *N. vulneris*, *N. veterana* y *N. arthritidis*. Se usó el método neighbor-joining, bootstrap de 1000 repeticiones y distancia evolutiva con Kimura 2-parámetros. Los grupos se forman respecto a las diferentes especies de *Nocardia*, con excepción de las cepas de 4601 identificada como *N. arthritidis* y 4459 identificada como *N. exalbida*; por lo que es conveniente hacer más pruebas que definan estas cepas con su especie.

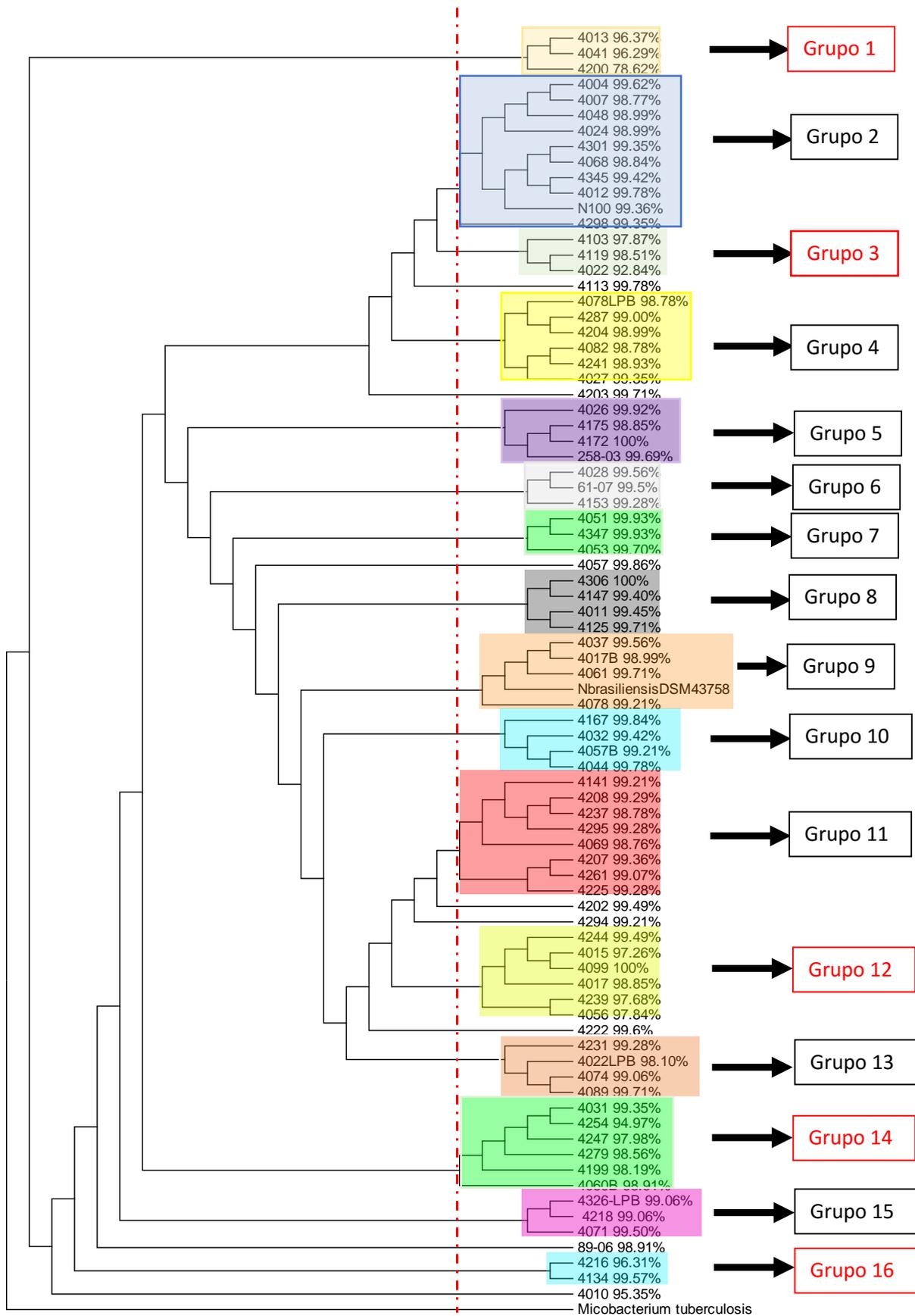


Figura 24. Árbol filogenético de *N.brasiliensis*

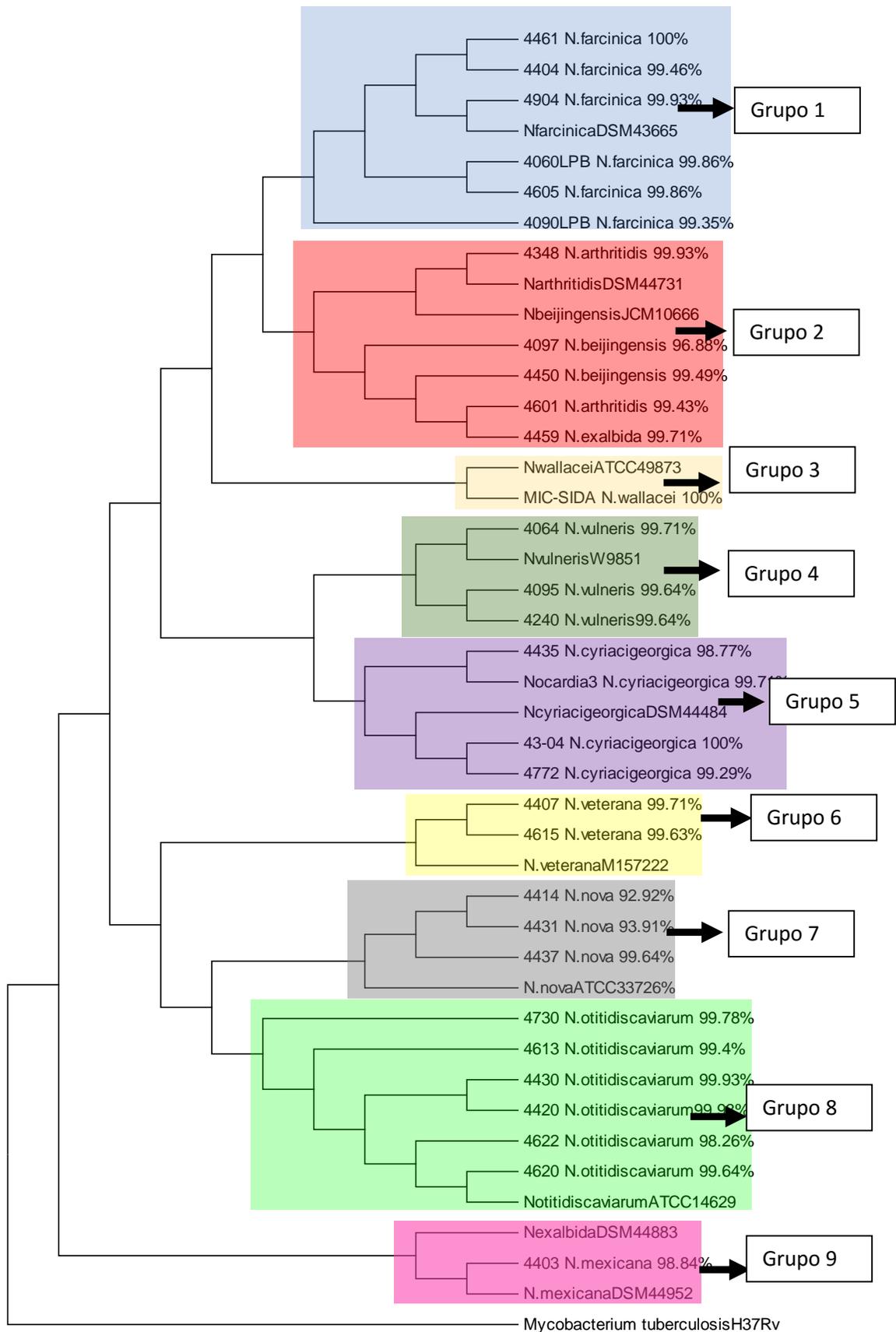


Figura 25. Árbol filogenético de *Nocardia*

El árbol filogenético de *Actinomadura* se utilizó el método neighbor-joining, bootstrap de 1000 repeticiones y distancia evolutiva con Kimura 2-parámetros. Se formaron 3 grupos: el grupo 1 conformado por dos cepas de estudio identificadas como *A. geliboluensis* y 2 cepas tipo de la misma especie; el grupo 2 conformado por 1 cepas de estudio identificada como *A. nitritigenes*, 2 cepas tipo de la misma especie y 1 cepa tipo de la especie *A. montaniterrae*; y el grupo 3 conformado por las dos cepas de estudio identificadas de dos especies diferentes, *A. geliboluensis* y *A. nitritigenes*, ver figura 26.

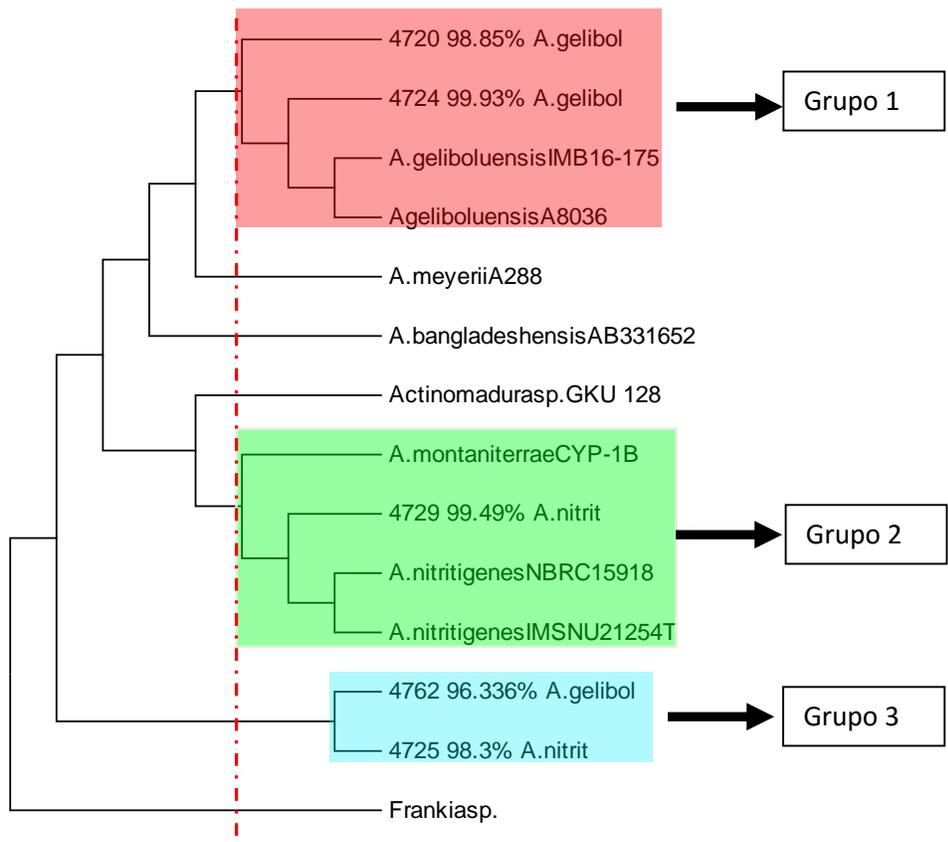


Figura 26. Árbol filogenético de *Actinomadura*. En cuadro rojo se agrupan las especies *A. geliboluensis*, en cuadro verde se agrupan las especies *A. nitritigenes* y en el cuadro azul están las cepas 4762 y 4725 que no se agruparon con cepas de su misma especie.

En el árbol filogenético de *Streptomyces* se utilizó el método neighbor-joining, bootstrap de 1000 repeticiones y distancia evolutiva con Kimura 2-parámetros. *S. albus* mostró que las cepas de estudio se encuentran en el mismo grupo que las cepas tipo de la misma especie, ver figura 27.

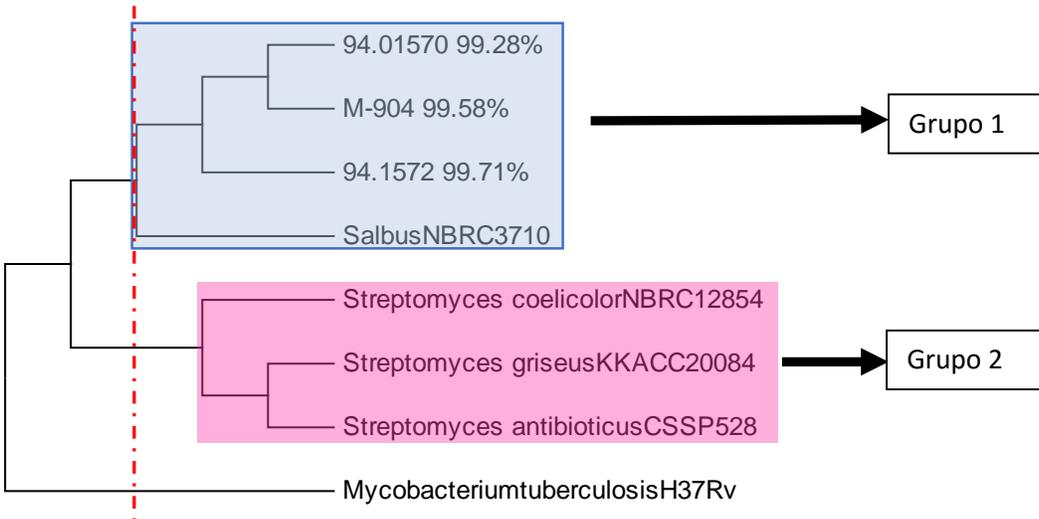


Figura 27. Árbol filogenético de *Streptomyces*. En cuadro azul se agrupan las especies *S. albus*, en cuadro rosa se agrupan especies de referencia.

La cepa 4085 fue la única cepa de *R. rhodochrous*, por lo que se realizó un árbol filogenético con cepas descargadas de NCBI para formar grupos, donde la cepa de estudio se encuentra ubicada en el grupo de su especie, ver figura 28. El método neighbor-joining, bootstrap de 1000 repeticiones y distancia evolutiva con Kimura 2-parámetros

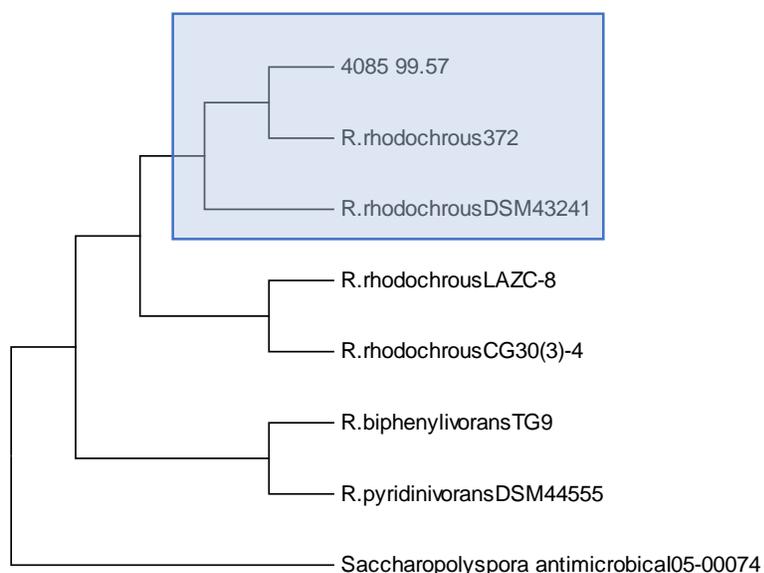


Figura 35. Árbol filogenético de *Rhodococcus*. En cuadro azul está la cepa de estudio agrupada con cepas de referencia de la misma especie.

## 9.CONCLUSIONES

Las características morfológicas de las actinobacterias son muy particulares entre algunos géneros e incluso entre especies, de las 122 cepas utilizadas en este estudio, se formaron 3 grupos respecto a su forma celular y colonial. Un grupo con morfología macroscópica característica del género *Nocardia* que microscópicamente presentaron hifas Gram positivas que fragmentaban. Por otra parte, el segundo grupo tuvo características macroscópicas de *Streptomyces* con células Gram positivas, pero en forma de hifas ramificadas. Y el tercer grupo tuvo morfología macroscópica del género *Actinomadura* con hifas al observarse microscópicamente. Si bien, la descripción morfológica no es usada para la identificación a nivel de género y especie, nos ayuda a determinar si las cepas utilizadas pertenecen a la familia de actinobacterias.

Con los *primers* utilizados se pudo detectar por lo menos un sistema biosintético en 120 cepas de estudio, en todas estas cepas se detectó el sistema biosintético NRPS-I que es capaz de codificar compuestos como cefamicina, vancomicina, balhemicina, pristinamicina, actinomicina y cloroeremomicina. El sistema NRPS-II codifica compuestos como bleomicina, moduropeptina, kedarcidina y anfomicina. El sistema

PKS-I codifica compuestos como rifamicina, avermectina, eritromicina, oleandomicina, nidamicina, pikromicina, FK-506, nistatina, entre otros. El sistema PKS-II es capaz de codificar compuestos como daunorubicina, mitramicina, tetraciclina, pradimicina, etc.; por ello, podemos concluir que las cepas de actinobacterias utilizadas en el estudio tienen la capacidad de producir compuestos relacionados a los mencionados.

Los géneros identificados con el gen 16S rRNA fueron *Nocardia*, *Rhodococcus*, *Actinomadura* y *Streptomyces*. *Nocardia* fue el género más abundante y la especie *N. brasiliensis* la especie más frecuente, debido a que las cepas utilizadas son de una colección de aislamientos clínicos; *N. brasiliensis* es el principal agente causal de infecciones por actinobacterias. En los últimos años ha aumentado el interés por la búsqueda de compuestos naturales en actinobacterias “raras” como *Nocardia* para producir compuestos novedosos.

El género *Actinomadura* es menos frecuente en reportes de actinomicetoma, la especie *A. madurae* es la más reportada en estos casos, sin embargo, aquí se identificaron las especies *A. nitritigenes* y *A. geliboluensis*. Las cinco cepas de *Actinomadura* tuvieron presencia de sistemas biosintéticos.

*Streptomyces* fue menos frecuente, con la identificación de 3 cepas, la única especie identificada en este estudio fue *S. albus*. Este género es el mayor productor de compuestos naturales, por lo que ha sido explotado en la industria farmacológica; sin embargo, ahora se sabe que algunas especies codifican a más de 20 clusters biosintéticos, pero muchos de estos clusters son silenciosos. Este género sigue siendo el modelo para la búsqueda de alternativas terapéuticas.

*Rhodococcus* fue identificado en una cepa, la especie fue *R. rhodochrous*. Su descripción macroscópica fue similar a las nocardias, de formas irregulares color naranja, pero su morfología microscópica es de forma cocobacilar. *Rhodococcus* no es un agente causal común de infecciones en humanos, sin embargo, hay mayores reportes en animales como los causados por *R. equi* en equinos. Este género tiene gran capacidad para degradar una amplia gama de compuestos orgánicos, además de su capacidad de crecer bajo condiciones de estrés como ambientes con alta concentración de metales, pH alto y desecación; por ello, tiene gran potencial para producir

compuestos de relevancia ambiental e industrial, produciendo biosurfactantes, biofloculantes, carotenoides, entre otros.

Con la prueba de actividad antimicrobiana pudimos demostrar que 15 cepas de estudio son capaces de combatir cepas multirresistentes.

Las investigaciones recientes están demostrando el desarrollo de fármacos novedosos a partir de metabolitos secundarios bacterianos y la búsqueda de ellos puede realizarse en actinobacterias poco conocidas de aislamientos clínicos.

## 10. BIBLIOGRAFÍA

1. Salam N, Jiao JY, Zhang XT, Li WJ. Update on the classification of higher ranks in the phylum *Actinobacteria*. International journal of systematic and evolutionary microbiology. 2020;70(2):1331–1355.
2. Girard G, Traag BA, Sangal V, Mascini N, Hoskisson PA, Goodfellow M, van Wezel GP. A novel taxonomic marker that discriminates between morphologically complex actinomycetes. Open biology. 2013; 3(10):130073.
3. Lechevalier HA, Lechevalier MP. Classification des actinomycètes aérobies basée sur leur morphologie et leur composition chimique. Ann Inst Pasteur. 1965; 108:662–673.
4. Barka EA, Vatsa P, Sanchez L, Gaveau-Vaillant N, Jacquard C, Meier-Kolthoff JP, Klenk HP, Clément C, Ouhdouch Y, van Wezel GP. Taxonomy, Physiology, and Natural Products of Actinobacteria. Microbiol Mol Biol Rev. 2015;25;80(1):1-43.
5. Rahlwes KC, Sparks IL, Morita YS. Cell Walls and Membranes of *Actinobacteria*. Sub-cellular biochemistry. 2019; 92:417–469.
6. Serrano JA, Sandoval AH y Beaman BL. Actinomicetoma. México: Editorial Plaza y Valdés, S.A., 2007;123-147.
7. Lechevalier MP, De Bievre C, Lechevalier HA. Chemotaxonomy of aerobic actinomycetes: phospholipid composition. Biochem Syst Ecol. 1977;5:249–260
8. Mehta HH, Shamo Y. Pathogenic Nocardia: A diverse genus of emerging pathogens or just poorly recognized?. PLoS pathogens. 2020;16(3);e1008280.
9. Abreu C, Rocha-Pereira N, Sarmiento A, Magro F. *Nocardia* infections among immunomodulated inflammatory bowel disease patients: a review. World J Gastroenterol. 2015;21:6491–6498.
10. Emery D, Denning DW. The global distribution of actinomycetoma and eumycetoma. PLoS neglected tropical diseases. 2020;14(9): e0008397
11. Steinbrink J, Leavens J, Kauffman CA, Miceli MH. Manifestations and outcomes of nocardia infections: Comparison of immunocompromised and nonimmunocompromised adult patients. Medicine. 2018;97(40): e12436.
12. Bell M, McNeil MM, and Brown JM. *Nocardia* species (Nocardiosis). Consultado el 31 de julio del 2021. Disponible en <http://www.antimicrobe.org/b117.asp>.

13. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Consultado el 31 de julio de 2021. Disponible en: <https://www.cdc.gov/>
14. Vera-Cabrera L, Ortiz-Lopez R, Elizondo-Gonzalez R, Ocampo-Candiani J. Complete genome sequence analysis of *Nocardia brasiliensis* HUJEG-1 reveals a saprobic lifestyle and the genes needed for human pathogenesis. *PLoS One*. 2013;8(6): e65425
15. Tobias NJ, Eberhard FE, Guarneri AA. Enzymatic biosynthesis of B-complex vitamins is supplied by diverse microbiota in the *Rhodnius prolixus* anterior midgut following *Trypanosoma cruzi* infection. *Computational and structural biotechnology journal*. 2020;18: 3395–3401.
16. Vázquez-Boland JA, Meijer WG. The pathogenic actinobacterium *Rhodococcus equi*: what's in a name?. *Molecular microbiology*. 2019;112(1): 1–15.
17. Dhandapani P, Song J, Novak O, Jameson PE. Infection by *Rhodococcus fascians* maintains cotyledons as a sink tissue for the pathogen. *Annals of botany*. 2017;119(5): 841–852.
18. Cappelletti M, Presentato A, Piacenza E, Firrincieli A, Turner RJ, Zannoni D. Biotechnology of *Rhodococcus* for the production of valuable compounds. *Applied microbiology and biotechnology*. 2020;104(20): 8567–8594.
19. Komaki H, Sakurai K, Hosoyama A, Kimura A, Igarashi Y, Tamura T. Diversity of nonribosomal peptide synthetase and polyketide synthase gene clusters among taxonomically close *Streptomyces* strains. *Scientific reports*. 2018; 8(1): 6888.
20. Quinn GA, Banat AM, Abdelhameed AM, Banat IM. *Streptomyces* from traditional medicine: sources of new innovations in antibiotic discovery. *Journal of medical microbiology*. 2020;69(8): 1040–1048.
21. Bentley SD, Chater KF, Cerdeno-Tarraga AM, Challis GL, Thomson NR, James KD, Harris DE, Quail MA, Kieser H, Harper D, Bateman A, Brown S, Chandra G, Chen CW, Collins M, Cronin A, Fraser A, Goble A, Hidalgo J, Hornsby T, Howarth S, Huang CH, Kieser T, Larke L, Murphy L, Oliver K, O'Neil S, Rabbinowitsch E, Rajandream MA, Rutherford K, Rutter S, Seeger K, Saunders D, Sharp S, Squares R, Squares S, Taylor K, Warren T, Wietzorrek A, Woodward J, Barrell BG, Parkhill

- J, Hopwood DA. Complete genome sequence of the model actinomycete *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Nature*. 2002;417: 141–147.
22. Pawlik K, Kotowska M, Chater KF, Kuczek K, Takano E. A cryptic type I polyketide synthase (cpk) gene cluster in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Arch Microbiol*. 2007; 187:87–99.
23. Zerikly M, Challis GL. Strategies for the discovery of new natural products by genome mining. *Chembiochem*. 2009; 10:625–633.
24. Kapadia M, Rolston KV, Han XY. Invasive *Streptomyces* infections: six cases and literature review. *Am J Clin Pathol*. 2007;127: 619–624.
25. Bessis S, Noussair L, Rodriguez-Nava V, Jousset C, Duran C, Beresteanu A, Matt M, Davido B, Carlier R, Bergeron E, Fournier PE, Herrmann JL, Dinh A. Actinomycetoma caused by *Actinomadura mexicana*, a neglected entity in the caribbean. *Emerging infectious diseases*. 2020; 26(2): 379–380.
26. Cardenas-de la Garza JA, Welsh O, Cuellar-Barboza A, Suarez-Sanchez KP, Cruz-Gomez LG, De la Cruz-Valadez E, Ocampo-Candiani J, Vera-Cabrera L. Climate, soil type, and geographic distribution of actinomycetoma cases in northeast Mexico: a cross-sectional study. *PloS one*. 2020;15(5): e0232556.
27. Komaki H, Harunari E, Ichikawa N, Hosoyama A, Hamada M, Duangmal K, Thamchaipenet A, Igarashi Y. Draft genome sequence of *Actinomadura* sp. K4S16 and elucidation of the nonthmicin biosynthetic pathway. *Journal of genomics*. 2020;8: 53–61.
28. Shin B, Kim B, Cho E, Oh K, Shin J, Goodfellow M. *et al.* Actinomadurol, an antibacterial norditerpenoid from a rare actinomycete, *Actinomadura* sp. KC 191. *J Nat Prod*. 2016;79(7):1886–1890.
29. Madigan M, Martinko J, Bender K, Buckley D, Stahl D. Brock. *Biología de los organismos*, Pearson Educación S.A., 14<sup>a</sup> ed., España, 2015; 649-673.
30. Land M, Hauser L, Jun R, Nookaew I, Leuze MR, Ahn TH, Karpinets T, Lund O, Kora G, Wassenaar T, Poudel S, Ussery DW. Insights from 20 years of bacterial genome sequencing, *Funct Integr Genomics*. 2015;15:141–161.

31. Aguilar-Bultet, L, Falquet L. Secuenciación y ensamblaje de novo de genomas bacterianos: una alternativa para el estudio de nuevos patógenos. *Revista de salud animal*. 2015; 37(2):125-132.
32. Dehal PS, Joachimiak MP, Price MN, Bates JT, Baumohl JK, Chivian D, *et al.* MicrobesOnline: an integrated portal for comparative and functional genomics. *Nucleic acids research*. 2010; 38: D396-D400.
33. Oliynyk M, Samborskyy M, Lester JB, Mironenko T, Scott N, Dickens S, Haydock SF, Leadlay PF. Complete genome sequence of the erythromycin-producing bacterium *Saccharopolyspora erythraea*. *Nat Biotechnol*. 2007; 25:447-453.
34. Lü J, Long Q, Zhao Z, Chen L, He W, Hong J, Liu K, Wang Y, Pang X, Deng Z, Tao M. Engineering the erythromycin-producing strain *Saccharopolyspora erythraea* HOE107 for the heterologous production of polyketide antibiotics. *frontiers in microbiology*. 2020;11: 593217.
35. Udvary DW, Zeigler I, Asolkar RN, Singan V, Lapidus A, Fenical W, Jensen PR, y Moore BS. Genome sequence reveals complex secondary metabolome in the marine actinomycete *Salinispora tropica*. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2007; 104(25):10376-10381.
36. Jezkova Z, Binda E, Potocar T, Marinelli F, Halecky M, Branyik T. Laboratory scale cultivation of *Salinispora tropica* in shake flasks and mechanically stirred bioreactors. *Biotechnology letters*. 2021;1-8.
37. McLeod MP, Warren R, HsiaoWWL, Araki N, Myhre M, Fernandes C, Miyazawa D, Wong W, Lillquist AL, Wang D. The complete genome of *Rhodococcus sp.* RHA1 provides insights into a catabolic powerhouse. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2006; 103(42): 15582-15587
38. Kim D, Choi KY, Yoo M, Zylstra GJ, Kim E. Biotechnological potential of *Rhodococcus* biodegradative pathways. *Journal of microbiology and biotechnology*. 2018; 28(7), 1037–1051.
39. Baranasic D, Gacesa R, Starcevic A. *et al.* Draft genome sequence of *Streptomyces rapamycinicus* strain NRRL 5491, the producer of the immunosuppressant rapamycin. *Genome Announc*. 2013; 1(4):e00581–13.

40. Amoutzias GD, Van de Peer Y, Mossialos D. Evolution and taxonomic distribution of nonribosomal peptide and poliketide synthases. *Future Microbiol.* 2008; 3(3): 361-370.
41. Steiniger C, Hoffmann S, Süssmuth RD. Probing exchange units for combining iterative and linear fungal nonribosomal peptide synthetases. *Cell chemical biology.* 2019; 26(11): 1526–1534.e2.
42. Nikolouli K, Mossialos D. Bioactive compounds synthesized by non-ribosomal synthetases and type-I polyketide synthases discovered through genome-mining and metagenomics. *Biotechnol Lett.* 2012; 34:1393-1403.
43. Hur G, Vichery C y Burkart M. Explorations of catalytic domains in non-ribosomal peptide synthetase enzymology. *Nat Prod Rep.* 2012; 29:1074-1098.
44. Liras P. Holomycin, a dithiolopyrrolone compound produced by *Streptomyces clavuligerus*. *Applied microbiology and biotechnology.* 2014; 98(3): 1023–1030.
45. Kim H, Kim S, Kim M, Lee C, Yang I, Nam SJ. Bioactive natural products from the genus *Salinospora*: a review. *Archives of pharmacal research.* 2020; 43(12): 1230–1258.
46. Crnovčić I, Lang M, Ortel I, Süssmuth RD, Keller U. Comparison of actinomycin peptide synthetase formation in *Streptomyces chrysomallus* and *Streptomyces antibioticus*. *Journal of basic microbiology.* 2019; 59(2): 148–157.
47. Yang HJ, Huang XZ, Zhang ZL, Wang CX, Zhou J, Huang K, Zhou JM, Zheng W. Two novel amphomycin analogues from *Streptomyces canus* strain FIM-0916. *Natural product research.* 2014; 28(12):861–867.
48. Karas JA, Carter GP, Howden BP, Turner AM, Paulin O, Swarbrick JD, Baker MA, Li J, Velkov T. Structure-activity relationships of daptomycin lipopeptides. *Journal of medicinal chemistry.* 2020; 63(22): 13266–13290.
49. Gulder TAM, Freeman MF, Piel J. The Catalytic Diversity of Multimodular Polyketide Synthases: Natural Product Biosynthesis Beyond. *Textbook Assembly Rules.* Berlin/Heidelberg:Springer. 2011;1-53.
50. Schwarzer D, Marahiel MA. Multimodular biocatalysts for natural product assembly. *Naturwissenschaften.* 2001; 88:93-101.

51. Hertwech C. Decoding and reprogramming complex poliketide assembly lines: Prospects for synthetic biology. *Trends Biochem Sci.* 2015; 40(4): 189-199.
52. Helfrich EJ, Piel J. Biosynthesis of poliketides by trans-AT poliketide synthases. *Nat Prod Rep.* 2016; 33:231-316.
53. Huang K, Zhang B, Shen ZY, Cai X, Liu ZQ, Zheng YG. Enhanced amphotericin B production by genetically engineered *Streptomyces nodosus*. *Microbiological research.* 2021; 242: 126623.
54. Deng Q, Xiao L, Liu Y, Zhang L, Deng Z, Zhao C. *Streptomyces avermitilis* industrial strain as cell factory for Ivermectin B1a production. *Synthetic and systems biotechnology.* 2018;4(1): 34–39.
55. Risdian C, Mozef T, Wink J. Biosynthesis of polyketides in *Streptomyces*. *Microorganisms.* 2019; 7(5): 124.
56. Zhang W, Ames BD, Tsai S, Tang Y. Engineered biosynthesis of a novel amidated poliketide, using the malonamyl-specific initiation module from the oxytetracycline poliketide synthase. *Appl Environ Microbiol.* 2006; 72(4):2573-2580.
57. Xu F, Napan K, Zhang S, Gladwin T, Takemoto J, Zhan J. New insights into pradimicin biosynthesis revealed by two O-methyltransferases. *Bioorganic & medicinal chemistry letters.* 2017; 27(15): 3499–3502.
58. Lu H, Yang M, Liu C, Lu P, Cang H, Ma L. Protein preparation, crystallization and preliminary X-ray analysis of *Polygonum cuspidatum* bifunctional chalcone synthase/benzalacetone synthase. *Structural biology and crystallization communications.* 2013; 69(8): 871–875.
59. Resmi MS, Soniya EV. Molecular cloning and differential expressions of two cDNA encoding type III polyketide synthase in different tissues of *Curcuma longa* L. *Gene.* 2012; 491(2): 278–283.
60. Silakowski B, Schairer HU, Ehret H, Kunze B, Weinig S, Nordsiek G. *et al.* New lessons for combinatorial biosynthesis from myxobacteria. *Journal of Biological Chemistry.* 1999; 274(52), 37391–37399.
61. Robertsen HL, Musiol-Kroll EM, Ding L, Laiple KJ, Hofeditz T, Wohlleben W, Lee SY, Grond S, Weber T. Filling the gaps in the kirromycin biosynthesis: deciphering

- the role of genes involved in ethylmalonyl-coa supply and tailoring reactions. *Scientific reports*. 2018; 8(1): 3230.
62. Mrak P, Krastel P, Pivk Lukančič P, Tao J, Pistorius D, Moore CM. Discovery of the actinoplanic acid pathway in *Streptomyces rapamycinicus* reveals a genetically conserved synergism with rapamycin. *The Journal of biological chemistry*. 2018; 293(52): 19982–19995.
63. Pulsawat N, Kitani S, Nihira T. Characterization of biosynthetic gene cluster for the production of virginiamycin M, a streptogramin type A antibiotic, in *Streptomyces virginiae*. *Gene*. 2007; 393(1-2):31-42.
64. Silakowski B, Schairer UH, Ehret H, Kunze B, Weining S, Nordsiek G, Brandt P, Blöcker H, H'fle G, Beyer S, Müller R. New lesson for combinatorial biosynthesis from myxobacteria: the myxothiazol biosynthetic gene cluster of *Stigmatella aurantica DW4/3-1*. *J Biol Chem*. 1999; 274:37391-37399.
65. Dzhavakhiya V, Savushkin V, Ovchinnikov A, Glagolev V, Savelyeva V, Popova E, Novak N, Glagoleva E. Scaling up a virginiamycin production by a high-yield *Streptomyces virginiae* VKM Ac-2738D strain using adsorbing resin addition and fed-batch fermentation under controlled conditions. *3 Biotech*. 2016; 6(2): 240.
66. Piel J, Hui D, Wen G, Butzke D, Platzer M, Fusetani N, Matsunaga S. Antitumor poliketide biosynthesis by an uncultivated bacterial symbiont of the marine sponge *Theonella swinhoei*. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2004; 101(46):16222-16227.
67. Grindberg RV, Ishoey T, Brinza D, Esquenazi E, Coates RC, Liu WT, Gerwick L, Dorrestein PC, Pevzner P, Lasken R, Gerwick WH. Single cell genome amplification accelerates identification of the apratoxin biosynthetic pathway from a complex microbial assemblage. *PLoS ONE*. 2011; 6(4):e18565.
68. Passari AK, Mishra VK, Singh G, Singh P, Kumar B, Gupta VK, Sarma RK, Saikia R, Donovan AO, Singh BP. Insights into the functionality of endophytic actinobacteria with a focus on their biosynthetic potential and secondary metabolites production. *Scientific reports*. 2017; 7(1): 11809.
69. Luo S, Sun D, Zhu J, Chen Z, Wen Y, Li J. An extracytoplasmic function sigma factor,  $\sigma(25)$ , differentially regulates avermectin and oligomycin biosynthesis in

- Streptomyces avermitilis*. Applied microbiology and biotechnology. 2014; 98(16): 7097–7112.
70. Jenke-Kodama H, Börner T, Dittman E. Natural biocombinatorics in the poliketide synthase genes of the actinobacterium *Streptomyces avermitilis*. PLoS Comp Biol. 2006; 2(10):e132.
71. Penn J, Whiting A, Wrigley SW, Latif M, Gibson T, Silva CJ, Li X, Miao V, Brian P, Baltz RH. Heterologous production of datomycin in *Streptomyces lividans*. J Indust Microbiol Biotechnol. 2006; 33:121-128.
72. Miao V, Coëffet-LeGal MF, Nguyen K, Brian J, Penn J, Whiting A, Steele J, Kau D, Martin S, Ford R, *et al.* Genetic engineering in *Streptomyces roseosporus* to produce hybrid lipopeptide antibiotics. Chem Biol. 2006; 13(3):269-276.
73. Neumann CS, Fujimori DG y Walsh CT. Halogenation strategies in natural product biosynthesis. Chem Biol. 2008; 15:99-109.
74. Hamedi J, Imanparst S, Mohammadipanah F. Molecular; chemical and biological screening of soil actinomycete isolates in seeking bioactive peptide metabolites. Irian Journal of Microbiology. 2015; 7(1):23-30.
75. Trendowski M. Recent advances in the development of antineoplastic agents derived from natural products. Drugs. 2015; 75(17), 1993–2016.
76. OMS. Consultado el 11 de septiembre del 2020. Disponible en:<http://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/resistencia-a-los-antimicrobianos>
77. Badii MH, Abreu JL. Control biológico una forma sustentable de control de plagas. International Journal of Good Conscience. 2006; 1(1): 82-83.
78. Zaragoza-Bastida A, Karam-Calderón MÁ, Bustamante-Montes LP, Sandoval-Trujillo ÁH, Ramírez-Durán N. Marcador molecular de actinomicetos utilizado para detectar micobacterias en muestras de esputo. Revista mexicana de ciencias farmacéuticas. 2014; 45(1):35-40.
79. González I, Ayuso-Sacido A, Anderson A, Genilloud O. Actinomycetes isolated from lichens: evaluation of their diversity and detection of biosynthetic gene sequences. FEMS Microbiol. Ecol. 2005; 54:401–415.

80. Ayuso A, Clark D, González I, *et al.* A novel actinomycete strain de-replication approach based on the diversity of polyketide synthase and nonribosomal peptide synthetase biosynthetic pathways. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2005; 67: 795.
81. Amos GC, Borsetto C, askaris P, Krsek M, Berry AE, Newsham KK, Wellington EM. Designing and implementing an assay for the detection of rare and divergent NRPS and PKS clones in European, Antarctic and Cuban soils. *PloS One.* 2015;10(9).
82. Church DL, Cerutti L, Gürtler A, Griener T, Zelazny A, Emler S. Performance and application of 16s rRNA gene cycle sequencing for routine identification of bacteria in the clinical microbiology laboratory. *Clinical microbiology reviews.* 2020; 33(4), e00053-19.
83. Hall T, Biosciences I, Carlsbad C. BioEdit: an important software for molecular biology. *GERF Bull Biosci.* 2011; 2(1): 60-61.
84. Benson DA, Cavanaugh M, Clark K, Karsch-Mizrachi I, Lipman DJ, Ostell J, Sayers EW. GenBank. *Nucleic acids research.* 2013; 41:D36–D42.
85. Yoon SH, Ha SM, Kwon S, Lim J, Kim Y, Seo H, Chun J. Introducing EzBioCloud: A taxonomically united database of 16S rRNA and whole genome assemblies. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2017; 67:1613-1617.
86. Kumar S, Nei M, Dudley J, Tamura K. MEGA: a biologist-centric software for evolutionary analysis of DNA and protein sequences. *Brief Bioinform.* 2008; 9:299-306.
87. Fritz S, Rajaonison A, Chabrol O, Raoult D, Rolain JM, Merhej V. Full-length title: NRPPUR database search and in vitro analysis identify an NRPS-PKS biosynthetic gene cluster with a potential antibiotic effect. *BMC bioinformatics.* 2018; 19(1):1-10.
88. Ley general de salud en materia de investigaciones. 2014 Consultado el 23 de agosto del 2021. [http://www.diputados.gob.mx/LeyesBiblio/regley/Reg\\_LGS\\_MIS.pdf](http://www.diputados.gob.mx/LeyesBiblio/regley/Reg_LGS_MIS.pdf)
89. NOM-087-ECOL-SSA1-2002. 2002. Consultado el 23 de agosto del 2021 <http://www.salud.gob.mx/unidades/cdi/nom/087ecolssa.html>

90. NOM-065-SSA1-1993. Consultado el 23 de agosto del 2021.  
[http://dof.gob.mx/nota\\_detalle.php?codigo=4869946&fecha=27/02/1995](http://dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=4869946&fecha=27/02/1995)

91. Who, 2005. Consultado el 23 de agosto del 2021.  
[https://www.who.int/topics/medical\\_waste/manual\\_bioseguiridad\\_laboratorio.pdf](https://www.who.int/topics/medical_waste/manual_bioseguiridad_laboratorio.pdf)