



---

---

Universidad Autónoma del Estado de México.

Facultad de Medicina.

Departamento de Estudios Avanzados.

Maestría en Ciencias de la Salud.

**“Identificación y caracterización de los sistemas PKS y NRPS en cepas de actinobacterias halófilas y halotolerantes con actividad antimicrobiana.”**

## **TESIS**

Que para obtener el grado de  
Maestro en Ciencias de la Salud.

Presenta:

Biól. Alex Josué López Ordoñez.

Comité de Tutores

Directora: Dra. Ninfa Ramírez Durán

Co-director: Dr. Martín Pablo Antonio Moreno Pérez

Asesor: Dr. Ramón Alberto Batista García.

Toluca, Estado de México.

2022.

Yo **Alex Josué López Ordoñez** autor responsable de la presente Tesis, la cual lleva como título “**Identificación y caracterización de los sistemas PKS y NRPS en cepas de actinobacterias halófilas y halotolerantes con actividad antimicrobiana**” y en representación de los coautores:

- Dra. Ninfa Ramírez Durán
- Dr. Martín Pablo Antonio Moreno Pérez
- Dr. Ramón Alberto Batista García.

Declaro que la información presentada en este documento es resultado de un protocolo de investigación del cual soy representante y por tanto me responsabilizo legalmente por el contenido en caso de plagio, deslindando de toda responsabilidad a la Universidad Autónoma del Estado de México.

La presente tesis se realizó bajo la dirección de la Dra. Ninfa Ramírez Duran en las instalaciones del Laboratorio de investigación en Microbiología Medica y Ambiental en la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma del Estado de México



## ÍNDICE.

Resumen.....	8
Summary.....	9
1. Introducción.....	10
1.1. Actinobacterias.....	10
1.2. Microorganismos extremófilos.....	10
1.2.1. Actinobacterias halófilas y halotolerantes.....	11
1.3. Metabolismo de las actinobacterias.....	11
1.4. Compuestos derivados de actinobacterias halófilas y halotolerantes.....	12
1.5. Grupos de genes biosintéticos.....	14
1.5.1. Grupo de genes biosintéticos policétido sintasa (PKS).....	14
1.5.2. Grupo de genes biosintéticos sintetasa de péptido no ribosomal (NRPS).....	15
1.5.3. Estudios previos de la presencia de sistemas biosintéticos PKS y NRPS y producción de moléculas bioactivas en actinobacterias halófilas y halotolerantes.....	16
1.6. Bacterias multirresistentes a antibióticos.....	19
1.6.1. Mecanismos de multirresistencia a antibióticos.....	20
1.6.2. Bacterias multirresistentes “ESKAPE”.....	20
1.6.2.1. <i>Enterococcus faecium</i> .....	21
1.6.2.2. <i>Staphylococcus aureus</i> .....	21
1.6.2.3. <i>Klebsiella pneumoniae</i> .....	22
1.6.2.4. <i>Acinetobacter baumannii</i> .....	22
1.6.2.5. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	23
1.6.2.6. <i>Enterobacter</i> sp.....	23
2. Planteamiento del problema.....	24
2.1. Pregunta de investigación.....	25
3. Hipótesis.....	25
4. Objetivos.....	25
5. Justificación.....	26
6. Materiales y Métodos.....	27

6.1.	Diseño de estudio.....	27
6.2.	Criterios de inclusión, exclusión y eliminación.....	27
6.3.	Procedimientos.....	27
6.3.1.	Zona del estudio.....	27
6.3.2.	Recolección de muestras.....	29
6.3.2.1.	Procesamiento de las muestras.....	29
6.3.3.	Caracterización fisicoquímica de las muestras.....	29
6.3.4.	Aislamiento de cepas de bacterias halófilas y halotolerantes.....	29
6.3.5.	Caracterización fisiológica de las bacterias halófilas y halotolerantes.....	30
6.3.6.	Obtención de biomasa.....	31
6.3.7.	Extracción de ADN.....	31
6.3.8.	Análisis para la detección de genes PKS y NRPS.....	32
6.3.9.	Determinación de la actividad antimicrobiana de las bacterias halófilas y halotolerantes contra las cepas patógenas.....	33
6.3.10.	Amplificación del gen ARNr 16S.....	33
6.3.11.	Identificación de especies.....	34
6.4.	Variables de estudio.....	34
6.5.	Implicaciones bioéticas.....	35
7.	Resultados .....	36
7.1.	Carta de envío.....	36
7.2.	Resumen del artículo.....	37
8.	Discusión .....	37
9.	Conclusión.....	41
10.	Referencias bibliográficas .....	42

## Resumen

La obtención de moléculas bioactivas resulta importante en áreas diversas de las ciencias biológicas, químicas y médicas, debido los usos y aplicaciones que pueden llegar a tener. Estas moléculas son sintetizadas mediante diversas rutas metabólicas por parte de microorganismos como las actinobacterias, estas han ganado atención por la gran cantidad de compuestos naturales que se obtienen de estas, destacando moléculas que son implementadas para el desarrollo de nuevos antibióticos y el mejoramiento de los ya existentes.

El potencial biosintético de las actinobacterias y de otros microorganismos se debe principalmente a la presencia de sistemas biosintéticos enzimáticos multimodulares conocidos como sistema policétido sintasa (PKS) y sistema de péptido no ribosómico sintetasa (NRPS). Con el objetivo de detectar la presencia y distribución de estos sistemas enzimáticos antes mencionados, se utilizaron cebadores específicos para detectar los genes que codifican a las enzimas de los sistemas PKS y NRPS en cepas de bacterias halófilas y halotolerantes, que ayudaran en la predicción para la síntesis de moléculas nuevas. Para ello se aislaron en medios MH y BHI suplementados con NaCl al 5%. Se obtuvieron cepas de bacterias, bacterias halófilas y halotolerantes aisladas de muestras ambientales recolectadas de la región salina "Laguna Salada, en la región norte del estado de Baja California.

Las bacterias fueron caracterizadas morfológica y fisiológicamente, determinando su rango de crecimiento y crecimiento óptimo en diferentes porcentajes de NaCl, pH y temperatura. Se determinó la presencia de los sistemas biosintéticos PKS-I y NRPS-I, implementando cebadores degenerados mediante ensayos de PCR. Las cepas con que presentaron sistemas biosintéticos se identificaron a nivel especie, mediante la secuenciación del gen ARNr 16S, las secuencias consenso obtenidas por los programas ChromasPro 1.5 y BioEdit 7.1.9 se compararon con las depositadas en las bases de datos mediante el programa informático BLAST y EZbiocloud.

Resultados: Se aislaron un total de 114 cepas totales, 16 perteneciente al grupo de las actinobacterias y 98 al grupo de las eubacterias, caracterizadas por su morfología macroscópica y microscópica, se caracterizaron fisiológicamente de acuerdo con su crecimiento óptimo en diferentes concentraciones de NaCl, pH y temperatura. Se realizó la detección de los sistemas biosintéticos PKS-I y NRPS-I en 9 cepas de actinobacterias y 20 eubacterias. Las cepas aisladas no mostraron actividad antagonica contra las cepas multirresistentes. La ecología microbiana se vio reflejada en la identificación de 6 géneros de bacterias *Bacillus*, *Citricoccus*, *Nocardiosis*, *Oceanobacillus*, *Salinicoccus* y *Salirhabdus*.

## SUMMARY

Obtaining bioactive molecules is important in diverse areas of biological, chemical and medical sciences, due to the uses and applications they can have. These molecules are synthesized through diverse metabolic routes by microorganisms such as actinobacteria, which have gained attention due to the large number of natural compounds obtained from them, highlighting molecules that are implemented for the development of new antibiotics and the improvement of existing ones.

The biosynthetic potential of actinobacteria and other mycobacteria is mainly due to the presence of multimodular enzymatic biosynthetic systems known as polyketide synthase system (PKS) and non-ribosomal peptide synthetase system (NRPS). To detect the presence and distribution of these aforementioned enzyme systems, specific primers were used to detect the genes encoding the enzymes of the PKS and NRPS systems in halophilic and halotolerant bacterial strains, which would help in the prediction for the synthesis of novel molecules. For this purpose, they were isolated on MH and BHI media supplemented with 5% NaCl. Bacterial strains, halophilic and halotolerant bacteria isolated from environmental samples collected from the saline region "Laguna Salada, in the northern region of the state of Baja California, were obtained.

The bacteria were characterized morphologically and physiologically, determining their growth range and optimum growth in different percentages of NaCl, pH and temperature. The presence of the PKS-I and NRPS-I biosynthetic systems was determined by implementing degenerate primers using PCR assays. The strains presenting biosynthetic systems were identified to species level by sequencing the 16S rRNA gene, the consensus sequences obtained by ChromasPro 1.5 and BioEdit 7.1.9 programs were compared with those deposited in the databases by BLAST and EZbiocloud software.

Results: A total of 114 total strains were isolated, 16 belonging to the group of actinobacteria and 98 to the group of eubacteria, characterized by their macroscopic and microscopic morphology, physiologically characterized according to their optimal growth in different concentrations of NaCl, pH and temperature. The detection of PKS-I and NRPS-I biosynthetic systems was performed in 9 actinobacterial and 20 eubacterial strains. The isolated strains did not show antagonistic activity against the multidrug-resistant strains. The microbial ecology was reflected in the identification of 6 bacterial genera *Bacillus*, *Citricoccus*, *Nocardiopsis*, *Oceanobacillus*, *Salinicoccus* and *Salirhabdus*.

## 1. Introducción.

### 1.1. Actinobacterias.

Las actinobacterias pertenecen uno de los linajes taxonómicos más extensos de las bacterias, el cual está compuesto por 5 subclases, 6 órdenes y 14 subórdenes [1]. Son organismos de vida libre y se distribuyen ampliamente en diferentes ecosistemas tienen un papel importante en el reciclaje de materia orgánica, degradación de compuestos recalcitrantes y químicos [1]. El filo Actinobacteria se estableció en 1917 y se conforma exclusivamente de bacterias Gram positivas, que presentan diferencias morfológicas en diferentes etapas de su ciclo de vida, presentando micelio vegetativo con hifas ramificadas, micelio aéreo con filamentos más delgados al de los hongos y formación de esporas [2]. A nivel genómico, aproximadamente el 55% de su contenido está formado por guanina-citocina y la mayoría de estas actinobacterias son aerobias y quimiheterótrofas, capaces de usar una gran variedad de fuentes nutricionales. Algunas especies de los géneros *Micromonospora*, *Rhodococcus*, *Salinispora* y *Streptomyces* pueden habitar ambientes acuáticos, pero principalmente se localizan en suelos,

Las actinobacterias son uno de los grupos de bacterias con más especies descritas, debido a que presentan múltiples propiedades metabólicas y fisiológicas particulares, siendo capaces de sintetizar una amplia variedad de metabolitos secundarios como enzimas extracelulares y moléculas bioactivas, haciéndolos blanco de interés para la búsqueda de compuestos con diferentes aplicaciones biotecnológicas, como la industria química, alimenticia, farmacéutica, agrícola, médica, entre otras [4, 5].

### 1.2. Microorganismos extremófilos

El término extremófilos se empleó por primera vez en 1974, los extremófilos son organismos capaces de crecer y desarrollarse únicamente en ambiente extremos que pueden ser inhóspitas para una gran mayoría de organismos, aunque la definición de un ambiente extremo es relativa, ya que los ambientes que pueden ser extremos para ciertos microorganismos pueden ser esenciales para otros [6].

Es gracias al desarrollo de diferentes mecanismos fisiológicos y metabólicos que estos organismos logran sobrevivir en condiciones extremas y debido a estos mecanismos es que tomaron importancia en distintos estudios, ya que al sintetizar proteínas como enzimas relacionadas al desarrollo en un ambiente extremo presentan características únicas y distintas, en comparación con actinobacterias mesófilas [6].

### **1.2.1. Actinobacterias halófilas y halotolerantes.**

Las actinobacterias halófilas pertenecen al grupo de extremófilos, se caracterizan particularmente por requerir una concentración alta de cloruro de sodio (NaCl) para sobrevivir, esta condición inhibe el crecimiento de otros microorganismos. Las actinobacterias halófilas pueden encontrarse en lugares específicos alrededor del mundo, como suelos y lagos salinos, o incluso en alimentos con alta concentración de sal [6, 7].

Los microorganismos halófilos son capaces de crecer en ambientes salinos gracias al desarrollo de diferentes mecanismos por ejemplo modificaciones en la composición lipídica de la membrana celular, adaptando fosfolípidos y ácidos grasos, pero uno de los mecanismos más efectivos es el sintetizar compuestos de bajo peso molecular llamados solutos compatibles, que le ayudan a adaptarse al estrés osmótico causado por las distintas concentraciones de sales [6].

Las actinobacterias halófilas se clasifican de acuerdo con su requerimiento de sal y patrones de crecimiento en:

- Halófilos débiles: Requieren del 0.5% al 10% de NaCl para un crecimiento óptimo.
- Halófilos moderados: Requieren del 10% al 20% de NaCl para un crecimiento óptimo.
- Halófilos extremos: Requieren de más del 20% de NaCl para un crecimiento óptimo.

Las actinobacterias halotolerantes son capaces de crecer en ambientes con ausencia o presencia de sales, creciendo en concentraciones de NaCl de hasta 2.5% [6, 8].

El interés por el estudio de este grupo específico de actinobacterias se debe a las distintas aplicaciones biotecnológicas que tienen, ya que son capaces de sintetizar diferentes sustratos como biopolímeros, enzimas y solutos compatibles con propiedades biológicas únicas, además la mayoría de estas actinobacterias no presentan demasiados requerimientos nutrimentales, adicionalmente al requerir de concentraciones altas de NaCl, se reduce la posibilidad de contaminación en cultivos de laboratorio y ya que pueden utilizar diversas fuentes de carbono y energía, se facilita su crecimiento y cultivo [9].

### **1.3. Metabolismo de las actinobacterias.**

El metabolismo es la serie de reacciones químicas que se llevan a cabo dentro de la célula de forma ordenada mediante distintas rutas que se coordina por distintos complejos multi-enzimáticos, sintetizando compuestos y transformándolos para

crear nuevos productos que se le conocen como metabolitos [10, 11]. El metabolismo se divide en 2 tipos:

1. Anabolismo o biosíntesis: Consiste en producir moléculas grandes, a partir de precursores pequeños como monosacáridos, aminoácidos, ácidos grasos de cadena corta o nucleótidos, mediante la actividad enzimática y el aporte de energía, generada comúnmente por la hidrólisis del adenosin trifosfato (ATP) y la oxidación de moléculas transportadoras de electrones como NADH, NADPH y FADH<sub>2</sub>.
2. Catabolismo: Es la degradación de moléculas grandes para obtener compuestos más sencillos, mediante la catálisis enzimática, obteniendo energía en forma de ATP y reduciendo a las moléculas transportadoras de electrones [11, 12].

Específicamente en procariontes, las vías del metabolismo se han dividido en metabolismo primario y secundario. El metabolismo primario presenta las rutas metabólicas que son indispensables para el crecimiento, reproducción y obtención de energía de las bacterias; derivado de estas vías se sintetizan productos conocidos como metabolitos primarios y estos se sintetizan durante la fase exponencial de crecimiento bacteriano [11, 13].

El metabolismo secundario se compone de las vías metabólicas que no son indispensables para el crecimiento o reproducción; sin embargo, estas vías metabólicas están estrechamente conectadas con las rutas metabólicas primarias mediante una red de señales reguladoras. Los metabolitos primarios funcionan como precursores de los metabolitos secundarios sintetizados en estas vías metabólicas no esenciales, estos metabolitos cumplen con otras funciones de importancia para las bacterias, como la obtención de nutrientes del medio externo o la protección contra distintos agentes fisicoquímicos como la radiación o contra otros microorganismos [4, 13].

A diferencia de los metabolitos primarios, los metabolitos secundarios son sintetizados cerca del término de la fase exponencial o durante el comienzo de la fase estacionaria de crecimiento, que es cuando se sintetizan en cantidades mayores, su expresión se modula por distintas proteínas reguladoras y en la mayoría de los casos los genes se encuentran agrupados [4, 13].

#### **1.4. Compuestos derivados de actinobacterias halófilas y halotolerantes.**

Distintos géneros de actinobacterias han sido identificadas como grandes productores de moléculas activas contra células bacterianas, siendo el género *Streptomyces* del que se han obtenido cerca del 80% de los compuestos naturales y de los 1800 productos antimicrobianos registrados en la base de datos bibliográfica de antibióticos (ABL), el 45.6% son producidos por este mismo género

[14]. Otros géneros de actinobacterias han destacado para la síntesis de moléculas activas, como *Micromonospora*, *Saccharopolyspora*, *Nocardia*, *Streptosporangium*, son ejemplo de ello [15].

Actualmente se ha reflejado la necesidad de hallar y desarrollar antibióticos molecularmente distintos a los existentes ya que desde la introducción de los antibióticos de tipo oxazolidionas en el año 2000, no se han presentado alguna clase nueva de antibiótico; contrario a esto, muchas compañías farmacéuticas han obtenido derivados sintéticos a partir de antibióticos que ya se conocían empleando los mismos mecanismos de acción [16, 17]. En este sentido, uno de los problemas en el desarrollo de nuevos antibióticos, es el re-aislamiento de compuestos antes conocidos, por lo que se proponen estrategias como nuevas técnicas de bioprospección, que consisten en la diferenciación dentro de una solución de los compuestos conocidos de los no conocidos. También se considera buscar y aislar compuestos de microorganismos de ecosistemas menos explorados y explotados, tomando en cuenta a esta última estrategia a ambientes extremos como los de altas concentraciones de sal, menos explorados en comparación a los ambientes terrestres [18].

Particularmente, las actinobacterias halófilas están tomando importancia por aspectos como la diversidad taxonómica y ecológica, pero más sustancialmente por la capacidad de producir numerosos compuestos aun no descubiertos, como antimicrobianos, antitumorales, inmunoestimuladores, pigmentos enzimas e inhibidores enzimáticos [19], han sido capaces de generar una gran variabilidad genómica y metabólica, gracias a que han desarrollado distintos mecanismos de adaptación para sobrevivir en un medio salino. En presencia de una gran cantidad de solutos en el medio extracelular, las actinobacterias halófilas y halotolerantes pueden inducir la expresión de ciertos genes que codifiquen en la producción de proteínas de choque térmico y enzimas participes en el metabolismo de lípidos y carbohidratos que conjuntamente son parte del mecanismo de adaptación conocido como solutos compatibles, que actúan protegiendo a las macromoléculas biológicas ante todo tipo de estrés ambiental, estabilizan proteínas, organelos, membranas celulares y aumentan la osmolaridad intracelular [20, 21].

Los solutos compatibles pueden ser distintas moléculas como aminoácidos, péptidos, carbohidratos, polioles, entre otros, que además de tener una acción protectora, pueden tener otras funciones, dentro siendo la actividad antimicrobiana una de ellas, considerando a los solutos compatibles, policétidos y péptidos no ribosomales, como moléculas activas con actividad antimicrobiana útiles contra bacterias patógenas [22].

## **1.5. Grupos de genes biosintéticos.**

Los genes biosintéticos están presentes en el genoma de distintos microorganismos, se encuentran en agrupaciones de 2 o más genes dentro del genoma bacteriano; muchas de estas agrupaciones pueden codificar enzimas que participan en la producción de algún metabolito secundario. Los grupos de genes biosintéticos implicados en la síntesis de moléculas bioactivas son los sistemas policétido sintasa (PKS) y el sistema sintetasa de péptido no ribosómico (NRPS). La presencia de estos genes en actinobacterias confiere la capacidad de sintetizar metabolitos secundarios [22, 23].

### **1.5.1. Grupo de genes biosintéticos policétido sintasa (PKS)**

Los policétidos son metabolitos secundarios compuestos de una unidad de acetilo y propionilo, producidos mediante un sistema enzimático conocido como policétido sintasa y se componen de módulos funcionales y cada uno cumple con una función con respecto a la formación del producto, además los módulos forman conjuntos con otros y estos dictaminan la funcionalidad química del bloque nuevo a incorporar en la molécula sintetizada [24].

Los conjuntos o dominios formados por los módulos son los siguientes:

- Dominio Acil-transferasa (AT): Dominio donde se seleccionan y añaden moléculas de malonil y/o metilmalonil-CoA como unidad extensora, obteniéndolas de las vías centrales del metabolismo, principalmente de las rutas catabólicas de los hidratos de carbono.
- Proteína acarreadora de acilos (ACP): Transporta y activa a las moléculas de malonil o metilmalonil-CoA añadidas por el dominio AT [25, 26].
- Dominio quetosintasa (KS): Dominio encargado en la formación de enlaces entre los carbonos de las unidades monómericas de la molécula creciente del policétido.
- Quetorreductasa (KR): Esta enzima reduce el grupo  $\beta$ -ceto, formando un  $\beta$ -hidroxi en el policétido en construcción [25].
- Deshidratasa (DH): Obtención del policétido sintetizado mediante hidrólisis.
- Dominio tioesterasa (TE): Donde se finaliza y se libera el policétido formado [26].

Los sitios en el genoma donde se ubica la información para la síntesis de esta enzima, generalmente se encuentran en agrupaciones con otros genes, regiones codificadoras adyacentes y sitios de regulación de la transcripción. Los grupos enzimáticos PKS se agrupan en los tipos I, II y III; estos pueden ser iterativos o modulares.

- PKS tipo I: puede formar policétidos grandes y complejos, caracterizado por los dominios y módulos antes descritos, distintos taxones bacterianos sintetizan compuestos de actividad antimicrobiana, antiparasitaria, antifúngica e insecticida [25, 26].
- PKS tipo II: sintetiza policétidos aromáticos; esta agrupación consta de las enzimas KS- $\alpha$  y KS- $\beta$ , que juntas conforman un factor de elongación y una proteína acarreadora de acilos que une al tioéster mientras que las enzimas KS $\alpha$  y KS $\beta$  alargan el policétido con unidades de malonil-CoA. PKS-II también incluye genes para la síntesis de las enzimas ciclasas (CYC) y KR; además de enzimas reductoras y aromatasas (ARO) para la síntesis de los anillos aromáticos [26].
- PKS tipo III: Se especializa en la síntesis de policétidos aromáticos; se ha reportado la presencia de PKS-III en plantas terrestres, hongos, amebas y bacterias. Han sido mejor descritas como sintasa de calcona y sintasa de estilbeno para la síntesis de precursores de las rutas de los flavonoides y estilbenoides que cataliza la adición secuencial de unidades de acetato de malonil-CoA en plantas. PKS-III en estado funcional es dimérica y difiere de los módulos de PKS-I y las subunidades de PKS-II [26].

### 1.5.2. Grupo de genes biosintéticos sintetasa de péptido no ribosomal (NRPS)

Los NRPS presentan una estructura similar a PKS-I multimodular, funcionando de manera análoga suelen ser multimodulares, para formar a los aminoácidos en secuencia lineal y en función de los módulos que lo componen (Figura 3).

- Dominio de adenilación (A): Realizan la selección de componentes básicos como aminoácidos, proteinogénicos o no proteinogénicos, cargándolos a sitios con proteínas portadoras de peptidilo (PCP) y forman un aminoácido-PCP-tioéster.
- Dominio de condensación (C): Une aminoácidos al péptido en construcción mediante enlaces entre el grupo carboxilo de un aminoácido y el grupo amino de otro.
- Dominio de epimerización (E): Realiza modificaciones de epimerización en la proteína sintetizada, cambiando un L-aminoácido a D-aminoácido.
- Dominio de ciclación: Capaz de funcionar como reemplazo de los dominios para la adición y alineación de aminoácidos como treonina, serina y cisteína
- Dominio metiltransferasa (MT): Realiza modificaciones a la proteína sintetizada de N-metilación dependientes de S-adenosilmetionina.
- Dominio de oxidación: Realiza la síntesis de tiazol y oxazolina mediante la oxidación de un anillo de tiazolina.

- Dominio TE: Libera el péptido sintetizado de la enzima NRPS por una reacción de hidrólisis [26].
- Dominio reductasa: Cataliza la formación de un aldehído terminal dependiente de NADPH sujeto a modificaciones espontáneas o mediadas por enzimas [25,26].

Los módulos pueden unirse entre sí covalentemente para definir la linealidad de la proteína sintetizada llevando un orden estricto. Estas interacciones entre subunidades pueden formar dominios de acoplamiento (DD) especializados o dominios de mediadores de la comunicación (COM) [29,30].

El sistema NRPS puede formar una estructura híbrida con PKS, donde la construcción del péptido es realizada por diferentes enzimas adicionales que aún no son conocidas [30].

### **1.5.3. Estudios previos de la presencia de sistemas biosintéticos PKS y NRPS y producción de moléculas bioactivas en actinobacterias halófilas y halotolerantes.**

Las investigaciones referentes a la obtención de compuestos bioactivos a partir de microorganismos se hicieron populares quizá a partir desde la obtención de la penicilina y el descubrimiento de sus propiedades antibióticas en 1928, cuando Alexander Fleming obtuvo dicho compuesto a partir de cultivos de hongos del género *Penicillium*. Esto conllevó a la búsqueda de otros compuestos que fueran útiles, reconociendo hasta años después a las actinobacterias como microorganismos capaces de sintetizar múltiples compuestos bajo distintas condiciones. Bentley colaboradores en el año 2002 mediante secuenciación genómica del primer actinobacteria *Streptomyces coelicolor* A3(2) revelando su el gran potencial biosintético, sintetizando hasta 12 metabolitos secundarios distintos como sideróforos, lípidos, pigmentos, entre otros. De esta actinobacteria se aislaron 4 antibióticos distintos, convirtiendo a esa investigación como uno de los pioneros en la búsqueda de y nuevas sustancias sintetizadas por actinobacterias y con aplicaciones biotecnológicas útiles [31].

Los estudios hacia las actinobacterias han incrementado, considerando a las actinobacterias extremófilas, entre las que se encuentran las halófilas, como una fuente prometedora de compuestos activos. Fenical y Jensen en el año 2006 aislaron a la primera actinobacteria obligada por agua de mar perteneciente al género *Salinispora* como una fuente de obtención de productos naturales como terpenos, macrólidos poliénicos, metabolitos derivados de aminoácidos y otros metabolitos inusuales, encontrando mediante el cultivo de distintas cepas de este género, que son capaces de inhibir el crecimiento de células tumorales humanas y de bacterias patógenas multirresistentes a antibióticos [32].

Li y colaboradores en 2014, mediante un análisis de la secuencia del gen de ARN 16S, se reconocieron 15 géneros distintos de actinobacterias, estos fueron sometidos a pruebas de actividad antimicrobiana contra 3 bacterias patógenas, encontrando cepas que presentan una actividad mayor o igual comparada con el ciprofloxacino. Se dio a conocer que cepas de *Micromonospora*, *Nocardiopsis*, *Pseudonocardia* y *Streptomyces* que presentaron actividad antimicrobiana mostraron resultados positivos para la amplificación del gen PKS-I. *Nocardiopsis*, *Amycolatopsis*, *Streptomyces* y *Micromonospora* mostraron resultados positivos para la amplificación del gen PKS-II. *Nocardiopsis*, *Pseudonocardia* y *Streptomyces* mostraron resultados positivos para la amplificación del gen NRPS. Fueron encontradas cepas con actividad antimicrobiana, pero sin mostrar resultados positivos en la amplificación de los genes PKS-I, PKS-II y NRPS, sugiriendo que estas cepas emplean tipos adicionales de agentes o mecanismos bioactivos y la falta de fragmentos detectables para los genes de PKS y NRPS no prueba la ausencia de los respectivos grupos de genes biosintéticos [33].

Aftab y colaboradores en 2015 aislaron actinobacterias pertenecientes a la especie *Streptomyces griseus* con un 99% de identidad, estas fueron aisladas de minas de sal y mostraron actividad antitumoral contra líneas celulares Hela, MDBK y Vero, debido a que *S. griseus* produce un componente altamente estable conocido como Chromomycin SA y 1- (1 H -indol-3-il) -propano-1,2,3-triol, remarcando así el potencial médico que tienen los compuestos aislados de actinobacterias, no solo enfocándose en sus propiedades antimicrobianas [34].

Kim y colaboradores en el año 2017 mediante una investigación a especies del género *Nocardiopsis* aislados de una región salada de la República de Corea, llevaron al descubrimiento de nuevos macrólidos derivados de policétidos pertenecientes a una rara clase de antibióticos conocidos como borrelidinas, los cuales se creían que eran producidos por integrantes del género *Streptomyces*. Estos macrólidos fueron identificados mediante un análisis de cromatografía de líquidos con espectrómetro de masas y mediante cultivos de laboratorio encontraron que presentaban actividad antimicrobiana contra bacterias gram negativas, y actividad antitumoral, inhibiendo el crecimiento de células cancerosas. Es mencionado que las actinobacterias halófilas de origen marino, son una fuente de metabolitos secundarios biológica y estructuralmente diversos ya que la salinidad actúa como un factor distinto que promueve de manera continua nuevos mecanismos de adaptación metabólica [35].

Alonso–Carmona y colaboradores en 2017, realizaron aislamientos a partir de muestras de suelo de la laguna del Rosario en Oaxaca, identificando a la cepa LRS4.154 perteneciente al género *Saccharomonospora*, como la primera cepa halófila de este género con la capacidad de sintetizar metabolitos a través de expresión de genes PKS y NRPS. Mediante una secuenciación y análisis bioinformáticos, revelaron la presencia no solamente de genes codificadores de proteínas funcionales y de subunidades de ARN ribosomal, ARN de transferencia y

ARN no codificante, también confirmaron la presencia de 6 grupos de genes PKS y 2 grupos de genes NRPS [36].

Meena y colaboradores en el 2019, identificaron 10 géneros de actinobacterias halófilas aisladas de sedimentos de aguas profundas marinas pertenecientes a los géneros *Streptomyces*, *Dietzia*, *Brevibacterium*, *Salinospora*, *Nocardiopsis*, *Nocardia*, *Saccaropolyspora*, *Saccaromonospora*, *Blastococcus*, *Rhodococcus* y *Georginia*. Se evaluó el potencial farmacológico, sometiéndose a un cribado de estas actinobacterias contra bacterias patógenas para determinar su actividad antimicrobiana mediante un cultivo cruzado, encontrando inhibición en el crecimiento de *Escherichia coli*, *Vibrio cholerae*, *Klebsiella pneumoniae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Enterococcus faecalis*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Shigella flexneri*, *Micrococcus luteus* y *Salmonella typhi*. Las actinobacterias aisladas que presentaron actividad antimicrobiana fueron secuenciadas para la búsqueda de genes asociados a las rutas de PKS y NRPS, donde efectivamente fue encontrada la presencia de los genes implicados en los sistemas, sugiriendo que la actividad antimicrobiana de estas actinobacterias se debió a la síntesis de compuestos bioactivos por estos sistemas enzimáticos [37].

Ramírez–Durán y colaboradores en 2020, revelaron a partir de muestras de ADN extraído y posteriormente purificado de la especie *Saccharomonospora piscinae*, un total de 4508 secuencias codificantes y localizando dentro de estas, un total de 9 regiones genómicas que contienen grupos de genes biosintéticos PKS-I, PKS-II, PKS-III, NRPS e incluso, secuencias híbridas de estos grupos de genes, sugiriendo que la actinobacteria analizada en este estudio, tiene un gran potencial para la producción de metabolitos secundarios relacionados a partir de estos sistemas [38].

Ramírez–Durán y colaboradores en 2021 mediante un estudio de análisis taxogenómico y genómico enfocado a la identificación de grupos de genes biosintéticos PKS y NRPS usando herramientas bioinformáticas con antiSMASH. Se obtuvieron 19 secuencias genómicas de distintas especies del género *Saccharomonospora*, una gran variedad de genes para la síntesis de metabolitos secundarios, además de los PKS y NRPS, si no también terpenos, ectoína, indoles, airilpolienos sideróforos y péptidos sintetizados ribosómicamente y modificados postraduccionalmente. También con apoyo de la base de datos MIBiG, se predijeron que los grupos de genes biosintéticos producen compuestos como alquil-O-dihidrogeranilmetoxihidroquinonas, mirubactina, esporólido, curamicina y taromicina, oxazolpoxidomicina A, saprolmicina, entre otros compuestos, señalando al género *Saccharomonospora* para la síntesis de moléculas bioactivas y sus posibles usos en la producción de fármacos de importancia como antibióticos, mediante análisis exhaustivos con apoyo de herramienta bioinformáticas [39].

## **1.6. Bacterias multirresistentes a antibióticos.**

La multirresistencia a antibióticos, aunque sea un fenómeno natural, ha crecido progresivamente en las últimas décadas a causa de distintos factores como la mala gestión y regulación de la venta de antibióticos, su consumo excesivo e inadecuado, la elección incorrecta, las dosis inadecuadas, los tratamientos incompletos o pausados, además del mercadeo sin medidas de restricción de la industria farmacéutica. Esto ha tenido como consecuencia la aparición y diseminación de bacterias multirresistentes de manera más frecuente, haciendo muy difícil tratar infecciones causadas por bacterias muy comunes [40].

En los últimos años se han propuesto múltiples alternativas para controlar y dar solución a esta problemática, como vigilancia epidemiológica y microbiológica de las bacterias aisladas de nosocomios, el desarrollo de nuevos mecanismos para tratar enfermedades causadas por bacterias (fagoterapia, adyuvantes, péptidos antimicrobianos, nanopartículas o terapias fotodinámicas, entre otros), pruebas para diagnóstico rápido que permitan el uso correcto de antibióticos y terapias inmunitarias, entre otros [41]. Actualmente se considera a los antibióticos como la mejor opción cuando ocurre una infección en huéspedes humanos y animales, haciendo necesario obtener nuevos antibióticos y mejorar a los antiguos, evitando el uso indiscriminado de estos [26].

### **1.6.1. Mecanismos de multirresistencia a antibióticos.**

La multiresistencia a antibióticos surge a partir de distintos mecanismos; como las mutaciones cromosómicas o la adquisición de nueva información y secuencias genéticas mediante transferencia horizontal entre bacterias. Estas secuencias adquiridas codifican la síntesis de enzimas u otras proteínas que les permiten evadir la acción de compuestos antimicrobianos. Los mecanismos de multirresistencia más comunes son las bombas de eflujo o bombas de expulsión activa multidrogas que permite a las bacterias eliminar varios tipos de antibióticos mediante transporte activo. La degradación o inactivación de antibióticos es comúnmente realizada por enzimas que actúan sobre los sitios activos del antimicrobiano, la modificación o alteración de la célula bacteriana que impide que se efectúe la acción del antibiótico y la formación de biopelículas que previenen de forma física la acción no solo del antibiótico, sino también de la respuesta inmune celular [26, 42].

Las enzimas como  $\beta$ -lactamasas, modificadoras de aminoglucósidos o acetiltransferasas de cloranfenicol inactivan y modifican fármacos, son producidas por bacterias multirresistentes y es uno de los mecanismos más comunes que actúan de forma irreversible [43]. Las  $\beta$ -lactamasas son de las enzimas mejor caracterizadas, su mecanismo de acción es mediante la hidrólisis del anillo  $\beta$  lactámico en los antibióticos  $\beta$ -lactámicos como las cefalosporinas, carbapenémicos, monobactámicos y penicilina. Las  $\beta$ -lactamasas se clasifican

molecularmente en penicilinas, cefalosporinas,  $\beta$  lactamasas de amplio espectro,  $\beta$  lactamasas de espectro extendido (BLEE), y carbapenemasas [42, 44].

El mecanismo por modificación de los sitios en la bacteria donde se une el antibiótico se lleva a cabo mediante la mutación de los genes que codifican típicamente a proteínas de membrana citoplasmática y pared celular, modificando a las proteínas en su orden de aminoácidos y el ensamblaje de estas para modificar sus sitios de unión en la membrana o la pared [36]. También pueden reducir la cantidad de antibiótico que atraviesa la membrana celular como estrategia de resistencia, mediante otros mecanismos como la disminución en la formación de canales de proteínas en la membrana externa inhibiendo la síntesis de porinas o induciendo la síntesis de proteínas exportadoras conocidas como bombas de salida, que expulsan a los agentes antimicrobianos fuera de la célula bacteriana, haciendo que la concentración no sea lo suficiente para realizar un efecto inhibitorio o letal [43].

### **1.6.2. Bacterias multirresistentes “ESKAPE”.**

“ESKAPE” es un acrónimo usado para referirse al grupo de bacterias que pertenecen las especies *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Enterobacter* sp, son bacterias oportunistas y multirresistentes a antibióticos, comunes en infecciones nosocomiales y caracterizadas por evadir efectivamente la acción letal o inhibitoria de muchos antibióticos y terapias convencionales, provocando que aumente la morbilidad y mortalidad de pacientes en hospitales, aumentando los costos sanitarios y dificultando los diagnósticos y aplicación de tratamiento [40]. Estas bacterias se encuentran dentro de la lista de patógenos prioritarios de la Organización Mundial de la Salud establecida en 2017, con la finalidad de priorizar la investigación y el desarrollo de nuevos tratamientos que sean efectivos [45].

#### **1.6.2.1. *Enterococcus faecium*.**

Es una especie de cocos Gram positivos, reconocidos como patógenos oportunistas de importancia mundial que provocan infecciones humanas asociadas a tasas de mortalidad alta principalmente en pacientes hospitalizados. Se tienen registros que parten de 1980 donde *E. faecium* ha representado una amenaza de salud pública, encontrando cepas resistentes a vancomicina en aproximadamente el 50% de los hemocultivos realizados en Estados Unidos y Austria, convirtiéndolo en el segundo patógeno nosocomial más común causante de infecciones en el torrente sanguíneo [46].

Un rasgo muy común de *Enterococcus* es su propensión a adquirir información genética de forma horizontal, haciendo que adquiera resistencia no solo a

vancomicina, sino a una amplia gama de antibióticos como ampicilina, cefalosporinas, lincosamidas, aminoglucósidos, trimetoprim/sulfametoxazol, y casi universalmente a penicilinas, haciendo que la Organización Mundial de la Salud los agregue a la lista de patógenos bacterianos prioritarios que necesita el desarrollo e implementación de nuevos antibióticos [46, 47].

#### **1.6.2.2. *Staphylococcus aureus*.**

Es una bacteria patógena y oportunista de abscesos supurativos identificada desde hace más de 130 años. Produce infecciones leves en la piel y tejidos blandos y es causante de patologías como endocarditis, osteomielitis crónica, neumonía y bacteriemia, entre otras, causando morbilidad y mortalidad [48].

Se tienen registros de la década de 1920 del uso de metilina y penicilina como antimicrobianos efectivos contra *S. aureus*, hasta la actualidad, ha adquirido rápidamente resistencia a los 2 antibióticos antes mencionados [49]. Actualmente es una de las causas de infección bacteriana más importantes en relación con la atención sanitaria en el mundo; se tienen datos de la prevalencia de la resistencia a antibióticos de esta bacteria desde el 2006 al 2009, donde causó una cantidad significativa de muertes en más de 8 países. Se ha reportado en un 29% del total de las cepas aisladas en Europa y produciendo un total de 72,444 infecciones en Estados Unidos en el 2014 [49].

Investigaciones en relación con la adquisición de la resistencia a antibióticos de *S. aureus*, han encontrado que los elementos genéticos móviles son el principal mecanismo de adquisición de información, como los plásmidos y los cromosomas de casete estafilocócico, desempeñando un papel central en conferir resistencia a antibióticos  $\beta$ -lactámicos y la vancomicina [48].

#### **1.6.2.3. *Klebsiella pneumoniae*.**

Fue descrita y aislada por primera vez en 1882 de pulmones de pacientes que habían muerto de neumonía. Diversas especies de *Klebsiella* pueden encontrarse en el medio ambiente, además de colonizar a humanos, causando distintas infecciones del tracto respiratorio, urinario y torrente sanguíneo. Estas infecciones son más frecuentes en pacientes hospitalizados o inmunodeprimidos y se tratan de forma convencional con  $\beta$ -lactámicos y otros antibióticos [50].

Existen en todo el mundo cepas de *K. pneumoniae* que han generado resistencia a los antibióticos surgiendo de manera espontánea. Estudios anteriores enfocados en las capacidades moleculares de esta bacteria, han mostrado que una parte de los aislados clínicos identificados como *K. pneumoniae* son otras especies de *Klebsiella*, sugiriendo que los elementos móviles son un mecanismo de

transferencia génica horizontal que ayudan a otras especies de *Klebsiella* a generar resistencia a antibióticos [51].

#### **1.6.2.4. *Acinetobacter baumannii*.**

Es un patógeno que causa infecciones respiratorias y en el torrente sanguíneo, comúnmente de origen nosocomial que afecta principalmente a pacientes críticamente enfermos, es una bacteria oportunista y actualmente es considerada como una amenaza mundial en salud pública, debido a la adquisición de fenotipos de resistencia a múltiples antimicrobianos con tasas significativamente elevadas, ya que su genoma es capaz de mutar rápidamente cuando se encuentra en condiciones de estrés y adversidad [52].

*A. baumannii* es la causa de múltiples infecciones nosocomiales en distintos sitios anatómicos, como la piel, tejidos blandos y sitios quirúrgicos, así como infecciones del tracto urinario asociadas al uso de catéter. Cada uno de estos escenarios tienen en común una brecha en una barrera anatómica que permite la entrada de *A. baumannii* directamente al sitio de infección. Hasta la fecha, las infecciones adquiridas por *A. baumannii* solo se han presentado en pacientes con comorbilidades subyacentes como alcoholismo, diabetes mellitus u otras enfermedades como el cáncer y trastornos pulmonares obstructivos [52].

#### **1.6.2.5. *Pseudomonas aeruginosa*.**

Bacteria patógena oportunista que caracterizada por su coloración azul verdosa que se produce durante el cultivo, fue observada por primera vez en 1850 en apósitos para heridas quirúrgicas, asociada con un agente transferible y se describió como el agente causante de la purulencia azul verdosa en las heridas de pacientes. Es un organismo presente en muchos entornos ambientales y se puede aislar de plantas, animales y humanos [53].

*P. aeruginosa* es capaz de sobrevivir con requerimientos nutrimentales mínimos y tolera una variedad de condiciones físicas, permitiendo que este organismo persista tanto en el medio ambiente como en hospital. En nosocomios, *P. aeruginosa* puede aislarse de una variedad de fuentes; incluidos equipos de terapia respiratoria, antisépticos, jabón, fregaderos, trapeadores, medicamentos y piscinas de fisioterapia e hidroterapia. Los reservorios comunitarios de este organismo incluyen piscinas, hidromasajes, jacuzzis, solución para lentes de contacto, humidificadores domésticos, suelo y vegetales, por lo que se le considera como el quinto patógeno nosocomial aislado con mayor frecuencia y representa el 9% de todas las infecciones adquiridas en hospitales en los Estados Unidos, siendo la segunda causa más común de neumonía [53].

#### **1.6.2.6. *Enterobacter* sp.**

El género *Enterobacter*, fue descrito por primera vez en 1960, siendo el más complejo de las bacterias ESKAPE, cómo resultado de la evolución exponencial de los métodos fenotípicos y genotípicos. Existen 22 especies que pertenecen al género *Enterobacter* en el medio ambiente, siendo patógenos oportunistas en plantas, animales y seres humanos. La patogenicidad de este género de bacterias no es del todo clara debido a la cantidad limitada de trabajo realizado hasta la fecha en este campo [54].

Su resistencia a los agentes antibacterianos ha sido estudiada ampliamente, este género posee diferentes mecanismos de resistencia a través de diversos genes reguladores locales y globales y la modulación de la expresión de diferentes proteínas, incluyendo enzimas ( $\beta$ -lactamasas, etc.) o transportadores de membrana, como las porinas. y bombas de eflujo. Durante varios brotes hospitalarios *E. aerogenes* y *E. cloacae* exhibió un fenotipo resistente a múltiples fármacos, lo que ha generado preguntas sobre el papel de la regulación en cascada en la aparición de estas clonas bacterianas bien adaptadas [54].

## 2. Planteamiento del problema.

Una de las problemáticas de salud pública a nivel mundial, es la generación de resistencia a múltiples antibióticos por parte de diversas bacterias patógenas como consecuencia del uso inadecuado y excesivo de antibióticos para el tratamiento de enfermedades e infecciones provocadas por bacterias, además de su uso en ganadería y en agricultura; propiciando que las bacterias desarrollen diferentes mecanismos que favorecen su resistencia a antibióticos como la mutación genética, el desarrollo de genes de resistencia a nivel cromosómico y plásmidos que expresan proteínas para inactivar, alterar o modificar los sitios de unión de los antibióticos. Existen un gran número de bacterias que han desarrollado multirresistencia a antibióticos, como *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* *Enterobacter* sp, entre otras. La multirresistencia a antibióticos ha crecido en los últimos años y dificulta el tratamiento adecuado con los antibióticos actuales, ya que estos no siempre son efectivos en pacientes con enfermedades infecciosas frecuentes provocadas por este tipo de bacterias, como la endocarditis, neumonía, meningitis, sepsis o infecciones cruzadas en nosocomios, infecciones del tracto urinario, intraabdominal de heridas, entre otras. El surgimiento de la multiresistencia en cepas bacterianas patógenas que provocan enfermedades infecciosas sugiere buscar y desarrollar nuevas alternativas en tratamientos que sean efectivos.

Las actinobacterias se caracterizan por su capacidad para producir un gran número de compuestos conocidos como metabolitos secundarios, muchos de los cuales han resultado efectivos como potentes antibióticos, como la neomicina, la fosfomicina, la tetraciclina y la eritromicina, entre otros. Las actinobacterias que habitan en ambientes extremos, como los ambientes con una elevada concentración de NaCl, son llamadas actinobacterias halófilas y halotolerantes, estas bacterias podrían ser una buena opción en la búsqueda y producción de nuevos metabolitos secundarios como antibióticos. Mediante técnicas de laboratorio como aislamiento de cepas de actinobacterias halófilas y halotolerantes, extracción de ácidos nucleicos y el uso de herramientas bioinformáticas como la secuenciación genómica es posible identificar los genes que contienen información para la síntesis de estos metabolitos.

A pesar de contar con metabolitos secundarios efectivos para uso médico, surge la necesidad de aislar nuevos productos que sean efectivos para administrarse en el tratamiento contra enfermedades e infecciones provocadas por bacterias multirresistentes a antibióticos, evitando que estas cepas sigan diseminándose entre la población.

## **2.1. Pregunta de investigación.**

¿Qué grupos de genes biosintéticos de PKS y NRPS relacionados con actividad antimicrobiana, se encuentran presentes en cepas de actinobacterias halófilas y halotolerantes?

## **3. Hipótesis.**

$H_1$  = Las cepas de bacterias halófilas y halotolerantes incluidas en este estudio presentan al menos un grupo de genes biosintéticos de PKS y NRPS asociados a la actividad antimicrobiana.

$H_0$  = Las cepas de bacterias halófilas y halotolerantes incluidas en este estudio no presentan grupos de genes biosintéticos de PKS y NRPS asociados a la actividad antimicrobiana.

## **4. Objetivos.**

### **Objetivo general.**

- Determinar la presencia de grupos de genes biosintéticos de PKS y NRPS implicados en la producción de metabolitos secundarios en cepas de bacterias halófilas y halotolerantes con actividad antimicrobiana.

### **Objetivos particulares.**

- Aislar y caracterizar cepas de bacterias halófilas y halotolerantes de la zona de laguna salada ubicada en Mexicali, Baja California, México.
- Identificar cepas de bacterias halófilas y halotolerantes con actividad antimicrobiana contra bacterias patógenas.
- Detectar la presencia de grupos de genes biosintéticos de PKS y NRPS en genomas de cepas de bacterias halófilas y halotolerantes con actividad antimicrobiana.

## 5. Justificación.

En la búsqueda de mejorar las condiciones de salud, la humanidad ha indagado en la naturaleza para obtener recursos que puedan ser manipulados y explotados con el interés de mantener su bienestar. Un ejemplo de ello es el estudio de las actinobacterias, las cuales son capaces de biosintetizar productos con distintas aplicaciones biotecnológicas, como enzimas hidrolíticas, polímeros biosurfactantes o fármacos, entre otros. Muchos de los metabolitos secundarios empleados como fármacos aislados por actinobacterias son utilizados en medicina como inmunosupresores, antitumorales, inhibidores enzimáticos y antibióticos.

En los últimos años se ha tenido mucho interés en investigar a las bacterias halófilas y halotolerantes porque tienen una gran capacidad productora de metabolitos secundarios, que van de la mano con su capacidad para vivir en ambientes extremos, con una alta concentración de NaCl. La importancia de realizar estudio de secuenciación genómica de distintas cepas de bacterias halófilas y halotolerantes mediante herramientas de biología molecular y bioinformática, es que permitirá tener una mejor comprensión sobre el potencial de biosíntesis de metabolitos secundarios a través de la presencia de genes, muchos de los cuales podrían estar involucrados en la síntesis de productos con diferentes usos y aplicaciones.

Es importante aislar nuevos metabolitos secundarios producidos por bacterias halófilas y halotolerantes porque podría permitir obtener compuestos útiles en el desarrollo de nuevos medicamentos y mejorar los existentes aumentando su eficacia, ya que podrían prevenir y tratar enfermedades causadas por bacterias patógenas multirresistentes a antibióticos, respondiendo de manera más segura y eficaz a estos padecimientos. Actualmente es considerado como un enorme desafío para la humanidad la pérdida de la efectividad de algunos de los antibióticos actuales estimando para el año 2050 la pérdida de 10 millones de vidas humanas a causa de estos patógenos multirresistentes.

Es necesaria la detección de genes biosintéticos pertenecientes a los grupos PKS y NRPS ya que son importantes en distintas áreas como la farmacéutica, la biomedicina, la biotecnología, la agricultura y la investigación básica, entre otros, debido a que los metabolitos sintetizados a partir de estos genes, son considerados compuestos bioactivos y estudios anteriores han enfocado su atención a su identificación y detección en distintos organismos como plantas, distintas especies de eubacterias y de actinobacterias, enfocándose particularmente en las actinobacterias extremófilas al ser un grupo poco explorado.

## **6. Materiales y Métodos.**

### **6.1. Diseño de estudio.**

Estudio experimental.

### **6.2. Criterios de inclusión, exclusión y eliminación.**

#### **Criterios de inclusión.**

- Cepas de bacterias halófilas y halotolerantes que presenten al menos un grupo de genes biosintéticos de PKS y NRPS.

#### **Criterios de exclusión.**

- Cepas de bacterias que no sean halófilas o halotolerantes.

#### **Criterios de eliminación.**

- Cepas de bacterias halófilas y halotolerantes que no presenten ninguno de los grupos de genes biosintéticos de PKS y NRPS.

### **6.3. Procedimientos.**

#### **6.3.1. Zona de estudio.**

Laguna Salada se localiza en la zona norte del estado de Baja California, en el municipio de Mexicali y una porción occidental se encuentra en los municipios de Ensenada y Tecate. Sus coordenadas geográficas se localizan entre los paralelos 31° 23' y 32°39' de latitud norte y los meridianos 115° 02' y 115° 59' de longitud oeste (figura 1). Se ubica a un costado de la carretera federal Mexicali – Tijuana por el extremo norte de la zona y cerca del límite de la frontera norte mexicana con Estados Unidos, al oriente de esta zona se encuentra el acuífero Valle de Mexicali, y rodeándose de múltiples acuíferos al sur y poniente, cubriendo un área aproximada de 5,689 km<sup>2</sup> [55].

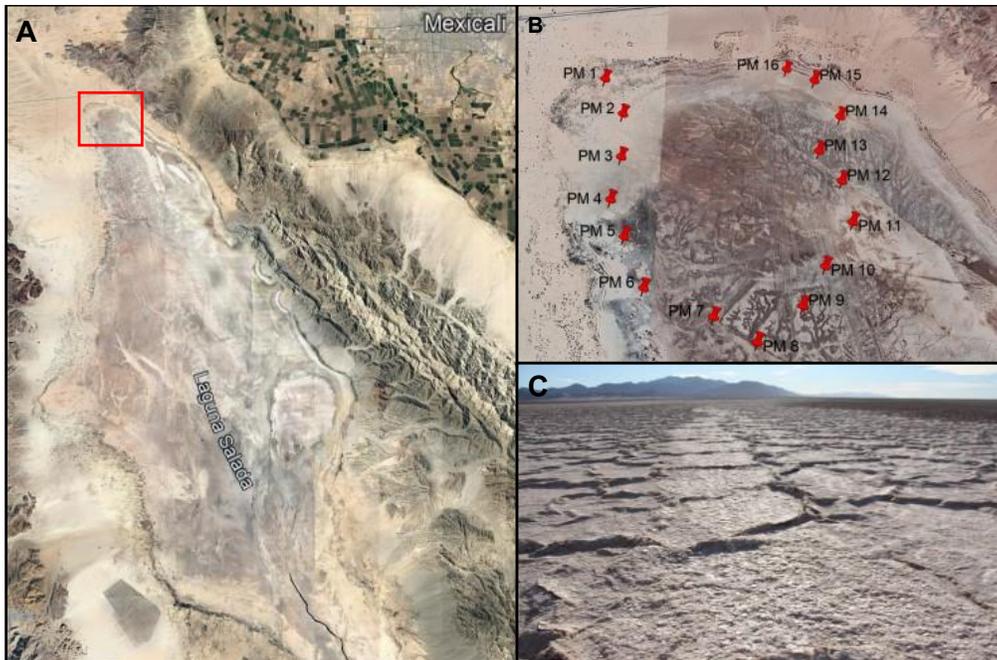


Figura 1. Zona de estudio A) “Laguna Salada” ubicada a unos kilómetros de la ciudad de Mexicali. B) Selección aleatoria de los puntos de muestreo. C) Recorrido de la zona.

Dentro de la zona de Laguna Salada se ubica un acuífero, el cual, en 2015 la Ley Federal de Derecho en Materia del Agua fue clasificado de disponibilidad tipo 2 para uso agrícola [55].

La fisiografía de la zona señalada por el Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI) en 1997, ubica 2 provincias fisiográficas dentro de la zona; la Llanura Sonorense y la Península de Baja California con una elevación de 3078 metros sobre el nivel del mar (msnm). El clima señalado por INEGI en 1998 siguiendo los criterios de clasificación climática de Köppen, señala una predominancia de climas muy áridos y secos, con lluvias en verano, invierno y escasas todo el año, presentando un régimen de lluvias de diciembre a marzo, siendo febrero el mes más lluvioso y junio el mes más seco. Para el año 2020 fueron registrando valores promedios anuales de temperatura y precipitación de 19.1 °C y 165.0 mm respectivamente [55].

El análisis edafológico de la zona menciona la predominancia de suelos de tipo leptosol (23.54%), regosol (22.67%), solonchak (15.89%), arenosol (13.20%), vertisol (7.89%), fluvisol (7.08%), calcisol (4.65%) y cambisol (2.24%). Los estudios de uso de suelo mencionan que el 16.41% de la zona es para uso en agricultura y el 1.33% para zona urbana. Los análisis de vegetación revelan la predominancia de matorrales en un 59.68% y apenas un 0.55% de bosque [56]. En análisis químicos previos realizados de la zona, han revelado un aproximado de 2500 ppm de solidos

disueltos totales, destacando la alta cantidad de cloruros de sodio y sulfatos de calcio [57].

### **6.3.2. Recolección de muestras.**

Se seleccionaron distintos puntos para la recolección de las muestras a conveniencia. Se tomaron muestras de suelo a una profundidad de 0 a 10 cm, muestras de costras de sal superficial, materia vegetal y suelo. Estas se colectaron en bolsas Ziploc de polietileno y tubos estériles. Las muestras se transportaron al laboratorio para ser procesadas.

#### **6.3.2.1. Procesamiento de muestras.**

Las muestras se procesaron en condiciones estériles. Las muestras de suelo se homogenizaron previamente, se tomaron 3 submuestras de distintos puntos de cada una de las muestras de suelo, tomando 1 g para colocarlo en 9 ml de agua destilada para realizar diluciones 1:10, 1:100 y 1:1000 en agua destilada, esta se agitó en un vortex por 1 minuto.

Para las muestras de sal y materia vegetal, se tomaron 10 g de cada una de las muestras, a estas se les adicionó 90 ml de agua destilada y se dejaron en reposo durante 7 días. Una vez disueltas las muestras de sal y materia vegetal, se filtraron al vacío y se colectaron alícuotas del filtrado en tubos Falcón para centrifugar a 5000 rpm durante 10 minutos. Se retiró el sobrenadante, mientras que el pellet se suspendió en 200 µl del sobrenadante.

#### **6.3.3. Caracterización fisicoquímica de las muestras.**

Se determinaron las características fisicoquímicas de pH y porcentaje de salinidad, se colocó en un tubo de ensayo 1 g de suelo seco y pulverizado y 9 mL de agua destilada, se agitó en un vortex durante 10 min hasta que esta se homogenice, la mezcla se filtró mediante una bomba de vacío en papel filtro Whatmann número 2. Este procedimiento se realizó con cada una de las muestras colectadas. Se midió el pH utilizando medidor portátil de pH (Conductronic PH10) y el porcentaje de salinidad se determinó por un refractómetro (ATAGO MASTER-S/Mill $\alpha$ ).

#### **6.3.4. Aislamiento de cepas de bacterias halófilas y halotolerantes.**

El aislamiento de cepas se realizó utilizando los siguientes medios de cultivo previamente preparados:

- Medio de cultivo para bacterias halófilas moderadas (MH) [58]: 10 g/L de extracto de levadura, 1 g/L de glucosa, 5 g/L de proteosa – peptona y 18 g/L de agar bacteriológico.
- Agar cerebro–corazón (BHI): (Bioxon, No. de catálogo: 214700): contiene 52 g/L.
- Agar dextrosa–Sabouraud: (Bioxon, No. de catálogo: 210700): contiene 65 g/L.
- Medio de cultivo Sauton–UAM [59]: contiene 4 g/L de asparagina, 2 g/L de ácido cítrico, 0.5 g/L de  $K_2HPO_4$ , 0.5 g/L de  $MgSO_4$ , 0.05 g/L de citrato férrico amoniacal, 10 g/L de puré de papa deshidratada, 1.5 g/L de carbón activado, 60 ml/L de glicerina, 1 ml/L de solución de sales y 15 g/L de agar bacteriológico (solución de sales contiene 0.1 g/L de  $ZnSO_4$ , 0.5 g/L de  $CaCl_2$  y 0.1 g/L de  $CuSO_4$ ).

Los medios de cultivo se complementaron con solución salina previamente preparada al 5% y 10% de contenido de NaCl y se ajustó a un pH de  $7.2 \pm 0.2$ . Los medios de cultivo se esterilizaron a 120 °C por 15 min y se vertieron en cajas Petri. La inoculación de cepas se realizó utilizando las muestras procesadas antes descrito. Para asegurar un ambiente estéril, se trabajó en una campana de flujo laminar, se tomaron alícuotas de 200  $\mu$ L de cada muestra diluida y se colocaron en el centro del medio de la caja Petri con el medio de cultivo solidificado, la muestra se extendió de forma radial con una varilla de vidrio.

Posterior a la inoculación de bacterias, se incubaron a 37 °C en un periodo mínimo de 4 a 8 semanas. Una vez teniendo crecimiento de colonias, se realizó la caracterización morfológica, eligiendo a las cepas de bacterias de acuerdo con su morfología macroscópica (tamaño, color, aspecto, forma, crecimiento radial, formación de micelio aéreo y producción de pigmentos). Después se realizó un frotis de las cepas seleccionadas para realizar una tinción Gram y hacer la descripción de la morfología microscópica y determinar la presencia de células filamentosas ramificadas.

#### **6.3.5. Caracterización fisiológica de las bacterias halófilas y halotolerantes.**

Se determinó la concentración de NaCl óptima en la que se mostró un crecimiento celular más abundante de cada una de las cepas, se realizaron siembras en agar BHI suplementado con NaCl en porcentajes de 0, 0.5, 3, 5, 10, 15, 20, 25 y 30, ajustando el pH a 7.2. y se incubaron a 37 °C.

Se determinó el pH óptimo en el que se mostró un crecimiento celular más abundante de cada una de las cepas, se realizaron siembras en agar BHI, ajustando

la concentración óptima NaCl previamente determinada. Se ajustó el pH de los medios en valores de 5, 6, 7, 8, 9 y 10 y se incubaron a 37 °C.

Se determinó la temperatura óptima en la que se mostró un crecimiento celular más abundante de cada una de las cepas, se realizaron siembras en agar BHI ajustando la concentración óptima NaCl y pH previamente determinadas. Las cepas fueron incubadas a temperaturas de 25 °C, 30 °C, 35 °C, 40 °C, 45 °C y 50 °C

En todos los casos, se registró la abundancia de crecimiento en lapsos de 24 h durante 10 días, interpretándolo como (-) cuando fue nulo, (+) cuando fue muy escaso, (++) cuando fue escaso, (+++) cuando fue moderado (+++++) cuando fue óptimo.

#### **6.3.6. Obtención de biomasa.**

Se preparó medio de cultivo líquido MH en matraces de 200 mL, se inocularon las cepas purificadas de bacterias halófilas y halotolerantes, se incubaron a  $35 \pm 2$  °C a 120 revoluciones por minuto (rpm) por 7 días.

Una vez obtenido crecimiento celular suficiente, se vertió el medio líquido con biomasa a tubos falcón de 15 mL estériles, estos se centrifugaron por 15 minutos, se retiró el sobrenadante y el pellet obtenido se transfirió a tubos de 1.5 mL, estos se centrifugaron a 10000 rpm por 10 min, se removió el sobrenadante y el pellet se utilizó para el protocolo de extracción de ADN.

#### **6.3.7. Extracción de ADN.**

La extracción de ADN se realizó de acuerdo con el protocolo del kit comercial "Wizard® Genomic DNA Purification" (Promega A1120).

1. El pellet se re/suspendió en 480 µL de ácido etilendiaminotetraacético (EDTA).
2. Se agregó 120 µL de lisozima, la solución será mezcló cuidadosamente con una micropipeta.
3. La mezcla fue incubada a 37 °C por 1 hora, después se centrifugó a 14000 rpm por 2 min y se retiró el sobrenadante.
4. Se adicionó a la mezcla 600 µL de solución de lisis nuclear del kit comercial "Wizard® Genomic DNA Purification" y se incubó a 80 °C por 5 min, después se enfrió a temperatura ambiente.
5. Se añadió a la mezcla 3 µL de solución de RNAsa del kit comercial "Wizard® Genomic DNA Purification", se mezcló de 2 a 3 veces por inversión y se incubó a 37 °C por 1 hora, después se enfrió a temperatura ambiente.
6. Se agregó a la mezcla con tratamiento de RNAsa, 200 µL de solución de precipitado de proteínas del kit comercial "Wizard® Genomic DNA

Purification”, la solución se agitó en un vortex durante 20 segundos para ser mezclada y se reposó en hielo durante 5 min.

7. La solución se centrifugó en a 14000 rpm por 3 min, el sobrenadante se vertió en un tubo de 1.5 mL estéril con 600 µL de isopropanol.
8. Se mezcló la solución por inversión hasta observar las hebras de ADN, después se centrifugó a 14000 rpm por 2 min.
9. Se removió el sobrenadante cuidadosamente y se adicionó 600 µL de etanol al 70%, se mezcló por inversión de 2 a 3 veces.
10. La solución se centrifugó a 14000 rpm por 2 min, el etanol se retiró cuidadosamente y el pellet se mantuvo a temperatura ambiente por 15 min hasta que se seque.
11. Por último, se adicionó 100 µL de solución de rehidratación del kit comercial “Wizard® Genomic DNA Purification”, se incubó a 4 °C por 12 hrs y después se almacenó en congelación hasta su posterior uso.

### **6.3.8. Análisis para la Detección de genes PKS y NRPS.**

La identificación de los genes PKS-I y NRPS-I se realizó a través de una PCR punto final usando una Taq polimerasa comercial My Taq™ DNA Polymerase (BIOLINE BIO 21105) y los cebadores para los genes biosintéticos PKS-I y NRPS-I [26].

#### **PKS-I**

- K1F (5'-TSAAGTCSAACATCGG BCA-3').
- M6R (5'CGCAGGTTSCSGTACCAGTA3').

#### **NRPS-I**

- A3F (5'-GCSTACSYSATSTACACSTCSGG-3').
- A7R (5'-SASGTCVCC<SGTSCGGTAS3').

Las amplificaciones de PKS-I y NRPS-I con los cebadores degenerados se realizaron con las siguientes condiciones:

- Desnaturalización inicial: 5 minutos a 95°C.
- Desnaturalización: 34 ciclos de 30 segundos a 96°C.
- Alineamiento: 34 ciclos de 2 minutos a 58°C
- Extensión: 34 ciclos de 90 segundos a 72°C.
- Post-extensión: 10 minutos a 72°C.

Los productos de amplificación se visualizaron por medio de una electroforesis en gel de agarosa al 1.5%, este se calentó en un horno de microondas y se mezcló hasta homogenizar, después se añadió bromuro de etidio (BrEt) en una concentración de 10 mg/mL. La mezcla se vertió en un molde con un peine añadido

para formar los pozos donde se añadieron las muestras, una vez que se solidifique el gel, se retiró el peine y se colocó el gel en una cámara de electroforesis y esta se cubrió con buffer TAE 1X, en los pozos se añadieron las muestras previamente mezcladas con buffer de carga y en un pozo único se añadió 5 µL de marcador de pesos moleculares de 1kb de la marca Thermo Scientific GeneRuler DNA Ladders. La electroforesis se programó a 120 volts, 300 miliamperes y 50 wats por 1 hora, las bandas obtenidas se observaron en un fotodocumentador bajo luz ultravioleta.

### **6.3.9. Determinación de la actividad antimicrobiana de las bacterias halófilas y halotolerantes contra las cepas patógenas.**

Se realizó la técnica de estrías perpendiculares cruzadas [60] para cepas que contienen sistemas biosintéticos PKS y NRPS, en cajas de Petri con medio de cultivo BHI se realizó una estría central de cada una de las distintas cepas de las bacterias halófilas y halotolerantes aisladas, las cajas se incubaron a  $35 \pm 2$  °C hasta su crecimiento. Después de haber el crecimiento de las colonias, se dejaron incubar 7 días más para que las bacterias pudieran producir las sustancias antimicrobianas y se difundieran en el medio de cultivo. Posteriormente se realizaron las siembras de las bacterias patógenas multirresistentes; *Acinetobacter calcoaceticus*, *Achromobacter xylosoxidans*, *Escherichia fergusonii*, *Klebsiella pneumoniae*, *Shigella dysenteriae* y *Shigella flexneri* de manera individual mediante una estría perpendicular a la estría central de la bacteria halófila y halotolerante, la placa se incubo a  $35 \pm 2$  °C por 24 horas. Se reporto si hubo presencia de la inhibición de crecimiento de las cepas patógenas.

### **6.3.10. Amplificación del gen ARNr 16S.**

Se realizo la del gen ARNr 16S de las bacterias halófilas y halotolerantes para su secuenciación empleando los siguientes cebadores universales [61]:

- 27F (5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3').
- 1492R (5'-TACGGTTACCTTGTTACGACTT-3').

La PCR se realizó usando una Taq ADN polimerasa comercial empleando las siguientes condiciones de reacción:

- Desnaturalización inicial: 5 minutos a 94°C.
- Desnaturalización: 60 segundos a 94°C.
- Alineamiento: 30 segundos a 59°C.
- Elongación: 60 segundos a 72°C por 30 ciclos.
- Post-elongación: 10 minutos a 72°C.

Los amplicones fueron observados mediante una electroforesis en gel de agarosa al 1% que se realizará con el procedimiento anteriormente descrito.

### 6.3.11. Identificación de especies.

Los productos de amplificación del gen RNAr 16S se enviaron al servicio de secuenciación proporcionado por MacroGen (Seul, Corea). Las secuencias obtenidas fueron revisadas y corregidas con los programas ChromasPro versión 1.5 y BioEdit versión 7.1.9. Las secuencias consenso obtenidas se compararon con las secuencias depositadas en las bases de datos del GeneBank mediante el programa BLAST del National Center of Biotechnology (NCBI) y EzBioCloud para determinar el porcentaje de similitud.

### 6.4. Variables de Estudio.

#### Independientes:

Actinobacterias halófilas y halotolerantes.

#### Dependientes:

Actividad antimicrobiana en actinobacterias halófilas y halotolerantes.

Detección de genes pertenecientes a los sistemas biosintéticos PKS y NRPS.

Tabla 1. Variables consideradas para este estudio.

Variable	Definición conceptual	Definición operativa	Tipo de variable	Escala de medición	Análisis estadístico
<b>Cepas de actinobacterias halófilas y halotolerantes.</b>	Grupo de actinobacterias extremófilas capaces de vivir en ambientes en distintas concentraciones de NaCl.	Halófilos débiles = 0.5 – 10 p/v de NaCl. Halófilos moderados = 10 – 20 p/v de NaCl. Halófilos extremos = > 20 p/v de NaCl. A 30	Cuantitativa continua	p/v de NaCl.	No aplica.
<b>Presencia de GGB de PKS y NRPS.</b>	Grupo de genes codificantes de enzimas que forman parte en la síntesis de policétidos y péptidos no ribosomales.	Productos de PCR para los grupos de genes: <i>PKS-I</i> <i>NRPS-I</i>	Cuantitativa continua	Numero de amplicones.	No aplica.
<b>Actividad antimicrobiana de</b>	Secreción de sustancias de las actinobacterias que	Conteo de cepas de actinobacterias con actividad antimicrobiana			No aplica.

<b>actinobacterias halófilas y halotolerantes</b>	matan o detienen el crecimiento de bacterias patógenas.	contra bacterias patógenas multirresistentes	Cuantitativa discreta	Zona de inhibición.	
---	---	--	-----------------------	---------------------	--

### 6.5. Implicaciones Bioéticas.

Convenio sobre la diversidad biológica de las Naciones Unidas, firmado por 193 países, establecido en junio de 1992 y entrando en vigor diciembre de 1993. Este convenio resalta:

- El valor intrínseco de la diversidad biológica hacia la ecología, genética, social, económico, científico, educativo, cultural, recreativo y estético.
- El derecho al uso sostenible de los recursos biológicos en beneficio de las generaciones actuales.
- Generar conocimiento de entendimiento básico para desarrollar las capacidades científicas, técnicas e institucionales.

## 7. Resultados.

### 7.1 Carta de envió.

20/11/22, 22:55

Correo: Ninfa Ramirez - Outlook

[ABC] Acuse de recibo del envió

Hernan Mauricio Romero <racbiocol\_fcbog@unal.edu.co>

Dom 20/11/2022 10:52 PM

Para: Ninfa Ramírez Durán <ninfard@hotmail.com>

Ninfa Ramírez Durán:

Gracias por enviar el manuscrito "Laguna Salada de Baja California, México; fuente de microorganismos extremófilos con potencial biotecnológico" a Acta Biológica Colombiana. Con el sistema de gestión de publicaciones en línea que utilizamos podrá seguir el progreso a través del proceso editorial tras iniciar sesión en el sitio web de la publicación:

URL del manuscrito:

<https://revistas.unal.edu.co/index.php/actabiol/authorDashboard/submission/105922>

Nombre de usuario/a: ninfard

Si tiene alguna duda puede ponerse en contacto conmigo. Gracias por elegir esta editorial para mostrar su trabajo.

Hernan Mauricio Romero

Acta Biológica Colombiana

racbiocol\_fcbog@unal.edu.co Universidad Nacional de Colombia (Sede Bogotá). Facultad de Ciencias. Departamento de Biología. <https://revistas.unal.edu.co/index.php/actabiol>

**Aviso legal:** El contenido de este mensaje y los archivos adjuntos son confidenciales y de uso exclusivo de la Universidad Nacional de Colombia. Se encuentran dirigidos sólo para el uso del destinatario al cual van enviados. La reproducción, lectura y/o copia se encuentran prohibidas a cualquier persona diferente a este y puede ser ilegal. Si usted lo ha recibido por error, infórmenos y elimínelo de su correo. Los Datos Personales serán tratados conforme a la Ley 1581 de 2012 y a nuestra Política de Datos Personales que podrá consultar en la página web [www.unal.edu.co](http://www.unal.edu.co). Las opiniones, informaciones, conclusiones y cualquier otro tipo de dato contenido en este correo electrónico, no relacionados con la actividad de la Universidad Nacional de Colombia, se entenderá como personales y de ninguna manera son avaladas por la Universidad.

## **7.2 Resumen del artículo.**

Se realizaron aislamientos de muestras ambientales recolectadas de la Laguna Salada, ubicada en Mexicali, Baja California, obteniéndose un total de 114 cepas de bacterias halófilas y halotolerantes, organizadas en 2 grupos, el primero de 97 eubacterias y el segundo de 17 actinobacterias. Los aislados fueron descritos macroscópica y microscópicamente, y se caracterizaron fisiológicamente para conocer su crecimiento óptimo en diferentes condiciones de NaCl, pH y temperatura. Además, se realizó la detección de los sistemas biosintéticos PKS y NRPS en las cepas aisladas mediante ensayos de PCR punto final. Los genes codificantes de los sistemas biosintéticos PKS y NRPS fueron detectados en 29 cepas, en donde 9 cepas fueron actinobacterias y 20 eubacterias. Las cepas que presentaron los sistemas PKS y NRPS fueron identificadas a nivel de género mediante la amplificación del gen de ARNr 16S para conocer la ecología microbiana de la región

**Palabras Clave:** Actinobacteria, bacterias halófilas, sistemas biosintéticos, ARNr 16S.

## **8. Discusión**

Los ambientes hipersalinos contienen una diversidad microbiana única compuesta principalmente por procariotas extremadamente halófilos, halófilos y halotolerantes (Didari et al., 2019). Estos microorganismos poseen mecanismos de adaptación fisiológica y molecular que les permiten desarrollarse bajo salinidad, temperatura y pH extremos, así como en bajas concentraciones de nutrientes (Diba et al., 2021).

Como se mostró en los espectros salinos, varios de los aislados bacterianos son capaces de tolerar altas concentraciones de sal. Esta característica fisiológica puede ser debido a la presencia de diferentes mecanismos, tales como la síntesis y acumulación de solutos compatibles que actúan como estabilizadores o amortiguadores de golpes de estrés en la célula y en la adaptación a condiciones de alta salinidad, desecación, calor, frío e incluso congelación (Dumorné et al., 2017). Estos solutos compatibles permiten a las bacterias halófilas adaptarse a la alta presión osmótica y crecer en ambientes altamente salinos (Nanca et al., 2018). La haloadaptación también permite que las bacterias halófilas puedan vivir en ambientes salinos, puesto que permite mantener estables las proteínas y por ende, un metabolismo activo (Mokashe et al., 2018).

Otro parámetro para analizar en la fisiología celular bacteriana es el pH en donde pueden crecer, ya que está relacionado con disponibilidad de nutrientes, las respuestas metabólicas, la regulación génica, la síntesis de productos y subproductos y la barrera de difusión de la membrana celular. Por ejemplo, muchas bacterias halófilas y halotolerantes, a rangos de pH de 7 a 11, pueden crecer y sintetizar productos proteicos como proteasas extracelulares de interés biotecnológico (Won et al., 2021). En ese sentido, las 114 cepas bacterianas aisladas de Laguna Salada crecen en un rango de pH neutro a alcalino, concordante con el pH medido en las muestras de donde provienen los aislados y existe una alta probabilidad que algunos de estos aislados pudieran producir compuestos con alto potencial biotecnológico.

La temperatura en el que crecen las bacterias halófilas y halotolerantes afectan el metabolismo energético y la absorción de oxígeno, la viscosidad, permeabilidad y

fisiología de la membrana celular, siendo el rango óptimo de temperatura para el crecimiento de bacterias halófilas de 30 °C y 50 °C (Kleetz et al., 2021). En el caso de los aislados bacterianos no fue la excepción, puesto que la mayoría de ellos son mesófilos y termotolerantes. Esta termotolerancia es importante para sobrevivir en ecosistemas áridos, tales como la Laguna Salada, en donde las temperaturas pueden llegar hasta los 50°C en verano (CONAGUA, 2020). Sin esta termotolerancia, estos organismos perecían y no formarían parte de la gran diversidad microbiana que conforma este ecosistema extremo.

Los mecanismos fisiológicos y de adaptación de bacterias halófilas y halotolerantes ofrecen ventajas en la obtención de productos únicos y poco conocidos. Un ejemplo de estos son los enzi-bióticos, que son productos conjugados de enzimas y antibióticos usados en el tratamiento contra hongos y bacterias. Evidenciando que ciertas enzimas en conjugación con otros productos ofrecen una importante opción en la síntesis de nuevos productos (Mokashe et al., 2018).

La presencia de los sistemas biosintéticos también se han reportado en eubacterias halofilas del género *Rhodobacterales*, *Rhizobiales* y *Sphingomonadales*, estas bacterias también han presentado actividad antimicrobiana contra bacterias patógenas Gram negativas, asociado su potencial inhibitorio a la presencia de los sistemas biosintéticos PKS y NRPS, señalando también que de estas eubacterias pueden obtenerse productos de interés como lipasas, amilasas, ureasas, proteasas, DNAasas, celulasas, entre otros (Alagarsamy et al., 2021).

La búsqueda de productos bioactivos sintetizados por bacterias extremófilas es un área en desarrollo y son pocos los hallazgos encontrados en comparación a actinobacterias mesófilas, que han representado un aproximado del 70% al 80% de

metabolitos secundarios comerciales que han mostrado usos de diversos intereses. En las cepas aisladas de Laguna Salada, los sistemas biosintéticos PKS-I y NRPS-I fueron detectados en el 25.42% de los aislamientos totales, que son menos de los encontrados por Bundale y colaboradores en 2018. Estos autores reportaron 83 cepas con presencia de los sistemas biosintéticos, mientras que en este estudio se identificaron solo en 29 cepas de 114 cepas aisladas; PKS-I se detectó en 3 cepas de *Oceanobacillus* y 1 de *Citrococcus* y NRPS-I se detectó en 10 cepas de *Salinococcus*, 1 cepa de *Oceanobacillus*, 1 cepa de *Salirhabdus*, 3 cepas de *Bacillus* y 10 cepas de *Nocardiopsis* (Bundale et al., 2018).

En el caso de las cepas identificadas de los géneros *Oceanobacillus* y *Salirhabdus*, no se han encontrado estudios que comprueben la presencia de los sistemas biosintéticos PKS-I y NRPS-I por lo que este estudio es el primero en reportar los sistemas biosintéticos en las cepas mencionadas, sugiriendo explorar el potencial biotecnológico de estas cepas.

## 9. Conclusión

De los 114 aislamiento de bacterias de “Laguna salada” ubicada en Mexicali, Baja California, mostraron una diversidad de acuerdo con su descripción macroscópica y microscópica, reconociendo 17 actinobacterias y 97 eubacterias

De acuerdo con la caracterización fisiológica de las cepas, se detectaron 20 bacterias halófilas y 94 bacterias halotolerantes. Mientras que el crecimiento a distintos pH mostró 8 bacterias alcalófilas, 89 alcalotolerantes y 17 mesófilas. También se reconocieron 10 bacterias termotolerantes capaces de tolerar temperaturas desde los 25°C, hasta los 50 °C.

La detección de los sistemas biosintéticos PKS y NRPS se detectaron en 29 cepas de las cuales 4 cepas presentaron el sistema PKS, 24 cepas presentaron el sistema NRPS y una cepa ambos sistemas.

La diversidad de especies bacterianas se reflejó en la identificación de 6 géneros de bacterias identificados como *Salinococcus*, *Oceanobacillus*, *Salirhabdus*, *Bacillus*, *Nocardiopsis* y *Citrococcus*. Habiendo detectado los sistemas biosintéticos PKS-I y NRPS-I en 29 cepas, se sugiere explorar el potencial biosintético de estos aislamientos y comprobar si los compuestos bioactivos que son capaces de sintetizar tienen otras aplicaciones de interés biotecnológico.

Con todo lo anterior, la Laguna Salada es un lugar extremo que contiene una diversidad bacteriana con un alto potencial biotecnológico, tales como el potencial biosintético de metabolitos secundarios como los compuestos bioactivos, entre muchos otros.

## 10. Referencias Bibliográficas.

1. Salazar-Loaiza, A., Ordoñez-Guerrero} C., Hernández-Serna D., Castaño-Pulgarin, L., Peña Pérez, K., Rodríguez-Núñez, J., Bueno-Lopez, L. (2014). Actinomycetes isolated from ground of the botanical garden of Pereira Technological University” *Scientia et Technica*. Vol. 19, No. 2
2. Quiñones-Aguilar, E., Evangelista-Martinez, Z., Rincón-Enríquez, G. (2016). Los actinomicetos y su aplicación a la biotecnología. *Elementos*. 2016. Volumen 101. P.p. 59–64.
3. Barka, E., Vatsa, P., Sánchez, L., Gaveau-Vaillant, N., Jacquard, C., Klenk, H., Clément, C., Ouhdouch, Y., van Wezel, G. (2016). Taxonomy, physiology, and natural products of actinobacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. Volume (80): 1–43.
4. Sánchez-Hidalgo, M., González, I., Díaz-Muñoz, C., Martínez, G., Genilloud, O. (2018). Comparative Genomics and Biosynthetic Potential Analysis of Two Lichen-Isolated Amycolatopsis Strains. *Front. Microbiol.* 2018. Volume 9-369. doi: 10.3389/fmicb.2018.00369.
5. Ventura, M., Canchaya, C., Tauch, A., Chandra, G., Fitzgerald, G., Chater, K., van Sinderen, D. (2007). Genomics of actinobacteria: Tracing the evolutionary history of an ancient phylum. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. Volume 71(3): 495-548.
6. Ramírez, N., Serrano, J., Sandoval, H. (2006). Extremophile microorganisms Halophile actinomycetes in Mexico. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*. 2006. Vol 37. núm 3.
7. Meseguer-Soria I. (2004). Los microorganismos halófilos y su potencial aplicado en biotecnología. *Revista Ciencia e Investigacion*. Volumen VII (2).
8. Irshad, A., Ahmad, I., Bum Kim, S. (2014). Culturable diversity of halophilic bacteria in foreshore soils. *Brazilian Journal of Microbiology*. Vol 45, 2, 563.
9. Ramírez, N., Serrano, J., Sandoval, H. (2004). The halophilic bacteria and their biotechnological applications. *Rev. Soc. Ven. Microbiol.* Vol. 24 n.1-2.
10. Horton, R., Moran, A., Scrimgeour, G., Perry, D., Rawn, D. (2008). *Principles of Biochemistry*. 8a Edición. Editorial Person. Carolina, USA. P.p. 296.
11. Nelson, D., Cox, M. (2005). *Lehninger: Principles of Biochemistry*. 4º Edición. Editorial Freeman and Company. Nueva York. USA. P.p. 482. Asencio, M.; Carranza, R.; Huertas, M. “Antimicrobial resistance of the most frequently isolated microorganisms in the Hospital General La Mancha Centro between June 2009 and May 2010”. *Rev Esp Quimioter.* 2012. Vol 25(3): 183-188.
12. Berg, J., Tymoczko, J., Stryer, L. (2007). *Biochemistry*. 6º Edición. W. H. Freeman and company. P.p. 427.
13. Madigan, M., Martinko, J., Dunlap, P., Clark D. (2012). *Brock. Biología de los microorganismos*. 12º Edición. Editorial Person. Madrid, España. P.p. 507-510.

14. Ventosa, A., Nieto, J., Oren, A. (1998). Biology of moderately halophilic aerobic bacteria". *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. Vol 62:504-544.
15. Reeves, CD., Chung, LM., Liu, Y., et al. (2002). A new substrate specificity for acyl transferase domains of the ascomycin polyketide synthase in *Streptomyces hygroscopicus*". *Journal Biology Chemistry*. 277:9155-9159.
16. Ronoh, R., Budambula, N., Mwirichia, R., et al. (2013). Isolation and characterization of actinobacteria from Lake Magadi, Kenya". *African Journal Microbiology*. Res 7:4200-4206.
17. Walsh, C. (2003). Where will new antibiotics come from?" *Nature Reviews in Microbiology*. Vol 1:65-70.
18. Nigam, A., Gupta, A., Sharma. (2014). Treatment of infectious disease: Beyond antibiotics. *Microbiological Research*. Vol 169(10):146-651.
19. Hamed, J., Fatemeh A., Ventosa, A. (2013). Systematic and biotechnological aspects of halophilic and halotolerant Actinomycetes. *Extremophile*. Vol 17:1-13.
20. Dharmaraj, S. (2010). Marine *Streptomyces* as a novel source of bioactive substances". *Journal of Microbiology and Biotechnology*. Vol 26:2123-2139.
21. Eftekharzadeh, B., Hamdi, F., Mohammadipanah, F., Khodagholi, N., Maghsoudi, H., Klenk, H. (2010). Inhibition of oxidative stress induced amyloid  $\beta$  formation in NT2 neurons by culture filtrate of a strain of *Streptomyces antibioticus*. *Applied Microbiology and Biotechnology*. Vol 26:1805-1811.
22. Nieto, J., Vargas, C. (2010). Synthesis of osmoprotectants by moderately halophilic bacteria: genetic and applied aspects. *Research Signpost*. 403-418.
23. Medema, M., Kottmann, R., Yilmaz, P., Cummings, M., Biggins, J., Blin, K., et al. (2015). Minimum Information about a Biosynthetic Gene cluster. *Nature America, Inc*. Vol 11.
24. Peng, F., Zhang, M., Hou, S., Chen, J., Wu, Y., Zhang, X. (2020). Insights into *Streptomyces* spp. Isolated from the rhizospheric soil to *Panax notoginseng* isolation, antimicrobial activity and biosynthetic potential for polyketides and non-ribosomal peptides. *BMC Microbiology*. Vol. 20:143.
25. Suroto, D., Kitani, S., Arai, M., Ikeda, H., Nihira, T. (2018). Characterization of the biosynthetic gene cluster for cryptic phthoxazolin A in *Streptomyces avermitilis*. *Journal Plos One*. Vol 13(1): e0190973.
26. Ayuso, A., Genilloud, O. (2005). New PCR Primers for the Screening of NRPS and PKS-I Systems in Actinomycetes: Detection and Distribution of These Biosynthetic Gene Sequences in Major Taxonomic Groups". *Microbial Ecology*. Volume 49, 10–24.
27. Robertsen, H., Musiol-Kroll, E. (2019). Actinomycete-Derived Polyketides as a Source of Antibiotics and Lead Structures for the Development of New Antimicrobial Drugs. *Antibiotics*. Vol 8:157.
28. Weissman, K. (2015). The structural biology of biosynthetic megaenzymes". *Nature Chemical Biology*. Vol. 11. 660–670.

29. Meslet-Cladière, L., Delage, L., Leroux, C., Goulitquer, S., Leblanc, C., Creis, E., Gall, E., Stiger-Pouvreau, V., Czjzek, M., Potina, P. (2013). Structure/Function Analysis of a Type III Polyketide Synthase in the Brown Alga *Ectocarpus siliculosus* Reveals a Biochemical Pathway in Phlorotannin Monomer Biosynthesis *The Plant Cell*. Vol. 25: 3089–3103.
30. Hacker, C., Cai, X., Kegler, C., Zhao, L., Weickhmann, K., Wurm, J., Bode, H., Wöhnert, J. (2018). Structure-based redesign of docking domain interactions modulates the product spectrum of a rhabdopeptide-synthesizing NRPS". *Nature Communications*. Vol 9:4366.
31. Bentley, S., Chater, K., Cerdeno-Tarraga, A., Challis, G., Thomson, N., James, K., Harris, D., Quail, M., Kieser, H., Harper, D., Bateman, A., Brown, S., Chandra, G., Chen, C., Collins, M., Cronin, A., Fraser, A., Goble, A., Hidalgo, J., Hornsby, T., Howarth, S., Huang, S., Kieser, T., Larke, L., Murphy, L., Oliver, K., O'Neil, S., Rabinowitsch, E., Rajandream, M., Rutherford, K., Rutter, S., Seeger, K., Saunders, D., Sharp, S., Squares, R., Squares, S., Taylor, K., Warren, T., Wietzorrek, A.; Woodward, J., Barrell, B.G.; Parkhill, J., Hopwood, D.A. (2002). Complete genome sequence of the model actinomycete *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Nature* (417): 141–147.
32. Fenical, W., Jensen, P. (2006). Developing a new resource for drug discovery: marine actinomycete bacteria. *Nature Chemical Biology*. Vol 2:12.
33. Li, J., Dong, J., Yang, J., Luo, X., Zhang, S. (2014). Detection of polyketide synthase and nonribosomal peptide synthetase biosynthetic genes from antimicrobial coral-associated actinomycetes. *Springer International Publishing Switzerland*. 106(4):623-35.
34. Aftab, U., Zechel, D., Sajid, I. (2015). Antitumor compounds from *Streptomyces* sp. KML-2, isolated from Khewra salt mines, Pakistan. *Biological Research*. Volume 48:58.
35. Kim, J., Shin, D., Kim, S., Park, W., Shin, Y., Kim, W., Lee, S., Oh, K., Shin, J., Oh, D.C. (2017). Borrelidins C–E: New Antibacterial Macrolides from a Saltern-Derived Halophilic *Nocardiosis* sp. *Marine Drugs*. Volume 15, 166.
36. Alonso-Carmona, S., Vera-Gargallo, B., de la Haba, R., Ventosa, A., Sandoval-Trujillo, H., Ramírez-Durán, N. (2017). Draft Genome Sequence of *Saccharomonospora* sp. Strain LRS4.154, a Moderately Halophilic Actinobacterium with the Biotechnologically Relevant Polyketide Synthase and Nonribosomal Peptide Synthetase Systems". *American Society for Microbiology*. Vol 5. e00392-17.
37. Meena, B., Anburajan, L., Valsalan, N., Kirubagaran, R., Dharani, B. (2019). Biodiversity and antibacterial potential of cultivable halophilic actinobacteria from the deepsea sediments of active volcanic Barren Island. *Microbial Pathogenesis*. 32:129-136.
38. Ramírez-Durán, N., de la Haba, R., Vera-Gargallo, B., Sanchez-Porro, C., Alonso-Carmona, S., Sandoval-Trujillo, H., Ventosa, A. (2020). Draft Genome Sequence of *Saccharomonospora piscinae* KCTC 19743T, an

- Actinobacterium Containing Secondary Metabolite Biosynthetic Gene Clusters". American Society for Microbiology. Vol 9. e01588-19.
39. Ramírez-Durán, N., de la Haba, R., Vera-Gargallo, B., Sanchez-Porro, C., Alonso-Carmona, S., Sandoval-Trujillo, H., Ventosa, A. (2021). Taxogenomic and Comparative Genomic Analysis of the Genus *Saccharomonospora* Focused on the Identification of Biosynthetic Clusters PKS and NRPS". *Frontiers in Microbiology*. Vol 12:603791.
  40. Ma, Y., Wang, C., Li, Y., Li, J., Wan, Q., Chen, J., Tay, F., Niu, L. (2020). Considerations and Caveats in Combating ESKAPE Pathogens against Nosocomial Infections. *Adv. Sci.* Vol 7;1901872.
  41. Mulani, M., Kamble, E., Kumkar, S., Tawre, M., Pardesi, K., (2019). Emerging Strategies to Combat ESKAPE Pathogens in the Era of Antimicrobial Resistance: A Review. *Front. Microbiol.* Vol 10:539.
  42. Vázquez-López, R., Solano-Gálvez, S., León-Chávez, B., Thompson-Bonilla, M., Guerrero-González, T., Gómez-Conde, E., Martínez-Fong, D., González-Barrios, J. (2018). Characterization of Gene Families Encoding Beta-Lactamases of Gram-Negative Rods Isolated from Ready-to-Eat Vegetables in Mexico City. *High-Throughput*. Vol 7;36.
  43. Guzman, M. Salazar, E., Cordero, V., Castro, A., Villanueva, A., Rodulfo, H., De Donato, M. (2019). Multidrug resistance and risk factors associated with community-acquired urinary tract infections caused by *Escherichia coli* in Venezuela". *Biomédica*. Vol 39(Supl.1):96-106.
  44. Santajit, S., Indrawattana, N. (2016). Mechanisms of Antimicrobial Resistance in ESKAPE Pathogens". *BioMed Research International*. Vol 10;1155.
  45. Ramsamy, Y., Essack, S., Sartorius, B., Patel, M., Mlisana, K. (2018). Antibiotic resistance trends of ESKAPE pathogens in Kwazulu-Natal, South Africa: A five-year retrospective analysis". *African Journal of Laboratory Medicine*. Vol 7(2), a887.
  46. Gorrie, C., Higgs, C., Carter, G., Stinear, T., Howden, B. (2019). Genomics of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium*". *Microbial Genomics*. Vol 5.
  47. de Been, M., Pinholt, M., Top, j., Bletz, S., Mellmann, A., van Schaik, W., Brouwer, E., Rogers, M., Rogers, Y., Bonten, M., Corander, J., Westh, H., Westh, D., Willemsa, R. (2015). Core Genome Multilocus Sequence Typing Scheme for HighResolution Typing of *Enterococcus faecium*". *Journal of Clinical Microbiology*. Vol 53.
  48. McGuinness, W., Malachowa, N., DeLeo, F. (2017). Vancomycin Resistance in *Staphylococcus aureus*". *Yale Journal of Biology and Medicine*. Vol 90;269-281.
  49. Jiffy, J., Sinumol, G., Sai Ravi, C., Shijulal, N. (2019). Phylogenomic Analysis Reveals the Evolutionary Route of Resistant Genes in *Staphylococcus aureus*". *Genome Biol. Evol.* Vol 11(10):2917–2926.

50. Ierardi, V., Domenichini, P., Reali, R., Chiappara, G., Devoto, G., Valbusa, U. (2017). *Klebsiella pneumoniae* antibiotic resistance identified by atomic force microscopy. *J Biosci.* Vol 42(4):623-636.
51. Martin, R., Bachman, M. (2018). Colonization, Infection, and the Accessory Genome of *Klebsiella pneumoniae*. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology.* Vol 8:4.
52. Harding, C., Hennon, C., Feldman, M. (2018). Uncovering the mechanisms of *Acinetobacter baumannii* virulence". *Nat Rev Microbiol.* Vol 16(2): 91–102.
53. Lister, P., Wolter, D., Hanson, N. (2009). Antibacterial-Resistant *Pseudomonas aeruginosa*: Clinical Impact and Complex Regulation of Chromosomally Encoded Resistance Mechanisms". *Clinical Microbiology Reviews.* Vol 22 (4): 582–610.
54. Regli, A., Lavigne, J., Pagès, J. (2019). *Enterobacter spp.*: Update on Taxonomy, Clinical Aspects, and Emerging Antimicrobial Resistance". *Clinical Microbiology Reviews.* Vol. 32.
55. Subdirección general técnica gerencia de aguas subterráneas. Actualización de la disponibilidad media anual del agua en el acuífero laguna salada (0209), estado de Baja California. CONAGUA. 2020.
56. Prontuario de información geográfica municipal de los Estados Unidos Mexicanos. Mexicali, Baja California. INEGI. 2009.
57. Aguilar-Dumas, A. (2009). Áreas para exploración en los alrededores del campo geotérmico de Cerro Prieto, BC. *Geotermia.* Vol. 22, No.2.
58. Quesada, E., Ventosa, A., Rodríguez, F., Megias, L., Ramos, A. (1983). Numerical taxonomy of moderately halophilic Gramnegative bacteria from hypersaline soils. *General Microbiology.* Volume 129: 2649 – 2657.
59. Sandoval-Trujillo, H., Sanchez-Saucedo, L., Ramirez-Duran, N., Berr-Chavero, B. (1997). Design of an economic method for the isolation of nocardioform actinomycetes from the soil. *Journal of Medical Mycology.* Vol 7: 232 – 233.
60. Fritz, S., Rajaonison, A., Chabrol, O., Raoult, D., Rolain, J., Merhej, V. (2018). Full-length title: NRPPUR database search and in vitro analysis identify an NRPS-PKS biosynthetic gene cluster with a potential antibiotic effect. *BMC Bioinformatics.* Vol 19:463.
61. Lara-Severino, R., Gómez-Olivan, L., Sandoval-Trujillo, H., Isaac-Olive, K., Ramírez-Durán, N. (2017). Búsqueda de capacidad productora de biosurfactantes en actinobacterias haloalcalófilas y haloalcalotolerantes". *Revista internacional de contaminación ambiental.* Volume 33 (3) 529-539.