



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Posgrado en Ciencias del Mar y Limnología
Biología Marina

“Distribución de genes de candidina en actinobacterias
aisladas de muestras marinas nacionales”

T E S I S

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA:

Abigail Gándara Zamudio

TUTOR PRINCIPAL

Dr. Luis Ángel Maldonado Manjarrez

ICMyL

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

Dra. Ma. Leticia Arena Ortiz

SISAL

Dra. Patricia Bonilla Lemus

FES Iztacala

Dr. Bruno Gómez Gil Rodríguez Sala

CIAD

Dr. Miroslav Macek

FES Iztacala

MÉXICO, D. F., JUNIO 2015



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Posgrado en Ciencias del Mar y Limnología

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**DISTRIBUCIÓN DE GENES DE CANDICIDINA EN
ACTINOBACTERIAS AISLADAS DE MUESTRAS
MARINAS NACIONALES.**

T E S I S

que para obtener el grado académico de

**Maestra en Ciencias
(Biología Marina)**

P r e s e n t a

Biol. Mar. ABIGAIL GÁNDARA ZAMUDIO

Director de tesis: Dr. Luis Ángel Maldonado Manjarrez.

Comité tutorial: Dra. Ma. Leticia Arena Ortiz.

Dra. Patricia Bonilla Lemus.

Dr. Bruno Gómez Gil Rodríguez Sala.

Dr. Miroslav Macek.

México, D. F., 2015

La presente tesis de maestría se realizó en el Laboratorio de Biodiversidad y Bioprospección Microbiana (ex-Análisis Químicos) del Instituto de Ciencias del Mar y Limnología de la UNAM, bajo la dirección del Dr. Luis Ángel Maldonado Manjarrez, dentro del proyecto “Distribución de genes de candidina en actinobacterias aisladas de ecosistemas marinos y terrestres nacionales” (PAPIIT IN212011-3). Este trabajo de investigación se llevó a cabo gracias al apoyo económico del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT).

DEDICATORIA

La presente tesis está dedicada a todas las personas que me han apoyado para poder cumplir mis sueños:

A *Ti*, que aunque hace mucho no te puedo ver, te puedo sentir siempre de mi mano, por tus enseñanzas, por tu forma tan distinta de ser, por enseñarme a siempre querer más de la vida, *te amo Papá...GRACIAS.*

A mi ma, *Maricela Zamudio*, por todo el amor que una madre puede demostrar, siempre apoyándome, cuidándome, queriendo sólo lo mejor para mi porvenir, GRACIAS MAMI por toda tu paciencia, *te amo.*

A *Rodrigo Domínguez*, por ser más que mi esposo, por ser un gran ser humano y compañero, por amarme tanto, por confiar en mí , GRACIAS por dejarme crecer a tu lado, *te amo.*

A *Juanito*, hijo, eres lo más preciado que tengo en la vida, gracias por ser como eres, sin tu motivación no podría seguir en mi camino, GRACIAS por existir, *te amo.*

A mi hermano, *Anson*, por ser mi compañero de sangre y de vida, porque tu existencia me motiva a darte un buen ejemplo, *te amo.*

A *Tony y Soni*, mis gordas favoritas, porque aunque estemos lejos, siempre se preocupan por mí, por complementar mi vida con sus ocurrencias, *las amo gordas.*

A *Yogui*, mi hermano por elección, por tanto café y pláticas “científicas” que me ayudaron a tener buenas ideas para mi tesis, *te quiero amigo.*

A todos mis amigos que de alguna u otra forma siempre están pendientes y han confiado en mí, gracias por todo su apoyo y su amistad, *Karola, Lao, Juan Carlos, Sergio, Laura, Saraí, Ilse, los gordos Arturo, José, Pancho...* los quiero.

Todos ustedes son parte importante de mi vida, de una u otra manera por eso les dedico este pedacito de mí, los quiero a todos.

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a todos los que me apoyaron y orientaron en la realización de éste trabajo en especial:

A mi director de tesis, *Dr. Luis Ángel Maldonado Manjarrez*, quien me brindó su tiempo, su confianza y la oportunidad para laborar con él en la realización de este trabajo.

A la *Dra. Erika T. Quintana Cano*, por su tiempo y orientación en la realización de los ensayos de biología molecular.

A los doctores *Leticia Arena, Patricia Bonilla, Bruno Gómez Gil y Miroslav Macek*, por su tiempo para formar parte de mi comité tutorial y por sus valiosos comentarios que enriquecieron notablemente este trabajo.

A la *Dra. Gloria Vilaclara Fatjó*, por su tiempo y todas las atenciones brindadas para la conclusión de este trabajo.

A la *Universidad Nacional Autónoma de México* y al *Instituto de Ciencias del Mar y Limnología*, por darme la oportunidad de desarrollarme profesionalmente y prestar sus instalaciones para la realización de este trabajo.

INDICE

| | PAG. |
|---|-------------|
| RELACIÓN DE FIGURAS | I |
| RELACIÓN DE TABLAS | II |
| GLOSARIO | III |
| ABREVIATURAS | V |
| RESUMEN | VI |
| CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN | 1 |
| CAPÍTULO II: ANTECEDENTES | 4 |
| 2.1. ACTINOBACTERIAS: GENERALIDADES..... | 4 |
| 2.2. GÉNERO <i>MICROMONOSPORA</i> | 6 |
| 2.3. <i>CANDIDA</i> : CARACTERÍSTICAS GENERALES Y PATOGENICIDAD..... | 8 |
| 2.4. METABOLITOS SECUNDARIOS..... | 9 |
| 2.5. JUSTIFICACIÓN..... | 22 |
| 2.6. PREGUNTAS DE INVESTIGACIÓN..... | 22 |
| 2.7. OBJETIVOS..... | 23 |
| 2.8. HIPÓTESIS..... | 23 |
| CAPÍTULO III: MATERIALES Y MÉTODOS | 24 |
| 3.1. MICROORGANISMOS: CRECIMIENTO Y CONSERVACIÓN..... | 24 |
| 3.2. EXTRACCIÓN DE ADN..... | 24 |
| 3.3. PCR PARA ACTINOBACTERIAS, FAMILIA MICROMONOSPORACEAE Y GÉNERO <i>MICROMONOSPORA</i> | 25 |
| 3.4. IDENTIFICACIÓN DEL CLÚSTER PKSs DE CANDICIDINA..... | 26 |
| 3.5. ELECTROFORESIS..... | 28 |
| 3.6. ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA..... | 29 |
| CAPÍTULO IV: RESULTADOS | 31 |
| 4.1. CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS DE LOS ORGANISMOS DE ESTUDIO.... | 31 |
| 4.2. IDENTIFICACIÓN DE LOS MICROORGANISMOS COMO PERTENECIENTES AL GÉNERO <i>MICROMONOSPORA</i> | 31 |
| 4.3. IDENTIFICACIÓN DEL CLÚSTER DE CANDICIDINA EN <i>MICROMONOSPORA</i> ... | 32 |
| 4.4. EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA..... | 33 |
| CAPÍTULO V: DISCUSIÓN | 38 |
| 5.1. IDENTIFICACIÓN DE LOS MICROORGANISMOS COMO PERTENECIENTES AL GÉNERO <i>MICROMONOSPORA</i> | 38 |
| 5.2. IDENTIFICACIÓN DEL CLÚSTER GENÉTICO PKSs TIPO I EN EL GÉNERO <i>MICROMONOSPORA</i> | 39 |
| 5.3. EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA..... | 42 |
| CAPÍTULO VI: CONCLUSIONES | 45 |
| PERSPECTIVAS | 47 |
| ANEXO I | 48 |
| ANEXO II | 49 |
| ANEXO III | 51 |
| BIBLIOGRAFÍA | 57 |

RELACIÓN DE FIGURAS

| | PAG. |
|--|------|
| Figura 1. Colonias del género <i>Micromonospora</i> a los nueve días de siembra en medio GYM..... | 7 |
| Figura 2. Representación esquemática de una ruta PKSs tipo I..... | 12 |
| Figura 3. Estructura química de la Candicidina D..... | 15 |
| Figura 4. Productos de PCR para género <i>Micromonospora</i> | 32 |
| Figura 5. Evaluación de la actividad frente a distintas cepas patógenas de <i>Candida</i> | 33 |
| Figura 6. Gráficas que muestran el porcentaje de aislados marinos evaluados a los 15 días de incubación que presentaron inhibición frente a las distintas cepas patógenas de <i>Candida</i> | 34 |
| Figura 7. Actividad antifúngica presentada por el grupo 1 (naranja claro) a los 15 días de incubación frente a las distintas cepas patógenas de <i>Candida</i> | 35 |
| Figura 8. Actividad antifúngica presentada por el grupo 2 (naranja medio) a los 15 días de incubación frente a las distintas cepas patógenas de <i>Candida</i> | 36 |
| Figura 9. Actividad antifúngica presentada por el grupo 3 (naranja fuerte) a los 15 días de incubación frente a las distintas cepas patógenas de <i>Candida</i> | 36 |
| Figura 10. Actividad antifúngica presentada a los 25 días de incubación frente a las distintas cepas patógenas de <i>Candida</i> | 37 |

RELACIÓN DE TABLAS

| | PAG. |
|---|------|
| Tabla I. Función sugerida de los marcos abiertos de lectura (ORFs) identificados en el clúster génico del metabolito secundario FR-008 y su comparación con los genes de otras rutas metabólicas para la síntesis de polienos..... | 17 |
| Tabla II. Revisión bibliográfica de metabolitos secundarios del tipo macrólidos en organismos del género <i>Micromonospora</i> | 19 |
| Tabla III. Reactivos empleados para la PCR para Actinobacterias, familia Micromonosporaceae y género <i>Micromonospora</i> | 26 |
| Tabla IV. Condiciones utilizadas en el termociclador LabNet en los distintos PCRs..... | 26 |
| Tabla V. Reactivos empleados en tres PCRs distintas para la amplificación de sistemas PKSs tipo I en organismos del género <i>Micromonospora</i> | 27 |
| Tabla VI. Condiciones utilizadas en el termociclador LabNet en los distintos PCRs para la amplificación de sistemas PKSs tipo I en organismos del género <i>Micromonospora</i> | 27 |
| Tabla VII. Oligonucleótidos de seis genes que conforman el clúster de síntesis de candicidina..... | 28 |

GLOSARIO

- Actinobacterias:** (Dominio: Bacteria, Filo: Actinobacteria, Clase: Actinobacteria); microorganismos Gram-positivos que contienen en su ADN genómico, un porcentaje de guanina-citosina superior al 50%.
- Actinomicetos:** término utilizado para nombrar más específicamente, a los microorganismos pertenecientes al orden de los Actinomycetales (Clase Actinobacteria).
- Antibacteriano:** fármaco o sustancia capaz de inhibir el crecimiento y desarrollo de bacterias o su eliminación sin dañar el organismo infectado.
- Antibiótico:** en términos estrictos o históricos, es una sustancia secretada por un microorganismo, que tiene la capacidad de afectar a otros microorganismos. En la actualidad, se refiere a una sustancia química producida por un ser vivo o un derivado sintético, que mata (bactericida) o impide el crecimiento (bacteriostático) de ciertas clases de microorganismos sensibles.
- Antifúngico:** o antimicótico, es aquella sustancia que tiene la capacidad de evitar el crecimiento de algunos tipos de hongos o incluso de provocar su muerte.
- Biosíntesis:** proceso mediante el cual un organismo elabora sustancias químicas complejas a partir de otras más sencillas, con el consecuente gasto de energía metabólica.
- Candicidina:** policétido macrólido polieno (heptaeno), antibiótico producido por *Streptomyces griseus* IMRU3570, con actividad antifúngica frente a *Candida albicans*.
- Candidiasis:** infección fúngica causada por cualquiera de las especies de *Candida*; abarca desde infecciones superficiales (candidiasis oral y vaginitis), hasta las sistémicas y potencialmente mortales, conocidas como candidemias, usualmente en pacientes inmunocomprometidos.
- Cepa:** en microbiología, conjunto de virus, bacterias, y hongos que tienen el mismo patrimonio genético.
- Citosina:** base nitrogenada que pertenece a la familia conocida como pirimidinas, se representa con la letra C; forman parte de los ácidos nucleicos (ADN y ARN). En el ADN siempre se empareja con la guanina por medio de tres enlaces de hidrógeno.
- Clúster genético:** clúster génico o clúster de genes, se refiere a un conjunto de genes relacionados que codifican para la síntesis un mismo producto (proteínas, metabolitos secundarios).
- Código genético:** secuencia de nucleótidos de una molécula de ADN o ARN que especifica la secuencia de aminoácidos (3 nucleótidos= 1 codón= 1 aminoácido) de un polipéptido.
- Gen:** unidad de herencia transmitida de generación en generación. Secuencia ordenada de nucleótidos en la molécula de ADN que codifican para diferentes proteínas.
- Gram-positivas:** bacterias que se tiñen de azul oscuro o violeta por la tinción de Gram. Esta característica está ligada a la estructura de su envoltura celular que comprende la membrana citoplasmática y una pared celular compuesta por una gruesa capa de peptidoglicano, que rodea a la anterior. A diferencia de las Gram-negativas, no presentan una segunda membrana lipídica externa.

- Guanina:** una de las cinco bases nitrogenadas, forma parte del ADN y ARN; es una base púrica, se representa con la letra G. En la formación de la doble cadena del ADN, ésta siempre se empareja con la citosina mediante tres puentes de hidrógeno.
- Macrólido:** metabolitos secundarios del tipo policétidos (sintetizados por PKSs tipo I) que se caracterizan por la presencia de un anillo macrocíclico cerrado por lactonización al ciclarse la cadena policetónica correspondiente.
- Metabolitos secundarios:** compuestos orgánicos sintetizados por el organismo que no tienen un rol directo en el crecimiento o reproducción del mismo, pero que pueden brindar una ventaja competitiva.
- Oligonucleótidos:** véase *primers*.
- Péptidos no ribosomales (NRPS):** familia de productos naturales complejos sintetizados por enzimas multimodulares denominadas péptido no ribosomal sintetasas (NRPs) construidos a partir de monómeros de aminoácidos simples.
- Policétidos (PKS):** familia de metabolitos secundarios biosintetizados por complejos enzimáticos denominados policétido sintetasas (PKSs), entre los que se encuentran moléculas de gran importancia biotecnológica, como antifúngicos, antibacterianos, antitumorales, inmunosupresores, herbicidas, pigmentos y otros.
- Polienos:** policétidos del tipo macrólidos que se caracterizan por la presencia de dobles enlaces conjugados (cromóforos) en el anillo macrocíclico, presentan un azúcar unido al anillo mediante un enlace glucosídico. Generalmente, presentan actividad fungicida, como la nistatina, pimaricina, anfotericina B y candicidina.
- Primers:** oligonucleótidos, iniciadores o cebadores; secuencias sintéticas cortas de ADN o ARN, de aproximadamente cincuenta pares de bases o menos, usadas para reconocer por apareamiento complementario secuencias blanco de ADN.
- Producto natural:** compuestos finales del metabolismo secundario de los organismos; algunas veces son particulares para ciertas clases de organismos y pueden tener efectos farmacológicos.

ABREVIATURAS

- A:** adenilación.
- ACP:** proteínas acarreadoras de grupos acilo (acyl carrier protein).
- ADC sintasa:** amino-deoxi corismato sintasa.
- ADN:** ácido desoxirribonucleico.
- AT:** transacilasa.
- BHI:** medio de cultivo de infusión de cerebro-corazón (brain heart infusion).
- BrEt:** bromuro de etidio.
- C:** condensación, formación de enlaces peptídicos.
- CHS:** chalconas sintetetasas.
- DH:** deshidrasa.
- dNTP's:** desoxiribonucleótidos trifosfato.
- ER:** enoilreductasa.
- FAS:** ácido graso sintetetasas.
- GTE:** glucosa-tris-EDTA.
- KR:** cetoreductasa.
- KS:** cetosintasa.
- LPSN:** por sus siglas en inglés, List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature.
- meso-DAP:** ácido meso-diaminopimélico.
- MgCl₂:** cloruro de magnesio.
- NRPS:** péptidos no ribosomales.
- NRPSs:** péptido no ribosomal sintetasa.
- ORFs:** marcos abiertos de lectura.
- P:** pantotenilación; portador peptidil.
- PABA:** ácido para-amino benzoico.
- pb:** pares de bases.
- PCR:** reacción en cadena de la polimerasa.
- PKS:** policétidos.
- PKSs:** policétido sintetasas.
- TBE:** buffer de Tris-borato-EDTA.
- TE:** tioesterasa.
- V:** volts.

RESUMEN

Las actinobacterias marinas constituyen una prolífica fuente de productos naturales, como agentes antimicrobianos, capaces de combatir la emergencia de poblaciones de organismos patógenos resistentes a los actuales tratamientos antibióticos. Una alternativa para la producción de nuevos y mejores compuestos bioactivos, es la identificación, caracterización y posterior manipulación de los “clústers” genéticos involucrados en las rutas biosintéticas que codifican para la producción de metabolitos secundarios. La candicidina, un policétido macrólido polieno producido por una ruta PKSs del tipo I, es un antifúngico producido por *Streptomyces griseus* IMRU3570, que ha mostrado actividad frente a *Candida albicans*. En aislados marinos del Golfo de California, del género *Micromonospora*, también se ha reportado una bioactividad importante frente a muestras clínicas de *C. albicans* y otras especies de *Candida*, sin embargo, a la fecha no existen reportes donde se evalúe la presencia del clúster biosintético PKSs tipo I para la síntesis de candicidina. El objetivo de este estudio fue evaluar la presencia del clúster biosintético PKSs tipo I de candicidina en aislados marinos del género *Micromonospora* que presentaron actividad antifúngica frente a distintas especies de *Candida*, empleando los oligonucleótidos diseñados por Ayuso y Genilloud (2005), para detectar específicamente rutas PKSs tipo I. Todos los microorganismos evaluados mostraron una bioactividad importante, especialmente frente a las cepas patógenas de *C. glabrata* CBS138 y *C. glabrata* No.148. No fue posible la detección del clúster biosintético PKSs tipo I en aislados del género *Micromonospora*, utilizando los oligonucleótidos específicos de Ayuso y Genilloud. Sin embargo, la ausencia del clúster biosintético PKSs tipo I en los aislados marinos del género *Micromonospora* no es contundente ya que, tomando en cuenta que los organismos evaluados son de origen marino, pueden presentarse cambios a nivel molecular como resultado de su evolución dentro del ambiente marino, por lo cual no podemos descartar la posibilidad de encontrar dominios AT y KS con secuencias menos conservadas y por ello, una baja homología con los primers utilizados. Los resultados de diferentes BLASTn y la actividad mostrada frente a las cepas patógenas de *Candida*, permiten suponer que los microorganismos evaluados en este estudio, no están sintetizando el compuesto de la candicidina, la cual se reporta, solo presenta actividad frente a cepas patógenas de *C. albicans*, sino algún otro metabolito secundario, sin embargo, hacen falta más estudios para poder descartar la posibilidad de que se trate de alguna ruta biosintética alterna a la descrita para aislados terrestres del género *Streptomyces*. Finalmente, hay que mencionar que es importante evaluar los oligonucleótidos correspondientes a los distintos genes del clúster de candicidina y hacer un análisis de sus secuencias para poder esclarecer la presencia o ausencia del clúster biosintético en los aislados marinos del presente trabajo.

Palabras Clave: actinobacterias marinas, *Micromonospora*, clúster biosintético, PKSs tipo I, candicidina, *Candida sp.*

CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN

La búsqueda de nuevos microorganismos como fuentes biológicas de compuestos bioactivos no es un estudio nuevo sino un tema que debe irse reinventando para acomodarse a las necesidades socio-económicas actuales de una sociedad cambiante (Bérdy, 2005). En este sentido, actualmente la automedicación con antibióticos constituye un serio problema de salud pública, pues la inadecuada elección del antibiótico y una incorrecta posología, puede generar poblaciones de microorganismos patógenos resistentes al antibiótico empleado (Cohen, 1992; Neu, 1992; Kunin, 1993; Contreras *et al.*, 2002).

En los hongos, se estima que las presiones selectivas llevarán a una disminución en la susceptibilidad y a un aumento en la resistencia a los actuales tratamientos antifúngicos (Stephenson, 1997). La resistencia más frecuente es de *Candida* spp. a los azoles aunque también se ha observado resistencia primaria *in vitro* a anfotericina B en hongos filamentosos emergentes como: *Scedosporium* spp., *Fusarium* spp., *Aspergillus terreus*, en algunas levaduras como *Trichosporon* spp., *Candida lusitanae*, *C. guilliermondi* y con menor frecuencia en *Cryptococcus neoformans*. A pesar de las estrategias para controlar las micosis resistentes, la búsqueda de nuevos antifúngicos continúa siendo una necesidad (Hudson, 2001; Kontoyiannis y Lewis, 2002).

En los últimos años, las actinobacterias de ambientes marinos han llamado la atención de los investigadores dada la gran diversidad de especies y la utilidad de los metabolitos secundarios que producen como agentes antimicrobianos y compuestos antitumorales (Maskey *et al.*, 2004; Macherla *et al.*, 2005; Maldonado *et al.*, 2005a; Manam *et al.*, 2005; Kwon *et al.*, 2006; Ward y Bora, 2006). El descubrimiento de nuevos antibióticos en las actinobacterias marinas provee una nueva expectativa para combatir la emergencia de poblaciones resistentes (Zhao *et al.*, 2009).

Cerca de 10,000 compuestos bioactivos han sido aislados de los actinomicetos, un grupo

dentro de las actinobacterias, de los cuales 8,700 pertenecen al grupo de los antibióticos; entre el 75 y 80% han sido obtenidos a partir del género *Streptomyces*, y un 20% de otros géneros de actinomicetos (Bérdy, 2005). A pesar de que el género *Streptomyces* es el mayor contribuyente en la producción de antibióticos, miembros del género *Micromonospora* también son considerados como productores potenciales de nuevos compuestos bioactivos (Zhao *et al.*, 2004). Recientemente se ha informado que a partir del género *Micromonospora* se han obtenido importantes antibióticos tales como aminociclitolos (gentamicinas y sisomicinas), macrólidos (mycinamicina y rosamicina) y antibióticos polisacáridos (everninomicina); por lo que el estudio de este género resulta de gran interés (Lazzarini *et al.*, 2000; Gil y Campelo-Diez, 2003; Leiva *et al.*, 2004).

Una alternativa para la producción de nuevos y mejores compuestos bioactivos a partir de productos marinos, es la identificación, caracterización y posterior manipulación de los “clústers” genéticos involucrados en las rutas biosintéticas que codifican para la producción de metabolitos secundarios especialmente de aquellos del tipo de péptidos no ribosomales (NRP) y policétidos (PKS) (Gil y Campelo-Diez, 2003; Keller *et al.*, 2005; Lombó *et al.*, 2006; Jenke-Kodama y Dittmann, 2009; Giessen y Marahiel, 2011). Un mejor entendimiento de estos clústers permitirá diseñar sistemas de producción a escala industrial de sustancias que se encuentran en partes por millón en las muestras biológicas estudiadas, cuando la síntesis química no es eficiente (Zengler *et al.*, 2002).

Los policétidos constituyen una vasta familia de metabolitos secundarios producidos por actinobacterias, entre los que se encuentran moléculas de gran importancia biotecnológica, como antifúngicos, antibacterianos, antitumorales, inmunosupresores, herbicidas, pigmentos y otros compuestos de interés comercial (Demain, 1997; Cane *et al.*, 1998; Menzella *et al.*, 2005).

La candicidina, un policétido macrólido polieno (heptaeno), es un antibiótico producido por *Streptomyces griseus* IMRU3570, que ha mostrado actividad antifúngica frente a *Candida albicans* (Gil y Campelo-Diez, 2003). A la fecha, se han realizado trabajos en los que se han analizado los clústers genéticos involucrados en la biosíntesis de la candicidina, la cual es producida por una ruta PKSs del tipo I. En el género *Micromonospora* también se ha observado actividad antifúngica frente a *C. albicans*

(Lazzarini *et al.*, 2000; Gil y Campelo-Diez, 2003; Leiva *et al.*, 2004), sin embargo, no existen trabajos en los que se evalúe la presencia o ausencia del clúster de síntesis de candicidina.

En general, los macrólidos polienos son estructuralmente complejos y su síntesis química o modificación no es sencilla; son muy tóxicos y pueden causar serios efectos colaterales como daño renal tubular y tromboflebitis (Zotchev, 2003). Por ello, es de importancia realizar estudios en los que se analicen los clústers genéticos responsables de la producción de candicidina en los actinomicetos del género *Micromonospora*, ya que, teniendo un mejor conocimiento sobre los genes que codifican para su producción se permitirá su modificación para una mejor aplicación.

CAPÍTULO II:

ANTECEDENTES

2.1. ACTINOBACTERIAS: GENERALIDADES.

El filo *Actinobacteria* constituye una de las mayores unidades taxonómicas dentro del dominio Bacteria; también es considerado uno de los linajes más antiguos dentro de los procariontes, la divergencia que existe entre este filo y otros filos dentro de Bacteria es tan antigua, que actualmente no es posible identificar al grupo más emparentado con éste (Ventura *et al.*, 2007; Gao y Gupta, 2012).

Las primeras actinobacterias fueron descubiertas en 1874, considerándose como los organismos causantes de algunas enfermedades mortales como la lepra (*Mycobacterium leprae*) y la tuberculosis (*Mycobacterium tuberculosis*) (Hopwood, 1999; Hopwood, 2007). En las siguientes décadas se describieron otros microorganismos con características semejantes, en principio se pensó que eran organismos intermedios entre las bacterias y los hongos, pero actualmente son considerados como bacterias verdaderas (dominio Bacteria) y su semejanza con los hongos parece ser producto de una evolución convergente debido a la similitud de sus hábitats (Jorgensen, 2005).

Las actinobacterias son microorganismos Gram-positivos que contienen en su ADN genómico, un porcentaje de guanina-citosina superior al 50%. Los distintos géneros que conforman este grupo presentan gran diversidad en su morfología, fisiología y metabolismo (Magarvey *et al.*, 2004; Stackebrant y Schumann, 2006).

Pueden presentar desde una morfología unicelular, hasta formas filamentosas; tienen similitud con los hongos, por su morfología, tipo de reproducción y crecimiento en medios de cultivo sólidos y líquidos. Son resistentes a la penicilina, lo que constituye la principal diferencia con los hongos filamentosos (Magarvey *et al.*, 2004; Stackebrant y Schumann, 2006). Casi todos los miembros del grupo desarrollan un micelio filamentososo que puede permanecer unido a la superficie del sustrato (micelio vegetativo) o puede desarrollarse hacia la parte externa denominándose micelio aéreo (Holt *et al.*, 1994).

La mayoría de estos microorganismos son aerobios estrictos aunque algunos son anaerobios facultativos. Aunque la formación de esporas es muy común, no es ubicua; y éstas pueden variar desde zoosporas móviles hasta propágulos especializados (Lechevalier, 1977).

Se encuentran principalmente en los suelos donde constituyen entre el 20 y 60% de la población microbiana. Su función ecológica principal es la descomposición de la materia orgánica a través de las enzimas que producen. Algunas especies son patógenos de animales, plantas y humanos, mientras que otras son fijadoras de nitrógeno (Rivas *et al.*, 2003; Stackebant y Schumann, 2006).

Ya que la mayoría de las especies de este filo producen una gran cantidad de enzimas extracelulares y metabolitos secundarios; las actinobacterias han adquirido un papel muy importante para la medicina, la agricultura y la producción alimenticia (Gao y Gupta, 2012; Seipke *et al.*, 2012).

En 1943, a partir del microorganismo *Streptomyces griseus*, se descubrió el antibiótico estreptomina que actúa eficazmente contra el agente etiológico de la tuberculosis (Waksman y Henrici, 1943). Durante las décadas de 1950 a 1980, se descubrieron muchos antibióticos a partir de distintas especies de actinomicetos, convirtiéndolos en el grupo de microorganismos más utilizado en la industria farmacológica (Hopwood, 2007).

Actualmente, el sedimento marino constituye un prometedor reservorio de nuevas cepas de actinobacterias bioactivas, y más específicamente los organismos pertenecientes al orden de los *Actinomycetales* (clase Actinobacteria). Los actinomicetos marinos, representan una prolífica fuente de productos naturales incluyendo policétidos, péptidos no ribosomales o una combinación de ambos. Dentro de este orden existen dos familias que son reconocidas por su gran producción de metabolitos secundarios: *Streptomycetaceae* y *Micromonosporaceae* (Mincer *et al.*, 2002; Bull *et al.*, 2005; Jensen *et al.*, 2005; Maldonado *et al.*, 2005a).

Algunos de los nuevos metabolitos obtenidos a partir de actinobacterias marinas incluyen el agente anticancerígeno salinosporamide A aislado de *Salinispora tropica* (Maldonado *et al.*, 2005b; Fenical *et al.*, 2009); las marinomicinas A a D aisladas de cepas

Marinophilus, con actividad antitumoral y antibiótica; y el antibiótico abisomicina C obtenido a partir de cepas *Verrucosispora* (Fenical y Jensen, 2006; Kwon *et al.*, 2006).

2.2. GÉNERO *Micromonospora*.

2.2.1. CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA.

La familia *Micromonosporaceae* fue propuesta por Krasil'nikov (1938), y posteriormente, la descripción para la familia, ha sido corregida con base en el análisis de las secuencias genéticas del gen 16S rRNA y características quimiotaxonómicas, por Koch y colaboradores (1996) y Stackebrandt y colaboradores (1997). Los géneros que conforman esta familia son: *Micromonospora* (Ørskov, 1923), *Actinoplanes* (Couch, 1950), *Catellatospora* (Asano y Kawamoto, 1986), *Catenuloplanes* (Yokota *et al.*, 1993), *Couchioplanes* (Tamura *et al.*, 1994), *Dactylosporangium* (Thiemann *et al.*, 1967), *Pilimelia* (Kane, 1966), *Actinocatenispora* (Thawai *et al.*, 2006), *Asanoa* (Lee y Hah, 2002), *Luedemanella* (Ara y Kudo, 2007a, b), *Longispora* (Matsumoto *et al.*, 2003), *Polymorphospora* (Tamura *et al.*, 2006), *Salinispora* (Maldonado *et al.*, 2005), *Spirilliplanes* (Tamura *et al.*, 1997), *Verrucosispora* (Rheims *et al.*, 1998) y *Virgisporangium* (Tamura *et al.*, 2001).

El género *Micromonospora* fue descrito por Ørskov en 1923 (Kawamoto, 1989) y a la fecha, de acuerdo a la LPSN (por sus siglas en inglés, List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature) se tienen registradas 44 especies y 7 subespecies (<http://www.bacterio.cict.fr/>).

Dominio: Bacteria

Filo: Actinobacteria

Clase: Actinobacteria

Orden: Actinomycetales

Suborden: Micromonosporineae

Familia: Micromonosporaceae

Género: *Micromonospora* Ørskov 1923

2.2.2. CARACTERÍSTICAS GENERALES DEL GÉNERO *MICROMONOSPORA*.

Micromonospora Ørskov 1923, es el género tipo de la familia *Micromonosporaceae* (orden *Actinomycetales*); aunque el género exhibe una considerable diversidad fisiológica y bioquímica, también forma un grupo bien definido en términos de morfología, filogenia y quimiotaxonomía. Alberga varias cepas productoras de antibióticos y degradadoras de caucho de interés biotecnológico. Son bacterias aerobias estrictas, quimiorganotróficas y mesófilas, con crecimiento óptimo entre 20 y 40°C; no existe crecimiento por debajo de pH de 5.5 ni por arriba de 9.5. Presentan micelio vegetativo y en algunos casos se reporta la presencia de micelio aéreo (Suárez y Hardisson, 1985; Kawamoto, 1989; Hirsch, 2009).

Las colonias que crecen en medios sólidos inicialmente tienen un color amarillo o naranja claro, que va cambiando a naranja, rojo, marrón, azul-verdoso o morado. Al madurar, las colonias adquieren progresivamente un color más oscuro con la producción de esporas marrón-negras, verdes-negras o negras y se vuelven mucosas. Algunas especies producen pigmentos, que pueden ser difusibles en el medio o no, éstos carecen de valor diagnóstico para reconocer especies (Kawamoto, 1989; Rodríguez-Martínez, 2008) (Figura 1).

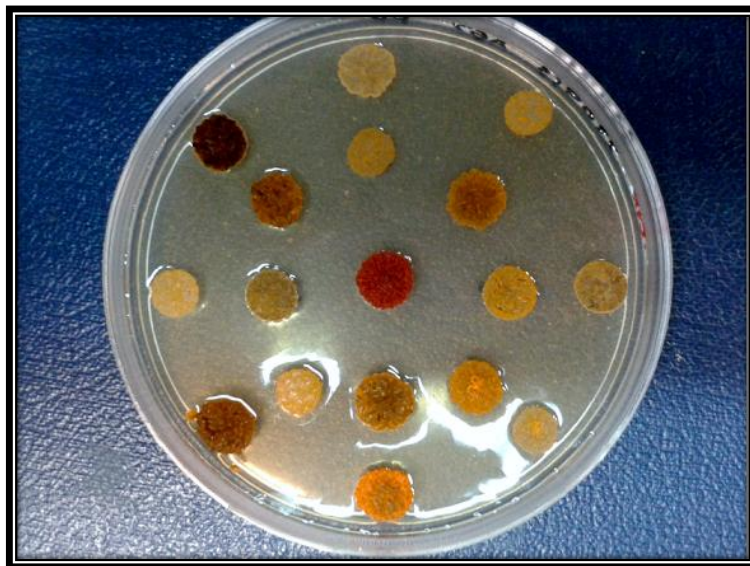


Figura 1. Colonias del género *Micromonospora* a los nueve días de siembra en medio GYM. Nótese la variedad de colores que puede presentar cada colonia.

En comparación con aislados del género *Streptomyces*, el género *Micromonospora* presenta colonias pequeñas con micelio vegetativo de color amarillo o rosa y esporulan luego de mayor tiempo de incubación (Zhao *et al.*, 2004).

Una característica del género *Micromonospora*, es que poseen una pared celular de tipo II, el peptidoglicano contiene ácido meso-diaminopimérico (*meso*-DAP) y/o su derivado 3-hidroxi, ácido murámico, glicolil, arabinosa, xilosa y glicina. Los microorganismos de este género pueden utilizar distintas fuentes de carbono como la glucosa, maltosa, sacarosa y almidón; además algunas especies también utilizan D-xilosa, celobiosa, D-manosa y trehalosa (Goodfellow *et al.*, 1984).

El género ha sido aislado principalmente a partir de muestras de suelo, pero cada vez se encuentran nuevas especies en diversos hábitats como ambientes acuáticos (lagos, lodos, sedimentos fluviales) (Leiva *et al.*, 2004; Thawai *et al.*, 2005; Maldonado *et al.*, 2008), arrozales del Japón (Ishizawa *et al.*, 1969), rocas areniscas de la Antártida (Hirsch *et al.*, 2004), en ambientes marinos como arenas de playa o sedimentos de las profundidades y en esponjas marinas (Zhao *et al.*, 2004, 2006).

2.3. *Candida*: CARACTERÍSTICAS GENERALES Y PATOGENICIDAD.

El género *Candida* comprende hongos Gram positivos, unicelulares también llamados levaduras. El género está constituido por un gran número de especies (cerca de 150 especies descritas). Las células se caracterizan por tener un tamaño de 2 a 4 μm , de forma variada incluyendo formas globosas, ovoides, cilíndricas, alargadas, raramente puntiagudas, ojivales, o en forma de botella. La reproducción se realiza, normalmente, por yemas multilaterales y presentan un pseudomicelio bien desarrollado, rudimentario o ausente. No existe pigmentación visible dada la ausencia de pigmentos carotenoides. Pueden formar polisacáridos extracelulares, los cuales dan coloración verde a púrpura al reaccionar con el yodo. La fermentación de azúcares puede darse o no (Cárdenas-Perera, 2000; Enache-Angoulvant, 2007).

Las levaduras del género *Candida* son agentes oportunistas que causan infecciones superficiales y profundas, la especie más significativa por su importancia clínica es *C.*

albicans. Otras especies frecuentemente encontradas en patología humana son, por orden de frecuencia: *C. glabrata* (antiguamente *Torulopsis glabrata*), *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* y *C. krusei* (Enache-Angoulvant, 2007).

Las candidiasis más frecuentes son digestivas, genitales y cutáneo-fanerales. Sus aspectos clínicos más clásicos respectivamente son muguet, vulvovaginitis, intertrigo y onicomicosis. *C. albicans* es el agente más frecuentemente implicado, pero la prevalencia de las candidiasis por *Candida* no *albicans* está en aumento (Enache-Angoulvant, 2007).

Por otra parte, durante las recientes dos décadas, las infecciones nosocomiales por hongos se han incrementado; se considera que la incidencia de infecciones micóticas en las unidades de cuidados intensivos es de 5% y, alrededor del 80% de estas infecciones son producidas por *Candida*. Algunos estudios muestran que la candidiasis es la cuarta causa de infección nosocomial en Estados Unidos y muy probablemente también en el resto del mundo. De hecho, la incidencia reportada en ese país corresponde a 10 casos por 100 mil; sin embargo, se reporta un incremento en la incidencia de hasta 487% durante las dos décadas anteriores. Además, la tasa de mortalidad de pacientes con candidiasis relacionada con catéteres alcanza hasta el 40% (Pérez-Gavilán, 2003; Chávez *et al.*, 2007).

2.4. METABOLITOS SECUNDARIOS.

2.4.1. GENERALIDADES DE LAS RUTAS BIOSINTÉTICAS: NRPS Y PKS.

Todos los metabolitos secundarios son producidos por unas pocas vías biosintéticas comunes (Eisfeld, 2009). En el caso de los microorganismos, los metabolitos secundarios mejor conocidos son los antibióticos y según los complejos de enzimas involucradas en su biosíntesis pueden ser del tipo péptidos no ribosomales (NRPS) y policétidos (PKS) (Keller *et al.*, 2005).

Estas versátiles multi-enzimas actúan como líneas de ensamblaje molecular para la producción de péptidos y policétidos altamente complejos. Ambos grupos de metabolitos secundarios son de importancia farmacológica y se piensa que cubren diversas

funciones biológicas en su ecosistema (Jenke-Kodama y Dittmann, 2009).

Las NRPSs son enzimas multimodulares, donde cada módulo es requerido para catalizar un ciclo simple de elongación del producto y modificación del grupo funcional. El número y orden de los módulos y de los tipos de dominios presentes en él determinan la variación estructural del péptido resultante. El set mínimo de los dominios requeridos para un ciclo de elongación consisten en un módulo con A (adenilación), P (pantotenilación/ portador peptidil), C (condensación/formación de enlaces peptídicos), y TE (tioesterasa) (Keller *et al.*, 2005). Una característica única del sistema NRPSs es la habilidad de sintetizar péptidos proteino-génicos, así como, amino ácidos no proteino-génicos. Los péptidos no ribosomales pertenecen a la familia de productos naturales complejos construidos a partir de monómeros de aminoácidos simples. Son sintetizados en varias bacterias y hongos (Eisfeld, 2009). En algunos casos estas enzimas trabajan en conjunto con las policétido sintasas (PKS) dando productos híbridos. Los productos de estas enzimas multifuncionales son compuestos farmacéuticos muy importantes como la ciclosporina y gramicidina (Keller *et al.*, 2005).

Los policétidos son metabolitos secundarios biosintetizados por complejos enzimáticos denominados policétido sintasas (PKSs) (Cane *et al.*, 1998; Menzella *et al.*, 2005). La biosíntesis inicia con la construcción de una cadena carbonada originada por la condensación de unidades de ácidos carboxílicos. Las unidades de construcción pueden ser de acetato, propionato o butirato, donde cada una se ensambla de tal forma que proporciona dos átomos de carbono a la estructura final. Una característica de esta familia es la presencia del carbono dos en el grupo ceto; algunos grupos ceto son reducidos a hidroxilos o eliminados por descarboxilación durante el proceso de condensación. Finalmente, la cadena policetónica sufre ciclación y modificaciones post-PKSs. Debido a las similitudes de los mecanismos entre las ácido graso sintetetasas (FAS) y las policétido sintetetasas (PKSs), éstas se clasifican según la nomenclatura de los tipos de FAS, con algunas modificaciones adicionales según sea necesario (Hopwood, 2004; Hopwood y Sherman, 1990).

2.4.2. TIPOS DE PKSs.

PKSs tipo I: están integradas por varias proteínas multifuncionales, cada una con diferentes dominios catalíticos colocados en el orden correcto en que van a ser utilizados para la elongación de la cadena policetónica (Cortés *et al.*, 1990; Donadio *et al.*, 1991; Aparicio *et al.*, 1996).

PKSs tipo II: formadas por un complejo multienzimático compuesto por varias proteínas que actúan reiteradamente para originar la cadena policetónica; son responsables de los compuestos cíclicos aromáticos (Moore y Hopke, 2001; Saxena y Yadav, 2003).

Además de la diferencia estructural que existe entre las PKSs tipo I y tipo II, el grado de complejidad genético entre ellas también es distinto. Mientras que las PKSs tipo II se encuentran codificadas en pocos miles de nucleótidos en el genoma, las PKSs tipo I son extremadamente complejas, llegando a ocupar varias decenas de miles de nucleótidos con unidades secuenciales repetidas en el gen que dan lugar a una organización conocida como modular (Sanz, 2005).

PKSs tipo III: son un grupo de proteínas homodiméricas, dentro de éstas se ubica la familia de las chalconas sintetasas (CHS); son encontradas principalmente en plantas y recientemente encontradas en bacterias (Moore y Hopke., 2001; Saxena y Yadav, 2003).

2.4.3. PKSs TIPO I: ORGANIZACIÓN GENÉTICA.

Las actividades asociadas a una PKSs tipo I se encuentran distribuidas a lo largo de un número de polipéptidos multifuncionales variables que están compuestos por diferentes dominios catalíticos (ver Figura 2). A diferencia del modo de acción de las PKSs tipo II, donde cada proteína actúa de manera reiterada en diferentes puntos de la elongación de la cadena policetónica, en las PKSs tipo I existen tantos dominios catalíticos (KS, AT y ACP) como módulos de elongación necesarios para constituir la cadena policetónica (Sanz, 2005).

Los dominios catalíticos KS, AT y ACP, son necesarios para la biosíntesis de la cadena policetónica y forman una asociación invariable; los dominios catalíticos KR, DH y ER

pueden estar presentes dependiendo del grado de reducción de la cadena policetónica. Cuando el dominio de reducción presente es KR, se originarán grupos hidroxilo; grupos enoilo cuando los dominios presentes sean KR y DH; y grupos C-C reducidos cuando estén presentes los tres dominios funcionales. Si no existe ninguno de los anteriores dominios catalíticos de reducción lo que aparece en la cadena policetónica son grupos ceto (Figura 2). El orden de los dominios catalíticos dentro de cada módulo es: KS, AT, (DH, ER, KR cuando existan) y ACP, exactamente igual que para las FAS de animales (Wakil, 1989).

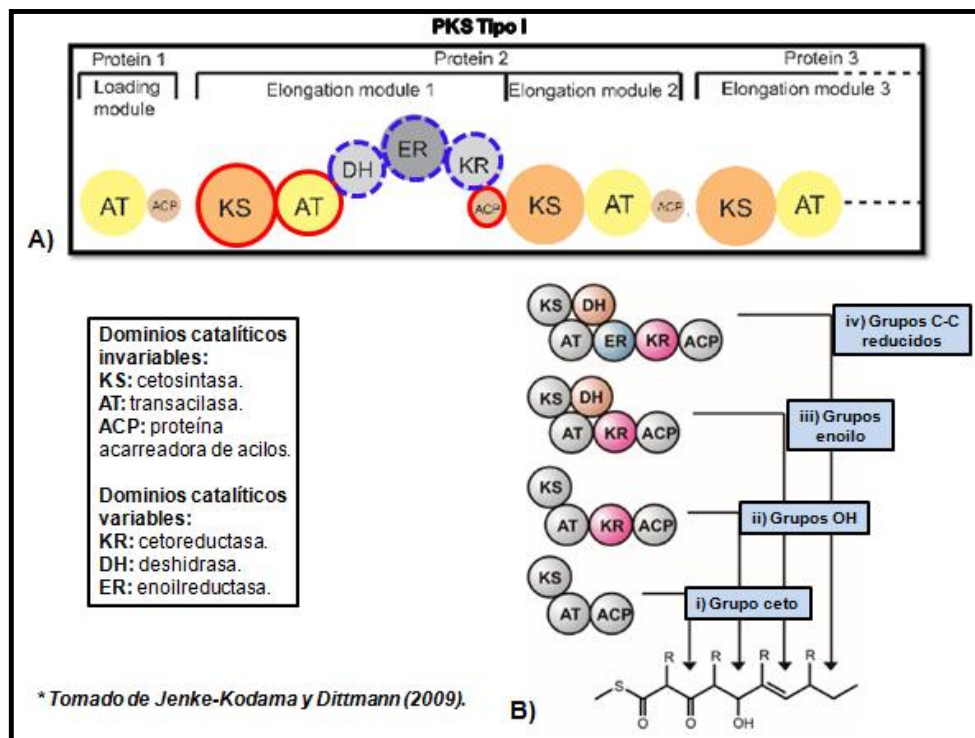


Figura 2. Representación esquemática de una ruta PKSs tipo I. **A)** Organización modular; cada módulo formado por dominios enzimáticos (KS, AT, ACP, KR, DH Y ER) necesarios para la elongación de la cadena. Los dominios invariables (KS, AT y ACP) para la síntesis de la cadena policetónica se muestran encerrados en rojo por una línea continua. Los dominios catalíticos variables (KR, DH y ER) se muestran encerrados en azul por una línea discontinua. **B)** Dependiendo de los dominios catalíticos variables presentes, el grado de reducción de la cadena policetónica puede variar, así pues, **i)** cuando no existe ningún dominio variable, aparecen grupos ceto; **ii)** si está presente el dominio KR, se originarán grupos hidroxilo; **iii)** grupos enoilo cuando los dominios presentes sean KR y DH; **iv)** y grupos C-C reducidos cuando estén presentes los tres dominios.

El polipéptido encargado de tomar la unidad iniciadora de la ruta biosintética está formado por el módulo de “carga” y presenta naturalezas muy diversas. En el caso de los macrólidos polienos, puede encontrarse aislado del resto de los polipéptidos multifuncionales, como en el caso de la nistatina (Brautaset *et al.*, 2000), anfotericina

(Caffrey *et al.*, 2001), pimaricina (Aparicio *et al.*, 1999 y 2000), rimocidina y CE-108 (Seco *et al.*, 2004); o asociado a módulos de elongación, como en el caso de la candicidina (Campelo y Gil, 2002) y rapamicina (Schwecke *et al.*, 1995).

La PKSs implicada en el último módulo de elongación suele presentar en su extremo C-terminal un dominio tioesterasa (TE), el cual se encarga de hidrolizar el enlace entre la cadena policetónica ya formada y el brazo 4'-fosfopantoteína del último dominio ACP. Además de esta actividad enzimática tioesterasa integrante de una PKSs, existen otras proteínas tioesterasas independientes cuya función es corregir aquellos errores que se pueden producir durante el ensamblaje de la cadena (Kotowska *et al.*, 2002).

Entre las secuencias de nucleótidos que codifican para estas PKSs, existe un alto grado de conservación que ha permitido identificar una serie de motivos altamente conservados para cada uno de los dominios catalíticos que las constituyen. La secuencia conservada para los dominios KS es GPXXXXTACSS en torno al residuo cisteína del centro activo (Bevitt *et al.*, 1992; Aparicio *et al.*, 1996). Existen además, dos residuos histidina conservados a 135 y 173 nucleótidos del centro activo del dominio KS, en dirección al extremo C-terminal; dichos residuos histidina están siempre presentes, tanto en PKSs tipo I como en tipo II (Aparicio *et al.*, 1996). Respecto al dominio KS del módulo de “carga” de las PKSs de macrólidos polienos, normalmente éste presenta una sustitución del aminoácido cisteína (KSc) del centro activo por el aminoácido serina (KSs) (Aparicio *et al.*, 1999; Brautaset *et al.*, 2000; Caffrey *et al.*, 2001). Al principio, se pensó que dicha sustitución hacía que el dominio KSs fuese inactivo (Aparicio *et al.*, 1999) pero más tarde se le asoció una posible actividad decarboxilasa (Brautaset *et al.*, 2000; Aparicio *et al.*, 2000).

Aparte de las actividades enzimáticas englobadas dentro de las PKSs y que son responsables de la elongación y posterior ciclación de la cadena policetónica, existen una serie de enzimas que una vez sintetizada la estructura básica del policétido se encargan de introducir una serie de modificaciones post-PKSs contribuyendo así, a ampliar la variabilidad de estructuras químicas. Dentro de estas modificaciones destacan las producidas por el citocromo P450 monooxigenasas y el grupo de enzimas de las transferasas que pueden transferirle a la cadena diferentes grupos funcionales

(glicosiltransferasas, metiltransferasas, acetiltransferasas, aminotrasferasas, amidotrasferasas) (O'Keefe *et al.*, 1991; Weber *et al.*, 1991; Haydock *et al.*, 1995; Mólnar *et al.*, 1996; Aparicio *et al.*, 2000; Brautaset *et al.*, 2000).

2.4.4. CLASIFICACIÓN DE POLICÉTIDOS.

La diversidad de los policétidos (PKS) depende de cuatro factores: el tipo de policétido precursor, las unidades de iniciación y extensión, el número de unidades ensambladas y las modificaciones posteriores del precursor; pueden ser:

Policétidos aromáticos: son compuestos con estructuras químicas muy diversas que presentan un anillo aromático y todos ellos son sintetizados por PKSs tipo II. Algunos ejemplos son: actinorrudina y urdanimicina (Hranueli *et al.*, 2001).

Policétidos poliéteres: son moléculas lineales formadas a partir de una unidad iniciadora de acetato por condensación de unidades metil-malonato o etil-metil-malonato. Son sintetizados por PKSs tipo I. La monencina A es un antibiótico representante de este grupo.

Macrólidos: se caracterizan por presentar en su estructura un anillo macrocíclico cerrado por lactonización al ciclarse la cadena policetónica correspondiente (Omura y Tanaka, 1984). Son sintetizados por PKSs tipo I y se clasifican en:

Macrólidos no polienos: presentan grupos metilo e hidroxilo y se caracterizan por carecer de dobles enlaces conjugados en el anillo macrocíclico. Algunos ejemplos son: la picomicina, la eritromicina, nifimicina y guanidilfungina (Takesako y Beppu, 1985; Nakayama *et al.*, 2002).

Macrólidos polienos: se caracterizan por la presencia de dobles enlaces conjugados (cromóforos) en el anillo macrocíclico, presentan un azúcar unido al anillo macrocíclico por un enlace glucosídico. El número de átomos de carbono que constituyen el anillo macrocíclico varía de 20 a 44. La actividad de los macrólidos polienos suele ser fungicida, algunos ejemplos: nistatina, pimarcina, anfotericina B y candicidina (Aparicio *et al.*, 1999; Caffrey *et al.*, 2001; Campelo y Gil, 2002).

2.4.5. CANDICIDINA.

La candicidina es un antifúngico, macrólido polieno heptaeno, descrito por Lechevalier y colaboradores en 1953. Es insoluble en agua, soluble en dimetil-sulfóxido, dimetil-formamida, y ácidos alifáticos suaves; es inestable en preparaciones acuosas. La obtención de candicidina pura es difícil y sólo aquella pura, puede ser cristalizada (Lechevalier *et al.*, 1953).

Este antifúngico es producido por la cepa de *Streptomyces griseus* IMRU3570; en evaluaciones de la actividad *in vitro*, la candicidina inhibe el crecimiento de un gran número de hongos, en especial de *Botrytis cinerea*, *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans*, *Microsporium audouini*, *Sporotrichum schenckii* y *Trichophyton rubrum* (Lechevalier, 1960; Waksman *et al.*, 1965).

Comparando la actividad antifúngica de la candicidina y la nistatina frente a *C. albicans*, se encontró que la primera tiene un 100% de efectividad mientras que la segunda tan sólo un 60%, demostrando que la candicidina posee un gran potencial para el tratamiento de infecciones por hongos (Waksman *et al.*, 1965).

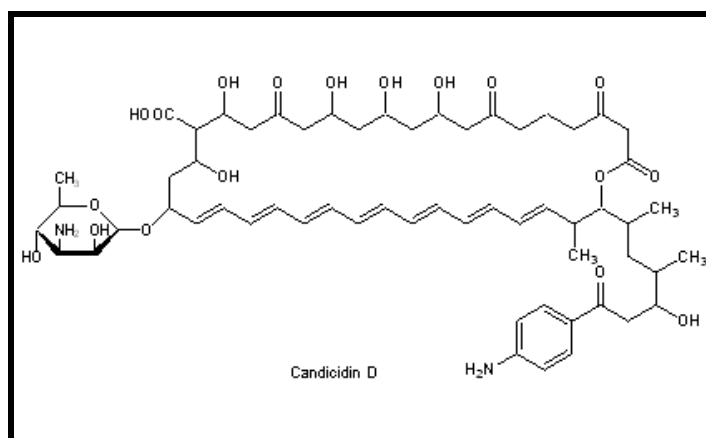


Figura 3. Estructura química de la Candicidina D.

2.4.6. CLÚSTER DE SÍNTESIS DE CANDICIDINA.

El estudio de la biosíntesis de los policétidos ha sido facilitado por los trabajos moleculares en las PKSs. En los microorganismos los genes que codifican para las rutas del metabolismo secundario, usualmente se encuentran agrupados en clústers que

contienen módulos reguladores y sistemas de transporte específicos para cada ruta biosintética. El análisis genético de los clústers implicados en la biosíntesis de los policétidos puede llevar al descubrimiento de nuevos compuestos en las cepas productoras (McAlpine *et al.*, 2005); además los módulos pueden ser modificados, reacomodados, insertados o borrados, así que la estructura del policétido puede ser modificada específicamente (Gil y Campelo, 2003; Challis, 2008).

El primer clúster genético secuenciado y caracterizado para una PKSs del tipo I se realizó para la biosíntesis de eritromicina en *Saccharopolyspora erythraea*, y se utilizó como el sistema modelo para la síntesis de policétidos, además representa el primer ejemplo de modificación genética en un complejo PKSs (Cortes *et al.*, 1990; Donadio *et al.*, 1991). A partir de entonces, la ingeniería genética ha producido numerosos derivados de antibióticos bien conocidos a través de la manipulación de los sistemas PKSs y NRPSs (Baltz, 2006).

Entre otros trabajos en los que se han caracterizado los clústers de genes biosintéticos se encuentran los realizados por Aparicio *et al.* (1999, 2000), quienes evaluaron el clúster biosintético de la piramicina. Brautaset *et al.* (2000) trabajaron con el clúster de síntesis de la nistatina. En ambos casos, una PKSs del tipo I resultó involucrada en la síntesis del anillo macrolactónico.

Campelo y Gil (2002) realizaron un análisis de secuencias de ADN lo que permitió la identificación del clúster biosintético involucrado en la síntesis de candicidina en *Streptomyces griseus* IMRU 3570. Más adelante describieron la síntesis de candicidina en el mismo microorganismo, se identificaron parte de los genes modulares de la PKSs, genes para la tioesterasa (TE), la biosíntesis de deoxiazúcares, proteínas de modificación, transporte y de regulación (Gil y Campelo, 2003).

Chen y colaboradores (2003), caracterizaron un clúster biosintético de un complejo poliénico denominado FR-008 a partir del genoma de *Streptomyces* spp. FR-008, debido a su gran similitud con el clúster de candicidina parcialmente caracterizado en *Streptomyces griseus* IMRU3570, especialmente los genes involucrados en la biosíntesis de la micosamina, los impulsó a comparar ambos compuestos y encontraron que el

complejo del compuesto FR-008 y el de la candicidina eran idénticos (Tabla I).

Tabla I. Función sugerida de los marcos abiertos de lectura (ORFs) identificados en el clúster génico del metabolito secundario FR-008 y su comparación con los genes de otras rutas metabólicas para la síntesis de polienos*.

| FR-008 | | | Genes homólogos en otras rutas de polienos | | | |
|----------------------|--------------------------------|-------------------------------------|--|------------------|--------------|-----------------|
| Gen /aa No. | Producto | Función sugerida | Nys | Amph | Pim | Can |
| <i>pabAB/723</i> | ADC synthase | biosynthesis of starter unit PABA | - | - | - | <i>pabAB</i> |
| <i>pabC/257</i> | ADC lyase | biosynthesis of starter unit PABA | - | <i>orf2</i> | - | - |
| <i>fscO/458</i> | FAD-dependent monooxygenase | putative tailoring enzyme | - | - | - | - |
| <i>fscA/1,743</i> | type I PKS | loading module and module 1 | <i>nysA</i> | <i>amphA</i> | <i>pimS0</i> | <i>canP1</i> |
| <i>fscB/5541</i> | type I PKS | modules 2-4 | <i>nysB</i> | <i>amphB</i> | <i>pimS1</i> | <i>canP2</i> |
| <i>fscC/10,625</i> | type I PKS | modules 5-10 | <i>nysC</i> | <i>amphC</i> | <i>pimS2</i> | <i>canP3(P)</i> |
| <i>fscD/9550</i> | type I PKS | modules 11-16 | <i>nysI</i> | <i>amphI</i> | <i>pimS3</i> | <i>canPF(P)</i> |
| <i>fscE/7771</i> | type I PKS | modules 17-20 | <i>nysJ</i> | <i>amphJ</i> | <i>pimS4</i> | - |
| <i>fscF/2049</i> | type I PKS | modules 21 + TE | <i>nysK</i> | <i>amphK</i> | - | - |
| <i>fscR/222</i> | transcriptional regulator | regulation | <i>orf4</i> | - | - | - |
| <i>fscR/II/942</i> | transcriptional regulator | regulation | <i>nysR/III</i> | - | - | <i>orf1(P)</i> |
| <i>fscR/III/1036</i> | transcriptional regulator | regulation | <i>nysR/II</i> | - | - | <i>orf2</i> |
| <i>fscR/IV/1005</i> | transcriptional regulator | regulation | <i>nysR/I</i> | - | - | <i>orf3</i> |
| <i>fscM/458</i> | glycosyltransferase | attachment of mycosamine | <i>nysD/I</i> | <i>amphD/I</i> | <i>pimK</i> | <i>canG</i> |
| <i>fscM/II/352</i> | GDP-ketosugar aminotransferase | mycosamine biosynthesis | <i>nysD/II</i> | <i>amphD/II</i> | <i>pimC</i> | <i>canA</i> |
| <i>fscM/III/402</i> | GDP-mannose-4, 6-dehydratase | mycosamine biosynthesis | <i>nysD/III</i> | <i>amphD/III</i> | <i>pimJ</i> | <i>canM(P)</i> |
| <i>fscP/393</i> | cytochrome P450 monooxygenase | formation of carboxyl group at C-18 | <i>nysN</i> | <i>amphN</i> | <i>pimG</i> | <i>canC</i> |
| <i>fscFE/64</i> | ferredoxin | electron transfer in P450 system | <i>nysM</i> | <i>amphM</i> | <i>pimF</i> | <i>canF</i> |
| <i>fscTE/285</i> | type II thioesterase | removal of aberrant intermediates | <i>nysE</i> | - | <i>pimI</i> | <i>canT</i> |
| <i>fscT/335</i> | ABC transporter | efflux of FR-008 | <i>nysG</i> | <i>amphG</i> | <i>pimA</i> | <i>canRA</i> |
| <i>fscT/II/239</i> | ABC transporter | efflux of FR-008 | <i>nysH</i> | <i>amphH</i> | <i>pimB</i> | <i>canRB</i> |

Nys: nistatina. Amph: anfotericina. Pim: pimarcina. Can: candicidina.

*Tomado de Chen *et al.*, 2003.

Ayuso y Genilloud (2005), desarrollaron primers degenerados para la detección y amplificación de sistemas NRPSs y PKSs tipo I para actinomicetos. El análisis de las secuencias de los productos amplificados reveló una amplia riqueza de estos sistemas en el genoma de diversas familias representativas de los actinomicetos; e incluso varias de las secuencias de los compuestos bioactivos encontradas no han sido identificadas hasta la fecha. En este estudio, los primers degenerados para la identificación de sistemas PKSs tipo I, permitieron observar regiones conservadas para los dominios cetosintasa (KS) y transacilasa (AT), lo que permitió la generación de los primers específicos: K1F (5'-TSAAGTCSAACATCGGBCA-3') y M6R (5'-TACTGGTACSGSAACC TGCG-3') respectivamente, para estas regiones.

Un estudio sobresaliente, fue realizado por Jørgensen *et al.* (2009), quienes evaluaron una gran cantidad de muestras de *Streptomyces*, colectadas en un fiordo en Noruega. Las muestras presentaron actividad antifúngica, revelando que la mayoría de los

aislados producían candicidina D. Se realizaron análisis genéticos y se encontró que las muestras con producción de este metabolito estaban relacionadas genéticamente; además se analizó la presencia del clúster de candicidina utilizando sondas y primers específicos para la identificación de genes *can*. Los resultados arrojaron que los organismos colectados en el fiordo que presentaban actividad antifúngica frente a *C. albicans*, contaban con el clúster de candicidina identificado anteriormente en *Streptomyces griseus* IMRU 3570. Además se demostró que el gen *pabAB*, el cual se encarga de la biosíntesis de la unidad iniciadora para la candicidina, es altamente conservativo a diferencia del gen *canP3* que codifica para PKSs, las cuales se pueden encontrar en muchas otras rutas biosintéticas (Jørgensen *et al.*, 2009).

2.4.7. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA DE METABOLITOS SECUNDARIOS DEL TIPO MACRÓLIDOS EN ORGANISMOS DEL GÉNERO *Micromonospora*.

En el caso del género *Micromonospora*, se ha reportado una bioactividad importante frente a muestras clínicas de *C. albicans* y de otras especies de *Candida* (Maldonado, sin publicar, PAPIIT IN212011), lo anterior permite suponer la presencia del clúster de síntesis de candicidina en aislados marinos de éste género, sin embargo, no existen reportes a la fecha dónde se evalúe su presencia o ausencia. Una vez conocida la estructura modular de la PKSs involucrada en la síntesis de candicidina y otros antibióticos polienos como la piramicina, nistatina y anfotericina B, es posible su evaluación en aislados marinos del género *Micromonospora* empleando oligonucleótidos específicos que amplifican éstos clústers biosintéticos, aunque cabe señalar que los oligonucleótidos fueron diseñados para aislados terrestres (Ayuso y Genilloud, 2005).

En la Tabla II se muestra una revisión bibliográfica de compuestos bioactivos aislados a partir de organismos de género *Micromonospora*, así como los organismos frente a los cuales se ha probado su actividad biológica.

Tabla II. Revisión bibliográfica de metabolitos secundarios del tipo macrólidos en organismos del género *Micromonospora*.

| Cita | Organismo | Compuesto | Actividad |
|--|---|------------------------------|--|
| Weinstein <i>et al.</i> , 1969; Waitz <i>et al.</i> , 1969. | <i>M. megalomicea</i> | Megalomicin (macrólido) | Actividad antibiótica frente a: <i>Bacillus megaterium</i> <i>Bacillus subtilis</i> <i>Diplococcus pneumoniae</i> 2 <i>D. pneumoniae</i> de ojo <i>Enterococcus</i> spp. 802 <i>Enterococcus</i> spp. 804 <i>Escherichia coli</i> <i>E. coli</i> 10536 <i>Klebsiella pneumoniae</i> <i>K. pneumoniae</i> 10031 <i>Mycobacterium smegmalis</i> <i>Proteus vulgaris</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i> 8689 <i>Salmonella schottmuelleri</i> <i>Sarcina lutea</i> <i>Staphylococcus aureus</i> <i>S. aureus</i> 41 <i>S. aureus</i> Gray <i>S. aureus</i> Smith <i>S. aureus</i> W <i>Streptococcus faecalis</i> <i>Streptococcus pyogenes</i> C 203 <i>S. pyogenes</i> 22 <i>S. pyogenes</i> 9 <i>S. pyogenes</i> C |
| Wagman <i>et al.</i> , 1972; Iizaka <i>et al.</i> , 2013. | <i>M. rosaria</i> | Rosamicina (macrólido) | Actividad antibiótica frente a: <i>Aerobacter aerogenes</i> <i>D. pneumoniae</i> <i>Enterococcus</i> spp. <i>E. coli</i> <i>K. pneumoniae</i> <i>Mycoplasma gallisepticum</i> <i>Proteus</i> spp. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>S. schottmuelleri</i> <i>S. aureus</i> <i>S. pyogenes</i> |
| Hatano <i>et al.</i> , 1976. | <i>M. chalcea</i> <i>M. chalcea</i> var. <i>izumensis</i> | Juvenimicins (macrólidos) | Actividad antibiótica frente a: <i>Bacillus brevis</i> <i>Bacillus cereus</i> <i>B. subtilis</i> PCI 219 <i>E. coli</i> NIHJ <i>Micrococcus flavus</i> <i>Mycobacterium</i> sp. 607 <i>P. vulgaris</i> <i>P. aeruginosa</i> |

| | | | |
|-------------------------------|--------------------------------|------------------------------|--|
| | | | <i>S. lutea</i> <i>S. aureus</i> 209P |
| Marquez <i>et al.</i> , 1976. | <i>Micromonospora</i> sp. 1225 | Eritromicina (no polieno) | Antibacterial |
| Furumai <i>et al.</i> , 1977. | <i>M. capillata</i> sp. nov. | Complejo M-4365 (macrólidos) | Actividad antibiótica frente a: <i>Acholeplasma laidlawii</i> <i>B. subtilis</i> ATCC 6633 <i>E. coli</i> FE-216 <i>E. coli</i> K-12 <i>E. coli</i> NIHJ JC-2 <i>K. pneumoniae</i> <i>Mycoplasma pneumoniae</i> Mac <i>M. gallisepticum</i> KP-13 <i>M. gallisepticum</i> PG-31 <i>M. pulmonis</i> mA <i>P. aeruginosa</i> 87 <i>Proteus vulgaris</i> <i>P. aeruginosa</i> A3 <i>Salmonella typhimurium</i> <i>Sarcina lutea</i> ATCC 9341 <i>S. aureus</i> 209P JC-1 <i>S. aureus</i> B-56 <i>S. aureus</i> Smith <i>S. aureus</i> T-88 <i>Staphylococcus epidermidis</i> 10131 <i>S. epidermidis</i> Kawamura <i>S. faecalis</i> |
| Satoi <i>et al.</i> , 1980. | <i>M. griseorubida</i> | Micinamicina (macrólido) | Actividad antibiótica frente a: <i>B. subtilis</i> ATCC 6633 <i>Corynebacterium diphtheriae</i> <i>E. coli</i> NTHJ JC-2 <i>Haemophilus influenzae</i> 1346 <i>M. flavus</i> ATCC 10240 <i>P. aeruginosa</i> IAM 1095 <i>S. pneumoniae</i> NCTC 7465 (tipo 1) <i>S. lutea</i> ATCC 9341 <i>Shigella flexneri</i> <i>S. aureus</i> 0116 <i>S. aureus</i> 0119 <i>S. aureus</i> 0126 (Macr B) <i>S. aureus</i> 0127 <i>S. aureus</i> ATCC 6538P <i>S. aureus</i> MS 353 <i>S. aureus</i> MS 353 AO (Macr A) <i>S. aureus</i> MS 353 C-36 (Macr C) <i>S. epiderimis</i> sp-al-I <i>S. pyogenes</i> 1022 (Macr) <i>S. pyogenes</i> N.Y. 5 |

| | | | |
|--|---|--|---|
| Tomita y Tamaoki, 1980; Tamaoki <i>et al.</i> , 1980; Fang <i>et al.</i> , 2008. | <i>M. chalcea</i> KY11091. | Tetrocarina (macrólido) | Actividad antibiótica frente a: <i>B. subtilis</i> No. 10707 <i>S. aureus</i> ATCC6538P Citotóxico frente a Sarcoma 180 de ratón y leucemia P388 de ratón. |
| Omura <i>et al.</i> , 1986. | <i>Micromonospora echinospora</i> subsp. <i>armeniaca</i> subsp. nov. | Clostomicina, lipiarmicina (macrólido) | Actividad antibiótica frente a: <i>Acholeplasma laidlawii</i> PG8 <i>Bacillus subtilis</i> PCI 219 <i>Clostridium difficile</i> ATCC 9689 <i>Clostridium perfringens</i> ATCC 32624 <i>Micrococcus luteus</i> ATCC 9341 <i>M. smegmalis</i> ATCC 604 <i>S. aureus</i> FDA 209P <i>Xanthomonas oryzae</i> KB88 |
| Fernández-Chimeno <i>et al.</i> , 2000. | <i>Micromonospora</i> | IB-96212 (macrólido) | Actividad antibiótica frente a: <i>Micrococcus luteus</i> Actividad antitumoral frente a las células tumorales P-388 (ATCC CCL 46), A-549 (ATCC CCL 185), HT-29 (ATCC HTB-38) y MEL-28 (ATCCHTB-72) |
| Ohta <i>et al.</i> , 2001. | <i>Micromonospora</i> sp. | Micromonospolide A (macrólido) | Inhibición de la gastrulación en embriones de estrellas de mar. |
| Gärtner <i>et al.</i> , 2011. | <i>M. auratinigra</i> DSM 44815 | Levantilide A y B (macrólidos) | Actividad antiproliferativa frente a células tumorales gástricas GXF 251L, células tumorales de pulmón LXFL 529L, células tumorales de mama MAXF 401NL, melanoma MEXF 462NL, cáncer de páncreas PAXF 1657L y células tumorales de riñón RXF 486L. |
| Igarashi <i>et al.</i> , 2011. | <i>Micromonospora</i> sp. | Maclamicina (spiro-tetronato-clase policétido) | Actividad de moderada a fuerte frente a bacterias Gram positivas. |

2.5. JUSTIFICACIÓN.

La candicidina, un policétido macrólido polieno (heptaeno), es un antibiótico que presenta actividad antifúngica frente a *Candida albicans*, se ha demostrado su actividad a partir de *Streptomyces griseus* IMRU 3570, organismo a partir del cual, el clúster de síntesis de la candicidina ha sido bien caracterizado.

En aislados marinos del Golfo de California, presuntivamente del género *Micromonospora* (por sus características macroscópicas), también se ha reportado esta actividad, sin embargo, no se han realizado estudios en los que se evalúe la presencia o ausencia de este clúster. Por lo que, el presente proyecto permitirá evaluar el potencial (bioprospección) de estos microorganismos, permitiendo establecer un perfil de distribución de genes de candicidina en aislados marinos, situación que se desconoce. El análisis genético de los clústers implicados en la biosíntesis de los policétidos en este caso de la candicidina, podría resultar en el descubrimiento de rutas metabólicas idénticas o alternas a la cepa productora de origen terrestre.

2.6. PREGUNTAS DE INVESTIGACIÓN.

¿Se encuentra presente el clúster biosintético de candicidina en aislados del género *Micromonospora*?

¿Cuál es la distribución del clúster de candicidina en aislados marinos del género *Micromonospora*? ¿Presente en cualquier aislado o ausente?

¿Cómo se puede identificar éste clúster en nuevos aislados de la clase Actinobacteria para una rápida caracterización de productores de candicidina?

2.7. OBJETIVOS.

2.7.1. GENERALES:

- Evaluar la presencia del clúster biosintético de candicidina en los aislados marinos del género *Micromonospora* que presentan o no actividad antifúngica frente a distintas especies de *Candida*.

2.7.2. ESPECÍFICOS:

- Identificar los aislados marinos pertenecientes al género *Micromonospora*, mediante la observación de sus características morfológicas así como, mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizando los oligonucleótidos específicos diseñados para este fin.
- Establecer las condiciones óptimas para la evaluación de la actividad antifúngica en los aislados marinos del género *Micromonospora*.
- Evaluar cualitativamente la actividad antifúngica frente a distintas especies de *Candida* (*C. albicans* ATCC10231; *C. glabrata* CBS138; *C. albicans* No.146; *C. glabrata* No.148; *C. krusei* y *C. parapsilosis*).
- Determinar si los organismos evaluados pertenecientes al género *Micromonospora* cuentan con el clúster biosintético PKSs tipo I para la síntesis de candicidina, mediante la utilización de oligonucleótidos específicos diseñados para este fin a partir de aislados terrestres.
- Generar pruebas moleculares para la rápida caracterización de aislados productores de candicidina. Establecer la distribución del clúster de candicidina en aislados marinos del género *Micromonospora*.

2.8. HIPÓTESIS.

Los aislados marinos del género *Micromonospora* que presentan actividad antifúngica frente a las cepas patógenas de *Candida*, cuentan con el clúster biosintético PKSs tipo I para la síntesis de candicidina.

CAPÍTULO III:

MATERIALES Y MÉTODOS.

3.1. MICROORGANISMOS: CRECIMIENTO Y CONSERVACIÓN.

Los microorganismos de estudio corresponden a aislados nacionales recuperados de muestras marinas del Golfo de California; se evaluaron un total de 28 cepas, todas pertenecientes a la denominada serie RD. Los microorganismos se agruparon de acuerdo a sus características morfológicas para lo cual fueron sembrados en placas de agar con medio de cultivo GYM (Anexo I), se mantuvieron en incubación a 28°C durante 10 días. Posteriormente, se anotaron las características morfológicas como coloración, consistencia, aspecto, esporulación, color de la esporulación y crecimiento (Anexo II).

Para la conservación, los aislados de estudio se sembraron en placas de agar con el medio de cultivo GYM; se mantuvieron en incubación a 28-30°C durante un tiempo estimado de 7 a 10 días hasta que la biomasa fue suficiente. A partir de estas siembras, los microorganismos se recogieron con la ayuda de un asa de siembra estéril y se conservaron en 1 ml de suspensión de glicerol al 20% para su congelación. También se realizaron soluciones salinas al 9%, mismas que se emplearon como soluciones de trabajo.

3.2. EXTRACCIÓN DE ADN: EXTRACCIÓN FENÓLICA.

Para la extracción de ADN, los microorganismos fueron sembrados en placas de agar con medio de cultivo YEME (Anexo I); se mantuvieron en incubación a 28-30°C durante aproximadamente 10 días, hasta que la biomasa fue suficiente. Posteriormente, con ayuda de un asa de siembra estéril se tomó una muestra de cada cepa, la cual se colocó en un tubo ependorff con aproximadamente 0.1 ml de perlas de vidrio (BM50 Glass beads) y 500 µl de GTE (glucosa/tris/EDTA) y se dejaron en refrigeración toda la noche.

Para el siguiente paso, las muestras fueron sacadas de refrigeración y se sometieron a agitación continua en un vórtex durante 15 minutos a máxima velocidad; luego de este

tiempo se centrifugaron a 14 000 x g por 15 minutos. Se recuperó el sobrenadante (400µl aprox.) en otros tubos ependorff de 1.5 ml, se agregó una proporción igual al sobrenadante recuperado de fenol: cloroformo: alcohol isoamílico (25:24:1), se centrifugó a 14 000 x g durante 10 minutos. Nuevamente, se recuperó el sobrenadante (350µl aprox.) y se agregó una cantidad igual al sobrenadante de fenol: cloroformo: alcohol isoamílico, se centrifugó a 14 000 x g durante 10 minutos. Para precipitar las proteínas, se añadió a cada muestra del último sobrenadante recuperado (aproximadamente 300 µl), etanol al 100% en una proporción de 2:1 y se dejó en refrigeración toda la noche.

A continuación, las muestras se centrifugaron a 14 000 x g durante diez minutos. En algunas ocasiones se forma un botón visible en el fondo del tubo; por lo que se decantó con mucho cuidado.

Para lavar la pastilla de ADN (botón) se agregaron 200 µl de EtOH 70% y con la ayuda de una pipeta, se subió y bajó, hasta despegar la pastilla (es importante no tomar la pastilla con la punta); nuevamente las muestras se centrifugaron a 14 000 x g durante diez minutos y se decantaron. Este paso se realizó una vez más, luego de decantar, las muestras fueron colocadas con la tapa abierta en baño seco a 50 °C por dos horas.

Para resuspender el ADN se añadieron 50 µl de Buffer TE1X a cada muestra, se dieron unos ligeros golpes a los tubos cada quince minutos y nuevamente se colocaron en el baño seco durante una hora más; finalmente las muestras se refrigeraron hasta su próxima utilización.

3.3. REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR) PARA ACTINOBACTERIAS, FAMILIA *Micromonosporaceae* Y GÉNERO *Micromonospora*.

Para la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se emplearon los primers: ACT254 y ACT894 para la amplificación de un fragmento del gen 16S que codifica para actinobacterias. Se prepararon reacciones para PCR de 25 µl. Posteriormente, para la identificación de los aislados como miembros de la familia *Micromonosporaceae*, se realizó un segundo PCR empleando los primers selectivos desarrollados por Mociadrini *et al.* (2002): A3R [5'-CCAGCCCCACCTTCGAC-3'] y M2F [5'-SAGAAGAAGCGCCG

GC-3']. Se prepararon reacciones para PCR de 20 μ l. Finalmente, para la identificación de los aislados como miembros del género *Micromonospora* se emplearon los oligonucleótidos específicos diseñados por Qiu *et al.* (2008): M558F [5'-CGGCTTGTCG CGTCGACT-3'] y C1028R [5'-ATGCACCACCTGTGACCGC-3'], se utilizan estos primers ya que el gen 16S contiene regiones muy conservadas que permiten discriminar hasta nivel de género. Las reacciones para PCR fueron de 25 μ l (Tabla III).

Tabla III. Reactivos empleados para la PCR de actinobacterias, familia *Micromonosporaceae* y género *Micromonospora*.

| Reactivos | PCR Actinobacterias (25 μ l) | PCR familia <i>Micromonosporaceae</i> (20 μ l) | PCR género <i>Micromonospora</i> (25 μ l) |
|---------------------------|----------------------------------|--|---|
| H ₂ O para PCR | 20.975 μ l | 16.05 μ l | 20.1 μ l |
| Buffer 10x | 1.5 μ l | 2 μ l | 2.5 μ l |
| MgCl ₂ | 0.75 μ l | 0.6 μ l | 0.7 μ l |
| dNTPs | 0.825 μ l | 0.5 μ l | 0.75 μ l |
| Primer for. | 0.25 μ l | 0.2 μ l | 0.25 μ l |
| Primer rev. | 0.25 μ l | 0.2 μ l | 0.25 μ l |
| Taq polimerasa | 0.1 μ l | 0.1 μ l | 0.1 μ l |
| ADN | 0.35 μ l | 0.35 μ l | 0.35 μ l |

En los tres casos las muestras fueron amplificadas en un termociclador LabNet, bajo las siguientes condiciones:

Tabla IV. Condiciones utilizadas en el termociclador LabNet en los distintos PCRs.

| No. de ciclos | Actinobacterias | | Familia <i>Micromonosporaceae</i> | | Género <i>Micromonospora</i> | |
|---------------|-----------------|--------------|-----------------------------------|--------------|------------------------------|--------------|
| | T °C | Tiempo (min) | T °C | Tiempo (min) | T °C | Tiempo (min) |
| 1 | 95 | 7 | 95 | 7 | 95 | 7 |
| 35 | 95 | 1 | 95 | 1 | 95 | 1 |
| | 55 | 1 | 65 | 1 | 66 | 1 |
| | 72 | 1 | 72 | 1 | 72 | 1 |
| 1 | 72 | 10 | 72 | 10 | 72 | 10 |

3.4. IDENTIFICACIÓN DEL CLÚSTER PKS DE CANDICIDINA.

Para la identificación del clúster biosintético PKSs tipo I de candicidina en organismos del género *Micromonospora* se realizaron amplificaciones por PCR utilizando los

oligonucleótidos: K1F (5'-TSAAGTCSAACATCGGBCA-3') y M6R (5'-TACTGGTACSGS AACCTGCG-3'), desarrollados por Ayuso y Genilloud (2005), como se mencionó en los antecedentes, este par de oligonucleótidos detectan y amplifican de manera general, sistemas PKSs tipo I en actinomicetos. Se probaron tres distintas concentraciones de los reactivos (Tabla V) y dos condiciones distintas del termociclador (Tabla VI) para observar con cuál de ellas se lograba la amplificación de la banda esperada (1200–1400 pb).

Tabla V. Reactivos empleados en tres PCR's distintas para la amplificación de sistemas PKSs tipo I en organismos del género *Micromonospora*.

| Reactivos | PCR 1 | PCR 2 | PCR 3 |
|---------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|
| Buffer 10x | 2.5 µl | 2.5 µl | 2.5 µl |
| MgCl ₂ | 0.7 µl | 2.5 µl | 0.75 µl |
| dNTPs | 1.0 µl | 1.0 µl | 0.625 µl |
| Primer for. | 0.5 µl | 0.25 µl | 0.5 µl |
| Primer rev. | 0.5 µl | 0.25 µl | 0.5 µl |
| Taq polimerasa | 0.1 µl | 0.2 µl | 0.1 µl |
| ADN | 2.5 µl | 2.5 µl | 0.5µl |
| H ₂ O para PCR | Ajustar vol. final a 25 µl. | Ajustar vol. final a 25 µl. | Ajustar vol. final a 25 µl. |

Tabla VI. Condiciones utilizadas en el termociclador LabNet en los distintos PCR's para la amplificación de sistemas PKSs tipo I en organismos del género *Micromonospora*.

| No. de ciclos | PCR 1* y 2* | | PCR 3 | |
|---------------|-------------|--------------|-------|--------------|
| | T °C | Tiempo (min) | T °C | Tiempo (min) |
| 1 | 95 | 5 | 95 | 7 |
| 35 | 95 | 0.5 | 95 | 1 |
| | 55 | 2 | 55 | 1 |
| | 72 | 4 | 72 | 1 |
| 1 | 72 | 10 | 72 | 10 |

*Nota: las condiciones del termociclador empleadas en la PCR 1 y 2, son las descritas por Ayuso y Genilloud (2005).

Debido a que no ha sido posible la amplificación de alguna banda correspondiente a una PKSs tipo I, en los organismos de este estudio pertenecientes al género *Micromonospora*, se accedió al National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) y, utilizando las secuencias de los oligonucleótidos

diseñados por Ayuso y Genilloud (2005) y las secuencias de distintos pares de oligonucleótidos de seis de los genes que conforman el clúster de síntesis de candicidina (Tabla VII), se realizó una búsqueda en el banco de datos de GenBank, se realizó un BLASTn (nucleótidos) para cada par de cebadores, con el fin de identificar posibles correspondencias con las secuencias del género *Micromonospora* depositadas en la base de datos; cabe mencionar que en las opciones de búsqueda, ésta se restringió a organismos del género *Micromonospora* (Anexo III).

Tabla VII. Oligonucleótidos de seis genes que conforman el clúster de síntesis de candicidina.

| Gen | Oligonucleótidos [5' – 3'] |
|--------------|--|
| fscA | fscA for [ATGGTGCCCGTCCACGCACACGACTACGTGACCGATCCGC] fscA rev [GGCGGCCAGCACCTCGGCGACGGCGGTCACCACCAG] |
| fscM | fscM for [TCGCTGGGCGAGGTGGTCCCCGAACTGT] fscM rev [CGGCTTGTCCAGGGTCAGGCTGATGCCG] |
| fscP | fscP for [GGTTCTGGCCCAGGCACTGGTGGACGCCGTAGCC] fscP rev [ATGACGACCAGCCCCGGCCCGACGGTGGTCGACTTCCCAC] |
| pabAB | pabAB for [GTCGAGAGCGCCTTCCTGAC] pabAB rev [TGTCCGCCTCGGCCATGTTG] |
| canRA | canRA for [ACCGGCGTGCGAGCAGCTAC] canRA rev [GCCGGCCTGGTCCAGGCTTC] |
| canP3 | canP3 for [CGCACCAGACCGAGCATCAT] canP3 rev [GACGGCACGGTGGAACTACT] |

3.5. ELECTROFORESIS.

El empleo de la electroforesis es básico para la mayoría de las técnicas empleadas en este protocolo ya que permitió visualizar la integridad del ADN genómico obtenido mediante la extracción fenólica, después permitió observar los productos de PCR para Actinobacterias, PCR para familia Micromonosporaceae, identificar a los aislados pertenecientes al género *Micromonospora* (Figura 4), así como la detección de sistemas PKSs tipo I. La electroforesis en gel de agarosa (1%) se realizó de acuerdo a la siguiente serie de pasos.

En un frasco de 250ml se colocó un gramo de agarosa Multi-purpose molecular grade para 100 ml de TBE 0.5 x. Éste se colocó en el microondas hasta que la agarosa se disolvió completamente. En campana, se agregó 0.4 μ l de bromuro de etidio (BrEt) por cada 100 ml de agarosa, se mezcló suavemente y se dejó enfriar un poco.

Posteriormente, la agarosa fue vertida en la cámara preparada previamente con los peines. Se dejó polimerizar durante 20 minutos. Pasado este tiempo se retiraron los peines del gel (tener cuidado para no romper el gel) y se coló en la cámara para electroforesis con TBE al 0.5%.

La carga del gel se preparó mezclando, cuidadosamente, 3 μ l de buffer de carga (Loading Buffer) con 4 μ l de ADN de las distintas muestras. En cada pozo del gel se colocaron 6 μ l. Se colocó 1 μ l de marcador molecular (M) de aproximadamente 10 000 pb (BIOLINE) para tener una referencia del tamaño de los fragmentos separados.

La electroforesis se llevó a cabo a 75 V durante 30 minutos. Finalmente, para confirmar la presencia de las bandas esperadas en cada caso, el gel de agarosa fue visualizado en un transiluminador de luz ultravioleta y se realizó la foto-documentación del gel para observar cuales muestras corrieron y para futuras referencias.

3.6. ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA.

La evaluación de la actividad antifúngica se llevó a cabo empleando la técnica de inhibición del crecimiento en placas de agar Müeller-Hinton. Se observó la actividad inhibitoria de los distintos aislados del género *Micromonospora* frente a seis cepas patógenas de *Candida* (*C. albicans* ATCC10231; *C. glabrata* CBS138; *C. albicans* No.146; *C. glabrata* No.148; *C. krusei* y *C. parapsilosis*). Las cajas Petri fueron marcadas de tal forma que, de un lado se sembraron las muestras (*Micromonospora*) y en la otra mitad se sembraron las cepas patógenas (Figura 5).

Antes de comenzar el ensayo, se prepararon suspensiones salinas al 2 Mc-Farland que equivale a 6×10^8 UFC/ml, de los distintos aislados marinos y de las cepas patógenas de *Candida*. La escala de Mc-Farland sirve para estandarizar el ensayo, ya que permite realizar suspensiones bacterianas ajustadas a un patrón (de manera visual) y con ello se

puede determinar de forma aproximada la concentración de las suspensiones.

Las cepas de *Micromonospora* fueron sembrados en las placas de agar Müeller-Hinton, antes que las cepas de *Candida*, para permitir su crecimiento y la producción del metabolito secundario. Se colocaron 15 µl de las soluciones salinas antes mencionadas, se incubaron a una temperatura entre 28 y 30°C hasta que los microorganismos presentaron obscurecimiento del micelio vegetativo (esporulación); lo cual ocurrió para algunos microorganismos, a los quince días de incubación y otros a los veinticinco días.

Una vez observado el cambio en la coloración de los aislados marinos, las cepas patógenas fueron resembradas en medio BHI (infusión de cerebro corazón) y se incubaron por 24 horas a 30°C para preparar suspensiones salinas al 2 Mc-Farland. Con estas suspensiones, se sembraron 5 µl de cada cepa patógena en el lugar correspondiente (Figura 5). Finalmente, las cajas se incubaron por 24 horas a una temperatura entre los 28 y 30 °C y se evaluó la actividad. Como control negativo se sembraron las cepas patógenas sin la presencia de las muestras de *Micromonospora*.

La evaluación de la actividad se realizó de forma cualitativa, asignando el valor de cuatro (4) cuando el crecimiento de la cepa patógena fue totalmente inhibido por el aislado marino, el valor de tres (3) cuando se presentó una buena inhibición del crecimiento del patógeno pero no fue total, el valor de dos (2) cuando en comparación con el control el crecimiento del patógeno disminuyó pero poco y el valor de uno (1) cuando el patógeno creció igual que en el control negativo, es decir no hubo inhibición del crecimiento.

CAPÍTULO IV: RESULTADOS.

4.1. CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS DE LOS ORGANISMOS DE ESTUDIO.

Se realizó una tabla donde se enlistan los microorganismos de la serie RD, agrupados de acuerdo a sus características morfológicas observadas a los 10 días de incubación en medio GYM (Anexo II). De manera general, se observó la formación de 4 grupos de acuerdo con la coloración (1: naranja claro, 2: naranja medio, 3: naranja fuerte, y 4: blanco); a su vez, tomando en cuenta la consistencia (A: butirosa, B: suave y C: dura), se forman 9 subgrupos (1A, 1C, 2A, 2B, 2C, 3A, 3B, 3C y 4C).

Otras características que se observaron pero que no se tomaron en cuenta para la formación de los grupos fueron el aspecto del microorganismo (a: seco y b: húmedo), el crecimiento (A: abundante, R: regular, C: poco crecimiento), la esporulación (0: sin esporulación, 1: poca esporulación, 2: esporulación regular y 3: completamente esporulada) y el color de la esporulación. En la columna denominada *Micromonospora*, se marca con un asterisco los microorganismos que amplificaron en la PCR para la identificación de los aislados como miembros del género *Micromonospora*. El microorganismo perteneciente al grupo 4 (color blanco) con número de serie RD-51 corresponde presuntivamente al género *Streptomyces*.

4.2. IDENTIFICACIÓN DE LOS MICROORGANISMOS COMO PERTENECIENTES AL GÉNERO *Micromonospora*.

Para confirmar la identidad de los 28 microorganismos de estudio como miembros del género *Micromonospora*, se realizaron tres PCR; el primero, fue un PCR para la amplificación de un fragmento del gen 16S que codifica para Actinobacterias, el segundo un PCR para la familia *Micromonosporaceae* y finalmente, un PCR para género. Todas las muestras amplificaron para la identificación de los microorganismos como miembros de la clase Actinobacteria. En el caso de la identificación de los microorganismos como miembros de la familia *Micromonosporaceae*, varias muestras no arrojaron productos de

PCR de familia, sin embargo, algunos de estos microorganismos sí presentaron producto de PCR correspondiente al género *Micromonospora* (Figura 4), por lo que los organismos en esta situación fueron reevaluados para detectar si existió algún error en la realización de la reacción en cadena de la polimerasa, pero se obtuvieron los mismos resultados. Veintisiete organismos amplificaron en la PCR para género, solo la cepa con número de serie RD-51, no amplificó para este género (presuntivamente corresponde al género *Streptomyces*), sirviendo así como un control negativo.

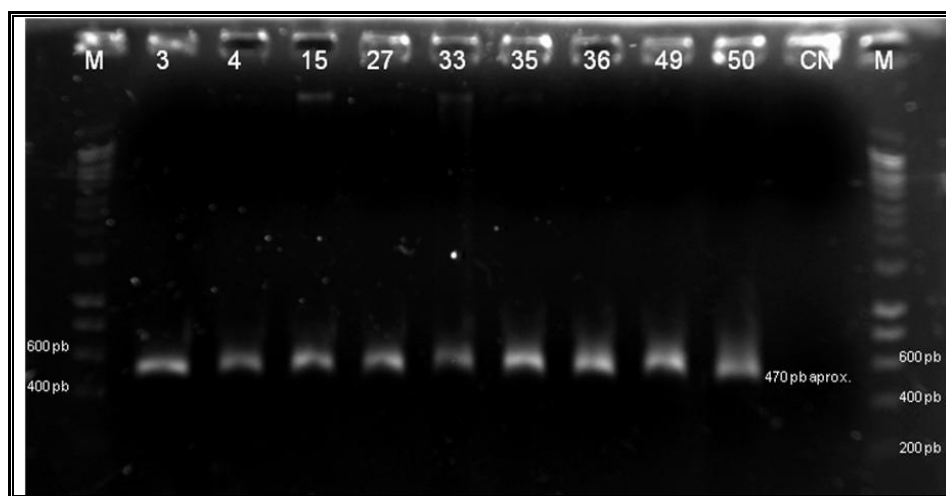


Figura 4. Ejemplo de productos de PCR para género *Micromonospora*.
M: marcador (10 000 pb aprox.). CN: control negativo.

4.3. IDENTIFICACIÓN DEL CLÚSTER DE CANDICIDINA EN *Micromonospora*.

Se probaron tres distintas condiciones de PCR utilizando los oligonucleótidos específicos diseñados para sistemas PKSs tipo I, desarrollados por Ayuso y Genilloud (2005), sin detectarse ningún producto de amplificación en los microorganismos probados.

Los resultados obtenidos en los BLASTn (nucleótidos), para cada par de secuencias de los distintos oligonucleótidos de diversos genes que conforman el clúster de síntesis de candicidina (Tabla VII); así como el BLASTn de las secuencias de los oligonucleótidos para sistemas PKSs tipo I, mostraron correspondencias con secuencias de organismos pertenecientes al género *Micromonospora*, en el Anexo III se muestran los porcentajes de identidad (similitud) y el valor esperado (e-value), obtenidos para las secuencias de los organismos que arroja el BLASTn en cada caso. Cabe mencionar que estos oligonucleótidos no fueron probados con los aislados marinos de este estudio.

4.4. EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA.

En la evaluación de los ensayos de la actividad antifúngica frente a distintas cepas patógenas de *Candida* (Figura 5), se observaron dos patrones de inhibición o modificación en el crecimiento de los patógenos, dependiendo del tiempo de incubación de las actinobacterias (15 y 25 días).

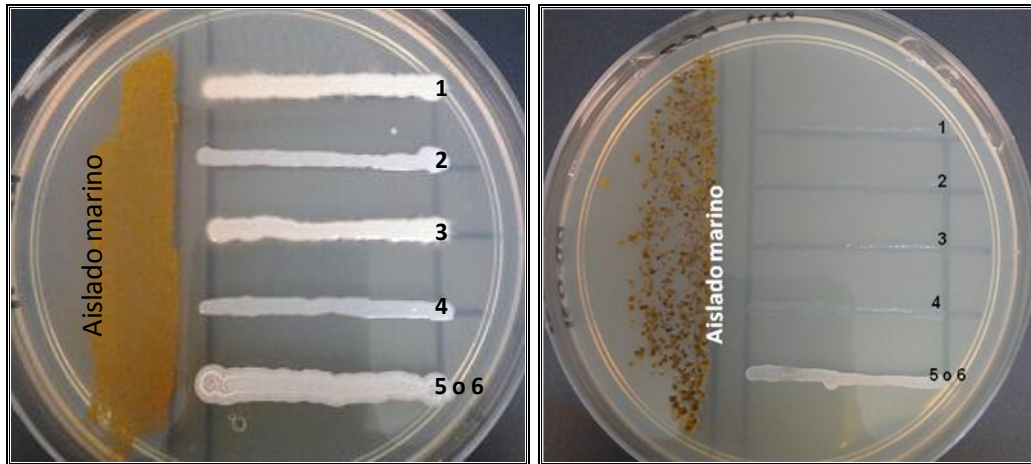


Figura 5. Ejemplo de la evaluación de la actividad frente a distintas cepas patógenas de *Candida*. 1: *C. albicans* ATCC10231; 2: *C. glabrata* CBS138; 3: *C. albicans* No.146; 4: *C. glabrata* No.148, 5: *C.krusei* y 6: *C. parapsilosis*.

De manera general, se observó que el 15% y 10% de los microorganismos incubados durante 15 días (20 microorganismos) presentaron una inhibición total (valor asignado de 4) frente a las cepas patógenas *C. albicans* ATCC10231 y *C. albicans* No.146, respectivamente. Frente a *C. krusei* y *C. parapsilosis* no se presentó inhibición total del patógeno, sin embargo, en ambos casos se observó un 30% de buena inhibición (valor asignado de 3). Por otra parte, el 90% y 95% de los microorganismos incubados presentaron una inhibición total del crecimiento de *C. glabrata* CBS138 y *C. glabrata* No.148, respectivamente; y un 10% y 5% de buena inhibición, respectivamente; siendo estas especies las más susceptibles a la actividad antifúngica por parte de los aislados marinos probados (Figura 6).

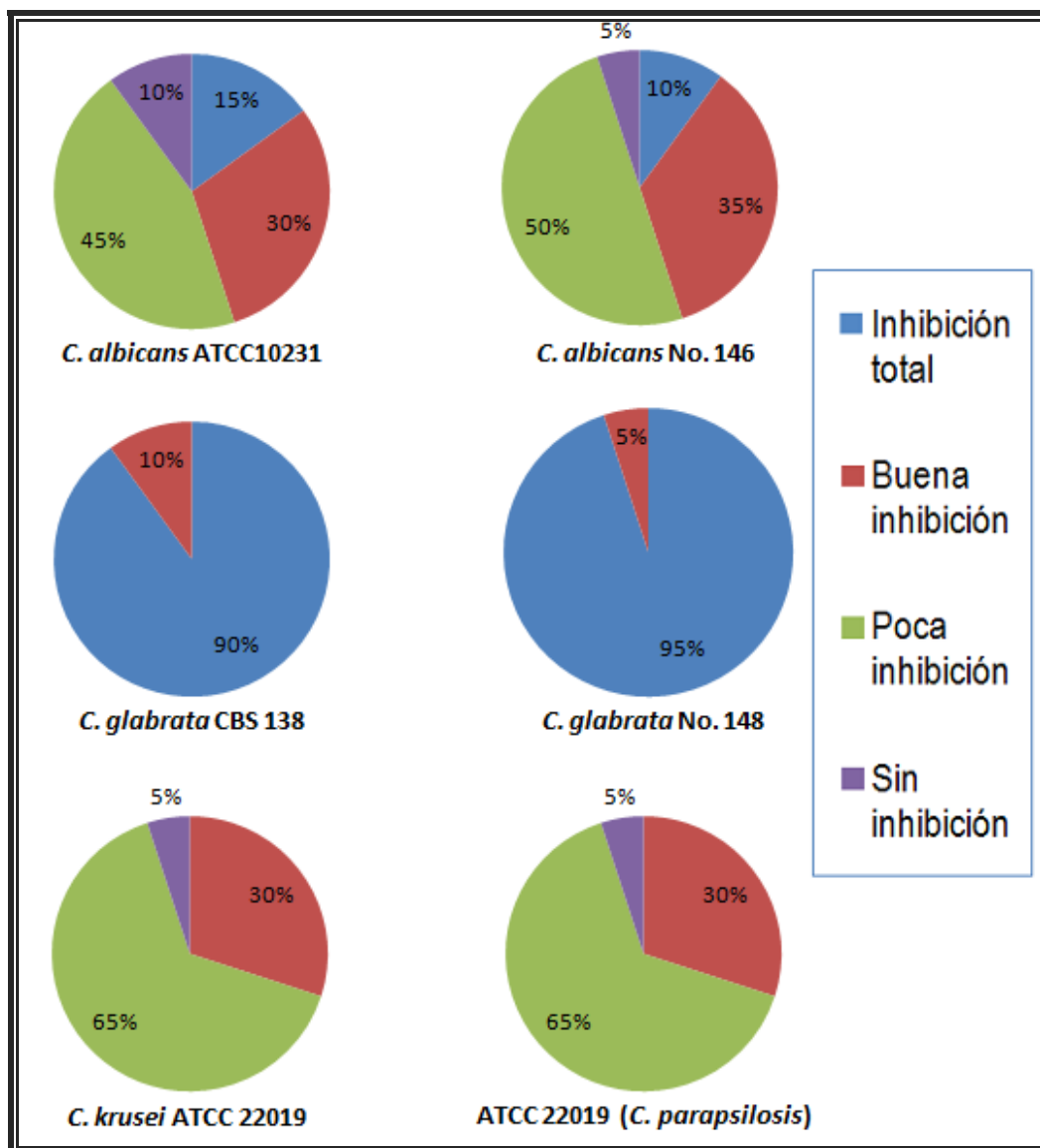


Figura 6. Gráficas que muestran el porcentaje de aislados marinos evaluados a los 15 días de incubación que presentaron inhibición frente a las distintas cepas patógenas de *Candida*.

Adicionalmente, se pueden observar diferencias en la actividad de acuerdo a las características morfológicas de los microorganismos del género *Micromonospora*, formándose tres grupos de acuerdo a su coloración: grupo 1 (naranja claro), grupo 2 (naranja medio) y grupo 3 (naranja fuerte).

Comparándolos, puede notarse que, independientemente de la fuerte inhibición en el crecimiento, mostrada por los tres grupos frente a las cepas patógenas de *C. glabrata* CBS138 y *C. glabrata* No.148, existen diferencias en la actividad frente a las demás

cepas patógenas; en la figura 7, puede observarse que, el grupo 1 (naranja claro), presentó menor actividad que el grupo 2 (Figura 8) y grupo 3 (Figura 9) ya que, los microorganismos de este grupo presentan valores de poca inhibición (valor asignado de 2) frente a las cepas patógenas de *C. albicans* ATCC10231, *C. albicans* No.146, *C. krusei* y *C. parapsilosis*.

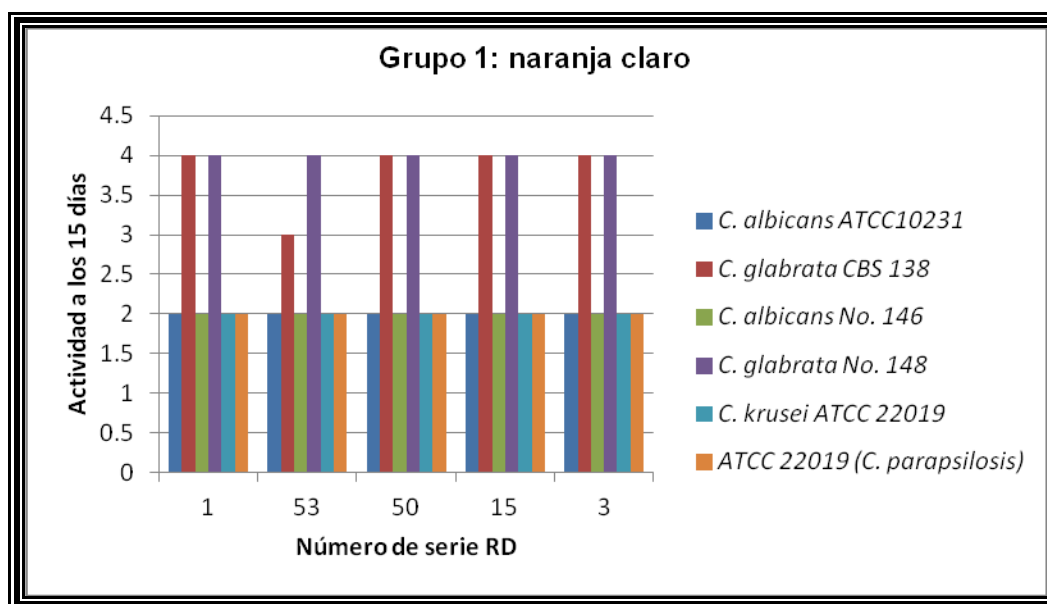


Figura 7. Actividad antifúngica presentada por el grupo 1 (naranja claro) a los 15 días de incubación frente a las distintas cepas patógenas de *Candida*. Nota: Los números de serie RD corresponden a las cepas de aislados marinos que conformaron el grupo 1; todos los organismos pertenecen al género *Micromonospora*.

El grupo 2 (naranja medio) presenta más variación en la actividad, ya que cuenta tanto con cepas de buena inhibición (cepas 42, 8 y 36) como con cepas de poca o nula inhibición, por ejemplo, cepa 57 y 34 (Figura 8).

Finalmente, en la figura 9 se observa que, el grupo 3 (naranja fuerte), fue el que presentó mayor actividad, ya que todos los microorganismos de este grupo tienen valores de inhibición iguales o mayores a 3 frente a los patógenos *C. albicans* ATCC10231, *C. albicans* No.146, *C. krusei* (excepto cepa 33) y *C. parapsilosis* (excepto cepa 33).

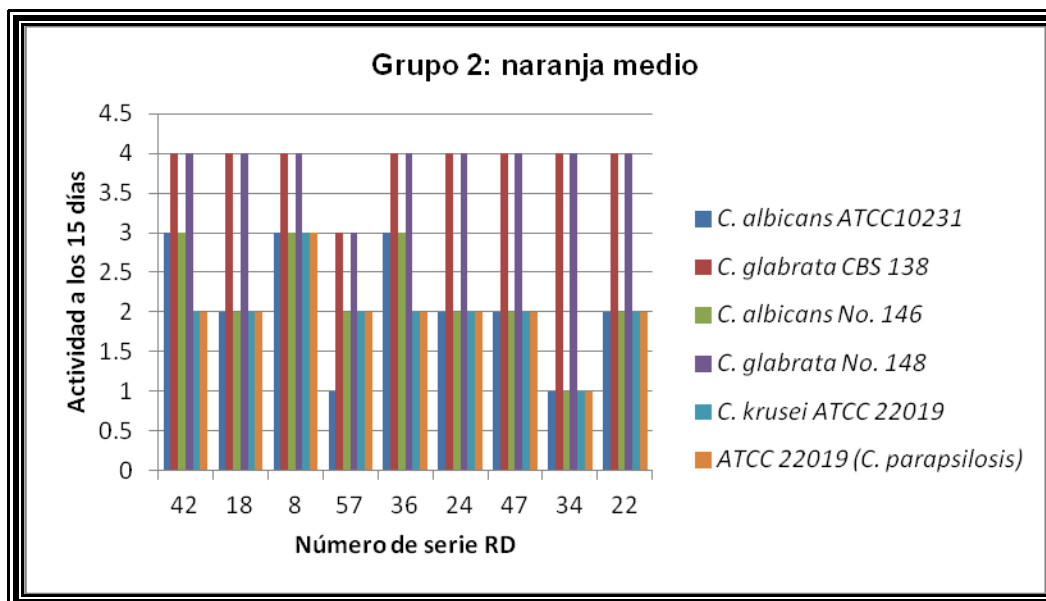


Figura 8. Actividad antifúngica presentada por el grupo 2 (naranja medio) a los 15 días de incubación frente a las distintas cepas patógenas de *Candida*. Nota: Los números de serie RD corresponden a las cepas de aislados marinos que conformaron el grupo 2; todos los organismos pertenecen al género *Micromonospora*.

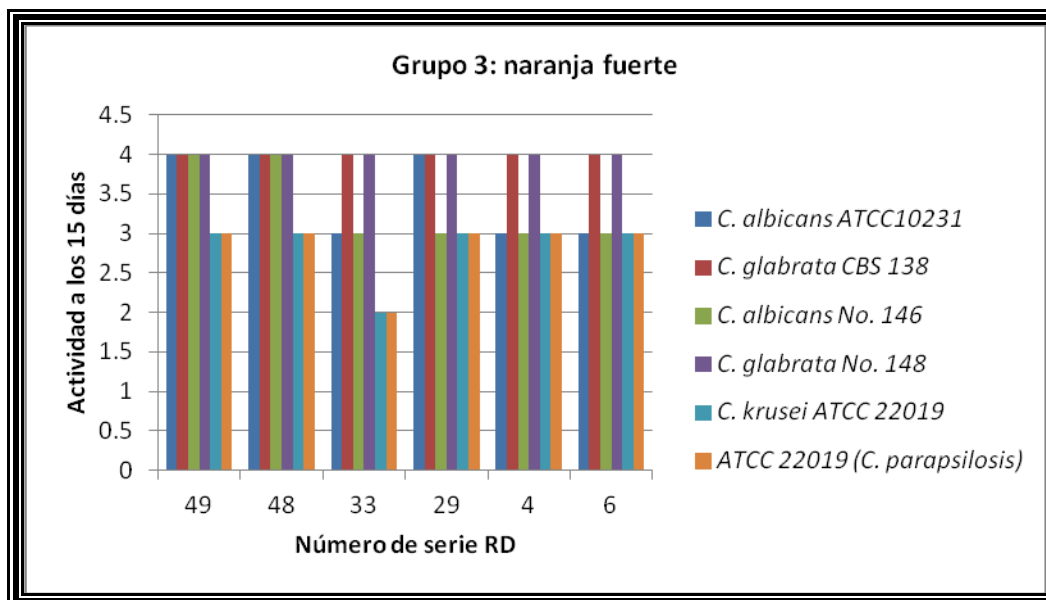


Figura 9. Actividad antifúngica presentada por el grupo 3 (naranja fuerte) a los 15 días de incubación frente a las distintas cepas patógenas de *Candida*. Nota: Los números de serie RD corresponden a las cepas de aislados marinos que conformaron el grupo 3; todos los organismos pertenecen al género *Micromonospora*.

En la evaluación de la actividad a los 25 días de incubación, en los aislados marinos (8 microorganismos) que comenzaron a presentar signos de esporulación o que ya se encontraban esporulados, se encontró que, el 100% de éstos inhibió totalmente (valor

asignado de 4) el crecimiento de las cepas patógenas de *C. albicans* ATCC10231, *C. glabrata* CBS138, *C. glabrata* No.148, *C. krusei* y *C. parapsilosis*. Solo en el caso de *C. albicans* No.146, se observó que los aislados marinos evaluados tuvieron una inhibición total (valor asignado de 4) del 50% y una buena inhibición (valor asignado de 3) del 50%, sin detectarse un patrón definido de acuerdo a las características morfológicas de los organismos (Figura 10). En este caso, se incluyó la cepa con número de serie RD-51 para comparar la actividad con los demás organismos del género *Micromonospora*; se puede observar que esta cepa presentó inhibición total de las seis cepas patógenas de *Candida*.

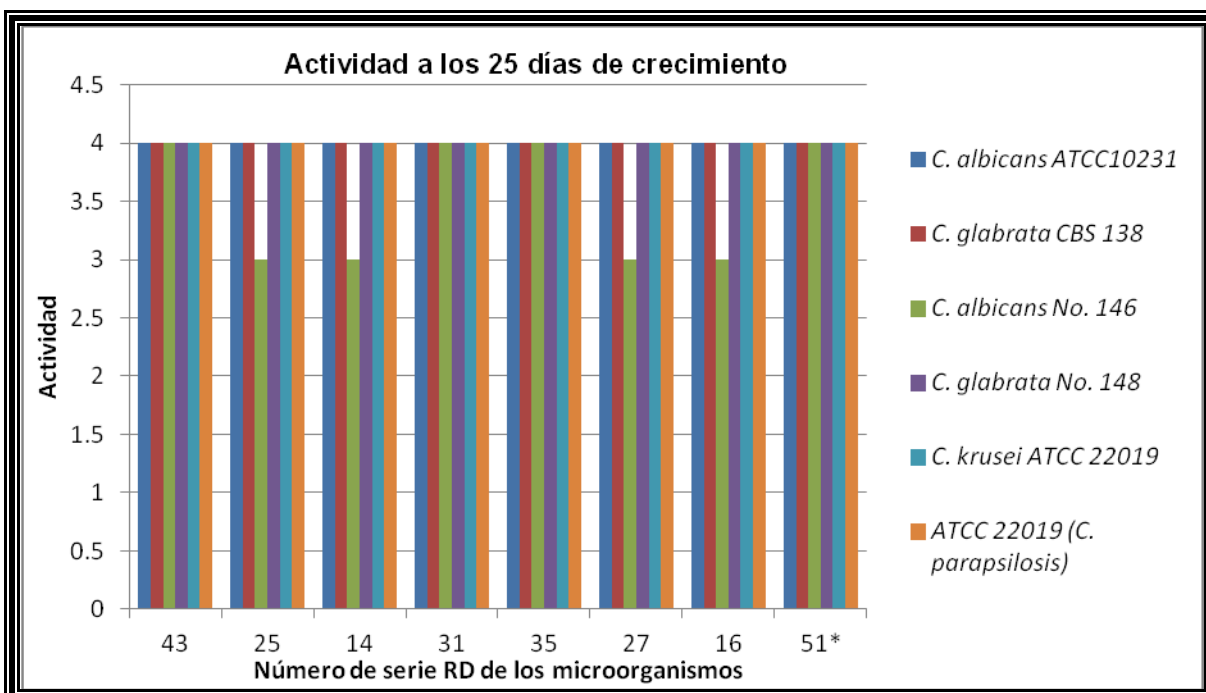


Figura 10. Actividad antifúngica presentada a los 25 días de incubación frente a las distintas cepas patógenas de *Candida*. Nota: Los números de serie RD corresponden a las cepas de aislados marinos evaluados. Todos los organismos corresponden al género *Micromonospora*, excepto (*) el número de serie RD-51 que corresponde presuntivamente al género *Streptomyces*.

CAPÍTULO V:

DISCUSIÓN

5.1. IDENTIFICACIÓN DE LOS MICROORGANISMOS COMO PERTENECIENTES AL GÉNERO *Micromonospora*.

Rodríguez-Martínez (2008) menciona que las colonias del género *Micromonospora* que crecen en medios sólidos (en este caso medio GYM) inicialmente tienen un color amarillo claro, rosa claro o naranja claro, que va cambiando a naranja, rojo, marrón, azul-verdoso o morado; y que al madurar, las colonias adquieren progresivamente un color más oscuro con la producción de esporas marrón-negras, verdes-negras o negras y se vuelven mucosas. Además que, en comparación con aislados del género *Streptomyces*, las colonias esporulan luego de mayor tiempo de incubación (Zhao *et al.*, 2004). En la observación de las características morfológicas presentadas por los aislados marinos, veintisiete organismos correspondieron a lo reportado para los microorganismos pertenecientes al género *Micromonospora* (Anexo II) y una muestra con número de serie RD-51 correspondió a las características típicas del género *Streptomyces*, presentando colonias con micelio aéreo de coloración blanquecina y un característico olor a “tierra húmeda”.

Cabe mencionar que, los miembros del género *Micromonospora* no son fáciles de identificar basándose solamente en sus características morfológicas ya que sus colonias pueden ser confundidas con otros géneros de la familia *Micromonosporaceae* (Qui *et al.*, 2008), por ello, al realizar la identificación de los microorganismos como pertenecientes a la familia *Micromonosporaceae* y al género *Micromonospora*, se observaron algunas discrepancias ya que, organismos que sí produjeron productos de PCR para género *Micromonospora* (Figura 4) no produjeron productos de amplificación para PCR de familia *Micromonosporaceae* (Figura no mostrada); estas irregularidades probablemente se deben a que cuando se diseñaron los oligonucleótidos para la identificación de los miembros de la familia *Micromonosporaceae*, sólo se utilizaron las secuencias

disponibles en la base de datos hasta ese momento y sólo se utilizaron microorganismos de muestras de suelo y no se consideraron muestras de microorganismos marinos (Monciardini *et al.*, 2002).

Además, hay que considerar que a través del tiempo, la posición taxonómica de los microorganismos puede variar debido a los avances moleculares que se van desarrollando. En este mismo trabajo, se menciona la variabilidad que existe entre las secuencias del 16S rRNA dentro de un mismo linaje y que sus resultados sugieren la existencia de una gran diversidad para la mayoría de los grupos de actinomicetos considerados en el estudio, ya que raramente las secuencias de las clonas de los microorganismos obtenidos de las muestras de suelo, coincidieron en un 100% con las secuencias disponibles en la base de datos, sugiriendo la existencia de nuevas especies pertenecientes a los taxones conocidos (Monciardini *et al.*, 2002).

De igual forma, Qui y colaboradores (2008), mencionan que a pesar de que el uso de estos oligonucleótidos específicos para la familia *Micromonosporaceae* ha sido reportado con éxito en trabajos anteriores, se encontró que no son tan específicos puesto que también amplificaron algunas secuencias del género *Streptomyces* spp.

Independientemente de las irregularidades presentadas en las PCR para familia y género, veintisiete organismos con características morfológicas propias del género *Micromonospora*, presentaron una banda de amplificación de aproximadamente 470 pb, por lo cual se consideraron como pertenecientes a dicho género.

5.2. IDENTIFICACIÓN DEL CLÚSTER GENÉTICO PKSs TIPO I EN EL GÉNERO *Micromonospora*.

Los resultados negativos obtenidos en las amplificaciones por PCR empleando los oligonucleótidos descritos por Ayuso y Genilloud (2005) para sistemas PKSs de tipo I, no significan la ausencia del clúster esperado en organismos de este género; ya que, al realizar el BLASTn utilizando las secuencias de los oligonucleótidos diseñados por los autores, los resultados (ver Anexo III, punto 1) muestran que sí existen sistemas PKSs tipo I que pueden ser amplificados dentro del género *Micromonospora* utilizando este par de oligonucleótidos.

Algunas posibilidades y puntos a tomar en cuenta del por qué no se obtuvo ninguna banda de amplificación con este par de cebadores son que, en el trabajo realizado por Ayuso y Genilloud (2005), el diseño de los oligonucleótidos se realizó utilizando únicamente secuencias correspondientes a organismos terrestres y ninguna secuencia de aislados marinos, por lo que podría no existir correspondencia con los clústers biosintéticos del tipo PKSs I de nuestros aislados marinos evaluados. Además, para la creación de estos primers no se consideró la ruta biosintética de la candicidina y solo se emplearon las secuencias de los clústers biosintéticos de once rutas del tipo PKSs I, entre ellas la ruta biosintética de los compuestos rapamicina, rifamicina, avermectina, eritromicina, oleandomicina, niddamicina, picromicina, FK506, FK520, nistatina y pimaricina (Ayuso y Genilloud, 2005).

Así que, aunque los primers diseñados para PKSs tipo I (K1F/M6R) puedan amplificar específica y exclusivamente secuencias de los dominios KS y AT, y la ausencia de una amplificación pueda ser indicador de la carencia de sistemas PKSs tipo I, no se puede descartar la posibilidad de encontrar dominios con secuencias menos conservadas y por consiguiente una baja homología con los primers (Ayuso y Genilloud, 2005).

Este comportamiento, se observó en un trabajo realizado por Schneemann y colaboradores (2010), donde a pesar de la ausencia de fragmentos de amplificación de genes NRPSs y PKSs tipo II en algunos de sus microorganismos de prueba (actinobacterias marinas aisladas de la esponja *Halichondria panicea*), éstos producían el policétido fredericamicin A. El clúster biosintético para esta sustancia mostró un domino KS inusual, por lo que, el sistema de oligonucleótidos empleado no produjo ningún producto de amplificación. Posteriormente, se comparó la secuencia del sistema de oligonucleótidos empleado para la amplificación de PKSs tipo II y la secuencia del clúster de fredericamicin A y se observó que no existía ninguna homología, por lo que el sistema empleado no funcionó debido a esta inusual constitución molecular.

Tomando en cuenta estas consideraciones, se puede inferir por una parte, que posiblemente los aislados marinos del género *Micromonospora* estén presentando alguna constitución molecular poco común provocando una baja homología con los cebadores empleados; estudios recientes han demostrado que la distribución de los

actinomicetos en los sedimentos marinos y en algunos casos, su requerimiento de agua de mar para su crecimiento brindan evidencia para concluir que estos organismos se han adaptado al ambiente marino representando así una clase única de microorganismos (Jensen *et al.*, 1991). Por otro lado, también cabe la posibilidad que no se trate del metabolito secundario de la candicidina y por ello no presente el clúster biosintético PKSs tipo I esperado.

Los resultados obtenidos del BLASTn (Anexo III) utilizando las secuencias de distintos pares de oligonucleótidos de seis genes (*fscA*, *fscM*, *fscP*, *pabAB*, *canRA* y *canP3*) que conforman el clúster de síntesis de candicidina (Tabla VII) muestran que, al menos dentro de la base de datos del GenBank, existen (aunque pocas) secuencias de organismos pertenecientes al género *Micromonospora* que podrían ser amplificadas utilizando los oligonucleótidos para cada par de genes; sin embargo esto no significa que los organismos del género *Micromonospora* posean el clúster biosintético correspondiente a la candicidina ya que, como podemos observar en la tabla I, el gen *fscA*, el gen *fscM*, el gen *fscP*, el gen *canRA* y el gen *canP3* corresponden a genes homólogos en otras rutas biosintéticas como la de la nistatina, anfotericina y pimarcina; es decir, que estos genes los podemos encontrar en numerosas rutas biosintéticas, sin que por ello signifique que se esté bio-sintetizando candicidina. Además, Jørgensen y colaboradores (2009) mencionan que a diferencia de los otros cinco genes, el gen *pabAB*, es altamente conservativo y es el encargado de la biosíntesis de la unidad iniciadora PABA (ácido para-amino benzoico) en la ruta biosintética de la candicidina; es decir, la presencia de este gen es vital para que se dé inicio a la síntesis de éste metabolito secundario.

En los resultados del BLASTn para el gen *pabAB*, podemos observar que hay dos secuencias del género *Micromonospora* con números de acceso CP002399.1 y CP002162.1 que parece podrían producir productos de amplificación utilizando los oligonucleótidos para el gen *pabAB* sin embargo, revisando la sección de alineamientos (Anexo III, punto 5), se puede observar que existe un alineamiento pero corresponde únicamente al cebador reversa y además el producto (proteína) que se está sintetizando corresponde a uno distinto al esperado que produciría el gen *pabAB* (ADC sintasa).

Estos resultados permiten suponer, como ya se mencionó, que los microorganismos evaluados en este estudio y que corresponden al género *Micromonospora*, no estén sintetizando el compuesto de la candidicina, sino que se trate de algún otro metabolito secundario; sin embargo, hacen falta más estudios para poder descartar la posibilidad de que los microorganismos evaluados, no estén presentando la misma ruta biosintética a la descrita para aislados terrestres del género *Streptomyces* y se trate de alguna ruta alterna.

5.3. EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA.

En un principio, la evaluación de la actividad se realizó a los siete días de incubación de los microorganismos (no había signos de esporulación en ningún caso) sin presentarse bioactividad en ninguna muestra. Posteriormente, dado que la producción de antibióticos y la esporulación han sido íntimamente relacionadas (Kondo *et al.* 1988); se decidió realizar la evaluación de la actividad antifúngica, por un lado a los 15 días y por otra parte se realizó a los 25 días, ya que fue el tiempo que las distintas muestras de *Micromonospora* tardaron en presentar signos de esporulación.

En un estudio realizado por Hoskisson y colaboradores (2001), en microorganismos de la especie *Micromonospora echinospora* (ATCC 15837), observaron que ambos procesos parecen ser mutuamente excluyentes, con el cese de la producción de antibióticos una vez iniciada la esporulación. Así pues, la producción de antibióticos fue transitoria, detectándose los primeros indicios de bioactividad en las primeras 72 horas (3 días) de incubación, con un pico de actividad poco después de las 120 horas (5 días) y a las 144 horas (6 días) decayó rápidamente a niveles indetectables. Este comportamiento sugiere que la fase biosintética precede el inicio de la esporulación por lo que ambos procesos son controlados diferencialmente.

En este estudio, el comportamiento de la bioactividad es muy distinto en cuestión del tiempo de incubación que tuvo que pasar para que los microorganismos comenzaran a esporular, sin embargo, hay que tomar en cuenta que la identificación de los microorganismos sólo pudo realizarse hasta nivel de género por lo tanto se desconoce la o las especies a las que corresponden las muestras evaluadas así que podría haber

diferencias en el ciclo de vida a nivel de especie. En cuanto a las diferencias en la bioactividad que se registraron a los 15 y 25 días, podría decirse que en la evaluación a los 25 días se observa una mayor actividad frente a todas las cepas patógenas de *Candida* evaluadas ya que, si la fase biosintética precede el inicio de la esporulación, entonces probablemente ésta tuvo una mayor duración en estos organismos y por lo tanto, el compuesto bioactivo se acumuló en mayor cantidad, reflejándose así, en una mayor actividad. Por otra parte, sería interesante evaluar la actividad antifúngica después de la esporulación.

De manera general, en la evaluación de la actividad antifúngica frente a distintas cepas patógenas de *Candida*, los microorganismos evaluados del género *Micromonospora* mostraron una bioactividad importante, especialmente frente a las cepas de *C. glabrata* CBS138 y *C. glabrata* No.148, sin importar el tiempo de incubación de los aislados marinos ya que, inhibieron casi totalmente el crecimiento de estos organismos desde la primera evaluación a los 15 días (Figuras 6-10). A los 25 días de crecimiento (Figura 10), prácticamente todos los microorganismos marinos presentaron una buena inhibición en el crecimiento de todas las cepas patógenas (*C. albicans* ATCC10231, *C. albicans* No.146, *C. krusei*, *C. parapsilosis*, *C. glabrata* CBS138 y *C. glabrata* No.148).

En el caso del género *Micromonospora*, se ha reportado una bioactividad importante frente a muestras clínicas de *C. albicans* y de otras especies de *Candida* (Maldonado, sin publicar, PAPIIT IN212011), lo anterior permitió suponer la síntesis de candicidina por parte de los aislados marinos evaluados y por tanto, inferir la presencia del clúster de síntesis de candicidina en aislados de éste género, sin embargo, hasta la fecha no existen trabajos dónde se reporte alguna actividad similar por parte del género *Micromonospora* frente a distintas cepas patógenas de *Candida* como las evaluadas en este trabajo.

Además, realizando una revisión bibliográfica de distintos metabolitos secundarios del tipo de policétidos macrólidos y sus respectivas actividades biológicas, reportados para el género *Micromonospora* (Tabla II), no se encontró ningún compuesto de este tipo (macrólido) en el que se reporte una actividad antifúngica similar a la encontrada en este estudio (Waitz *et al.*, 1969; Weinstein *et al.*, 1969; Wagman *et al.*, 1972; Hatano *et al.*,

1976; Marquez *et al.*, 1976; Furumai *et al.*, 1977; Sato *et al.*, 1980; Tamaoki *et al.*, 1980; Tomita y Tamaoki, 1980; Omura *et al.*, 1986; Fernández-Chimeno *et al.*, 2000; Ohta *et al.*, 2001; Fang *et al.*, 2008; Gärtner *et al.*, 2011; Igarashi *et al.*, 2011; Iizaka *et al.*, 2013).

Debido a estos antecedentes, puede suponerse que el metabolito secundario producido por los organismos evaluados en este trabajo, pueda corresponder a otro tipo de compuesto distinto a la candicidina, como por ejemplo, la nistatina la cual ha demostrado actividad antifúngica frente a distintas cepas patógenas como las evaluadas en este trabajo, además de que corresponde a un metabolito secundario del tipo macrólido polieno (como la candicidina) obtenido a partir de *Streptomyces noursei* (Mehta *et al.*, 1987; Aparicio *et al.*, 1999; Caffrey *et al.*, 2001; Campelo y Gil, 2002).

Otro ejemplo en el que se presentó actividad antifúngica como la mostrada en este trabajo, es un estudio realizado por Mendes *et al.* (2013), en el cual, se evaluó la actividad antifúngica de 24 cepas de actinobacterias aisladas a partir de hormigas *Trachymyrmex*, frente a las especies patógenas de *C. albicans* CBS 562, *C. dubliniensis* CBS 7987, *C. glabrata* CBS 138, *C. krusei* CBS 573, *C. parapsilosis* CBS 604, y *C. tropicalis* CBS 94. Los resultados arrojaron que seis cepas pertenecientes al género *Streptomyces* y una correspondiente al género *Amycolatopsis* inhibieron satisfactoriamente el crecimiento de los patógenos. La cepa *Streptomyces* spp. TD025 fue seleccionada para el aislamiento del compuesto bioactivo, el cual correspondió a una antimicina denominada urauquimicina A y B, ambos compuestos mostraron actividad antifúngica, especialmente la urauquimicina B que inhibió el crecimiento de todas las especies de *Candida*, con valores de concentración inhibitoria mínima equivalentes al antifúngico de la nistatina.

Las urauquimicinas A y B, fueron obtenidas previamente por Imamura *et al.*, (1993), a partir de la cepa *Streptomyces* spp. Ni-80, aislada de una esponja marina en Urauchicove, Japón. Estos compuestos fueron las primeras antimicinas con un singular número de carbonos y una cadena lateral ramificada, sugiriendo que estas estructuras son resultado de la evolución de las actinobacterias en el ambiente marino, induciendo a un cambio en su metabolismo secundario.

CAPÍTULO VI:

CONCLUSIONES.

- Se logró la identificación de veintisiete aislados marinos como pertenecientes al género *Micromonospora*, mediante la observación de sus características morfológicas así como, mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizando los oligonucleótidos específicos diseñados por Qiu y colaboradores (2008).
- Se evaluó cualitativamente la actividad antifúngica frente a distintas especies de *Candida* (*C. albicans* ATCC10231; *C. glabrata* CBS138; *C. albicans* No.146; *C. glabrata* No.148; *C. krusei* y *C. parapsilosis*), todos los microorganismos evaluados mostraron una bioactividad importante, especialmente frente a las cepas patógenas de *C. glabrata* CBS138 y *C. glabrata* No.148.
- Se observaron dos patrones de inhibición o modificación en el crecimiento de las cepas patógenas, dependiendo del tiempo de incubación de los aislados marinos (15 y 25 días), observándose una mayor actividad frente a todas las cepas patógenas de *Candida*, a los 25 días de incubación.
- En cuanto a la identificación del clúster biosintético de candicidina en los aislados marinos del género *Micromonospora*, no fue posible la amplificación de ninguna banda correspondiente a sistemas PKSs tipo I empleando los oligonucleótidos específicos para este fin, descritos por Ayuso y Genilloud (2005).
- Sin embargo, tampoco es contundente la ausencia de un clúster biosintético PKSs tipo I en los aislados marinos del género *Micromonospora* ya que, los resultados obtenidos del BLASTn utilizando las secuencias de los oligonucleótidos diseñados por los autores, mostraron que sí existen sistemas PKSs tipo I que pueden ser amplificados dentro del género *Micromonospora* utilizando este par de oligonucleótidos.
- Tomando en cuenta que los organismos evaluados son aislados marinos, y por ello pueden presentarse cambios a nivel molecular (y por tanto en su metabolismo secundario) como resultado de su evolución dentro del ambiente marino, no podemos

descartar la posibilidad de encontrar dominios (AT y KS) con secuencias menos conservadas y por consiguiente una baja homología con los primers utilizados.

- Los resultados de los diferentes BLASTn, y la actividad mostrada frente a las distintas cepas patógenas de *Candida*, aunado a la falta de trabajos dónde se reporte alguna actividad similar frente a las distintas especies de *Candida* por parte de algún compuesto del tipo macrólido obtenido a partir de organismos del género *Micromonospora*, también permiten suponer, que los microorganismos evaluados en este estudio, no están sintetizando el compuesto de la candicidina, (la cual se reporta, solo presenta actividad frente a cepas patógenas de *Candida albicans*), sino algún otro metabolito secundario, como por ejemplo, la nistatina; sin embargo, hacen falta más estudios para poder descartar la posibilidad de que se trate de alguna ruta biosintética alterna a la descrita para aislados terrestres del género *Streptomyces*.

- Finalmente, hay que mencionar que es importante evaluar los oligonucleótidos correspondientes a los distintos genes del clúster de candicidina y hacer un análisis de sus secuencias para poder esclarecer la presencia o ausencia del clúster biosintético que podrían o no tener los aislados marinos del presente trabajo.

PERSPECTIVAS:

En la realización de este estudio, el organismo con número de serie RD-51, probablemente perteneciente al género *Streptomyces*, mostró una fuerte actividad frente a las cepas patógenas de *Candida* a los 25 días de incubación, sería interesante continuar con su evaluación a la par de los otros microorganismos del género *Micromonospora*; así como también evaluar los oligonucleótidos descritos por Ayuso y Genilloud para ayudar a detectar la presencia de algún clúster biosintético PKSs tipo I, que pudiera estar presente también en este organismo ya que tiene una actividad muy similar a los del género *Micromonospora*.

Adicionalmente, es de interés continuar con la evaluación de la actividad antifúngica a distintos tiempos de incubación, como por ejemplo, evaluar los microorganismos después de que se encuentren totalmente esporulados y de igual forma, evaluar a que especies de *Micromonospora* corresponden los organismos evaluados y detectar si existen patrones en la actividad dependiendo de la especie.

Otro estudio de utilidad, aunque de mucho trabajo, sería proceder a la extracción del metabolito secundario producido por estos organismos, para así poder identificar de manera más precisa a que compuesto corresponde y conjuntar todos los resultados de la investigación.

ANEXO I

MEDIO GYM:

En la siguiente tabla se enlistan los reactivos utilizados para preparar un litro de medio GYM. *Nota: se utilizó agua bidestilada. Se agrega una pequeña hojuela de KOH y se ajusta el pH a un intervalo de entre 6.8 a 7.2.

| Reactivo | Cantidad (g) |
|---------------------------|--------------|
| Glucosa | 4 |
| Extracto de levadura (BD) | 4 |
| Extracto de malta (BD) | 10 |
| CaCO ₃ | 2 |
| Agar-agar | 12 |
| KOH | * |

MEDIO YEME (Yeast extract malt extract medium):

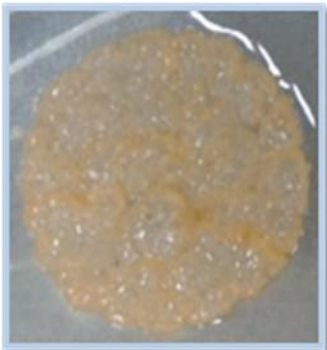

En la siguiente tabla se enlistan los reactivos utilizados para preparar un litro de medio YEME. *Nota: se utilizó agua bidestilada. El pH se ajusta en un intervalo de 7 a 7.2.



| Reactivo | Cantidad (g) |
|---------------------------|--------------|
| Glucosa | 10 |
| Extracto de levadura (BD) | 3 |
| Extracto de malta (BD) | 3 |
| Bactopeptona (BD) | 5 |
| Agar | 12 |

ANEXO II

Características morfológicas de los distintos microorganismos de la serie RD.

Color, 1: naranja claro, 2: naranja medio, 3: naranja fuerte, 4: blanco. Consistencia, A: butirosa, B: suave, C: dura. Aspecto, a: seco, b: húmedo. Crecimiento, A: abundante, R: regular, P: poco crecimiento. Esporulación, 0: sin esporulación, 1: poca esporulación, 2: esporulación regular, 3: completamente esporulada. (*): Pertenciente al género *Micromonospora*.

| Serie RD | Color | Consistencia | Esporulación | Color esporulación | Aspecto | Crecimiento | Micromonospora | Imagen |
|----------|-------|--------------|--------------|--------------------|---------|-------------|----------------|---|
| 1 | 1 | A | 0 | ---- | a | R | * |  <p>1.- Naranja claro</p> |
| 43 | 1 | A | 0 | ---- | a | A | * | |
| 3 | 1 | C | 0 | ---- | a | R | * | |
| 14 | 1 | C | 2 | Café con gris | a | A | * | |
| 25 | 1 | C | 1 | Gris | a | P | * | |
| 53 | 1 | C | 1 | Gris | a | A | * | |
| 15 | 1 | C | 0 | ---- | a | R | * | |
| 50 | 1 | C | 0 | ---- | a | P | * | |
| 8 | 2 | A | 1 | Café | a | R | * |  <p>2.- Naranja medio</p> |
| 18 | 2 | A | 1 | Café | a | R | * | |
| 42 | 2 | A | 0 | ---- | a | A | * | |
| 24 | 2 | B | 3 | Verde - azulada | a | A | * | |
| 31 | 2 | B | 1 | Café | a | A | * | |
| 36 | 2 | B | 2 | Gris | a | A | * | |
| 57 | 2 | B | 3 | Negra | a | A | * | |
| 22 | 2 | C | 2 | Gris | a | A | * | |
| 34 | 2 | C | 0 | ---- | a | R | * | |
| 47 | 2 | C | 0 | ---- | a | R | * | |
| 35 | 2 | C | 0 | ---- | a | R | * | |

| | | | | | | | | |
|----|---|---|---|------------|---|---|---|--|
| 27 | 3 | A | 0 | ----- | a | A | * |  <p>3.- Naranja fuerte</p> |
| 4 | 3 | B | 2 | Café-negro | a | A | * | |
| 6 | 3 | B | 1 | Café | a | A | * | |
| 29 | 3 | B | 0 | ----- | a | A | * | |
| 48 | 3 | B | 0 | ----- | a | A | * | |
| 33 | 3 | B | 2 | Café | a | A | * | |
| 49 | 3 | B | 0 | ----- | a | A | * | |
| 16 | 3 | C | 1 | Café | a | A | * | |
| 51 | 4 | C | 0 | ----- | a | A | - |  <p>4.- Blanco</p> |

ANEXO III

Para todos los BLASTn realizados:

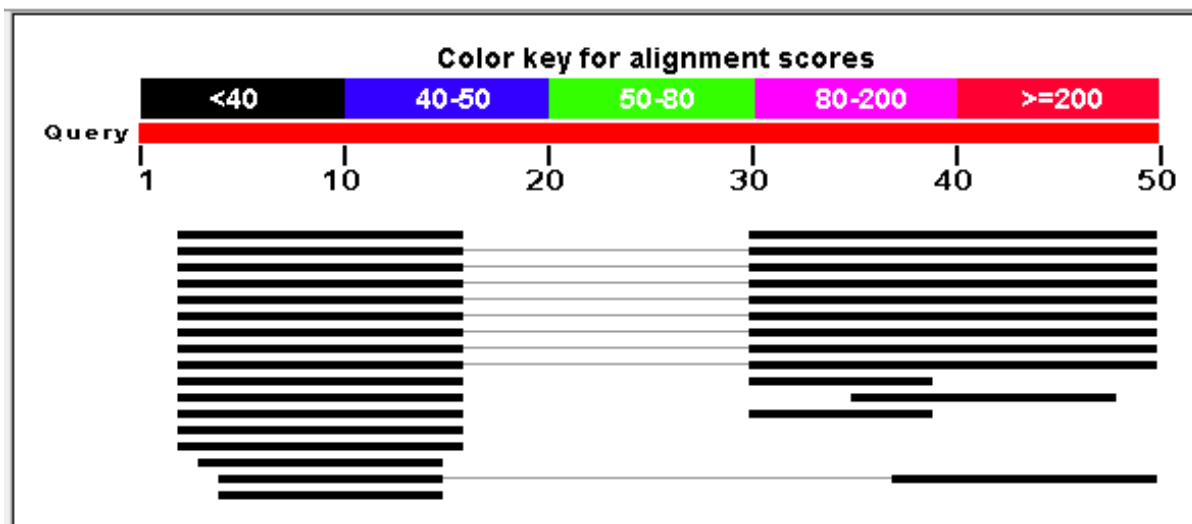
En la primera imagen se muestra la gráfica de distribución de los “hits” obtenidos en el BLASTn para la secuencia problema (en este caso el par de cebadores). Se muestra un panorama general de las secuencias contenidas en la base de datos que se alinearon a la secuencia problema. La línea delgada que une un alineamiento con otro significa que se encontraron múltiples alineamientos en la misma secuencia.

En la segunda imagen, en cada caso, se muestra la pantalla obtenida del BLASTn con las distintas secuencias que produjeron alineamientos significantes. En cada caso se muestra el porcentaje de identidad, los puntajes obtenidos, el valor esperado de e (e-value), el porcentaje de cobertura a la secuencia problema por parte de las secuencias de la base de datos y el número de acceso a dicha secuencia.

1. BLASTn (NUCLEÓTIDOS) UTILIZANDO LAS SECUENCIAS DE LOS OLIGONUCLEÓTIDOS DISEÑADOS POR AYUSO Y GENILLOUD (2005) PARA SISTEMAS PKS TIPO I.

K1F- (5'-TSAAGTCSAACATCGGBCA-3')

M6R- (5'-TACTGGTACSGSAACCTGCG-3')

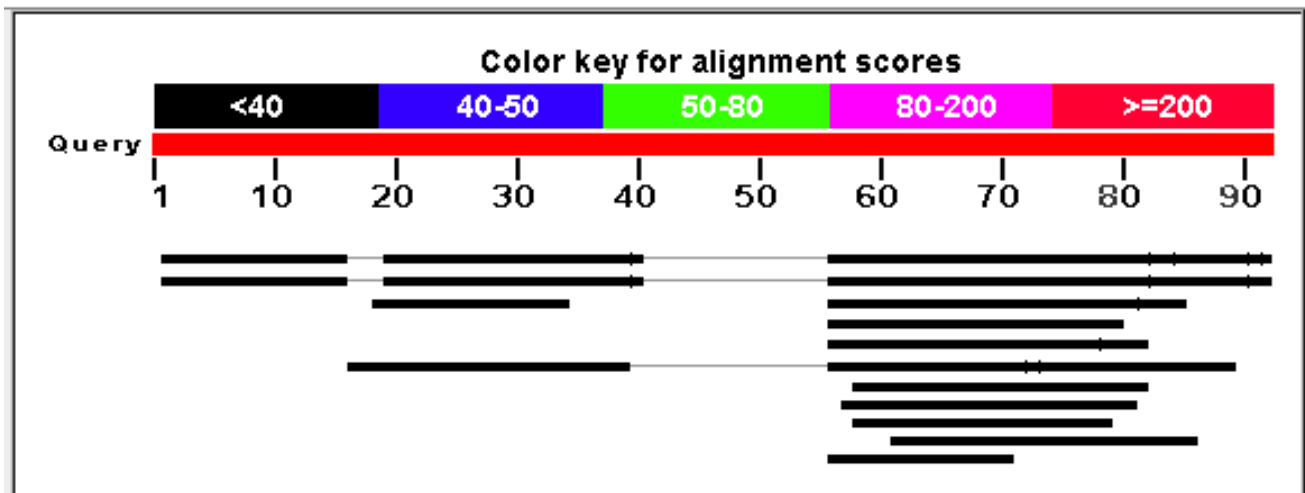


| Description | Max score | Total score | Query cover | E value | Ident | Accession |
|--|-----------|-------------|-------------|---------|-------|----------------------------|
| Micromonospora sp. SCSIO11524 PKS-I gene, partial cds | 35.1 | 35.1 | 40% | 0.017 | 90% | KF470779.1 |
| Micromonospora sp. L5, complete genome | 35.1 | 2139 | 68% | 0.017 | 90% | CP002399.1 |
| Micromonospora aurantiaca ATCC 27029, complete genome | 35.1 | 2429 | 68% | 0.017 | 90% | CP002162.1 |
| Micromonospora echinospora subsp. chalisensis strain NRRL 12255 TLN-05220 gene cluster, complete sequence | 35.1 | 61.6 | 68% | 0.017 | 90% | FJ915123.1 |
| Micromonospora chalcea tetrocarcin A gene cluster, complete sequence | 35.1 | 400 | 68% | 0.017 | 90% | EU443633.1 |
| Micromonospora griseorubida gene cluster for the polyketide macrolide mycinamicin, partial and complete cds | 35.1 | 196 | 68% | 0.017 | 90% | AB089954.2 |
| Micromonospora megalomicea subsp. nigra megalomicin biosynthetic gene cluster, partial sequence | 35.1 | 211 | 68% | 0.017 | 90% | AF263245.1 |
| Micromonospora griseorubida gene for polyketide synthase, complete cds | 35.1 | 61.6 | 68% | 0.017 | 90% | AB017641.1 |
| Micromonospora sp. CMS I2-32 hypothetical protein gene, partial cds; and ferredoxin (mmlF), cytochrome P450 hydroxylase (mmlG), glutamate 2,3 aminorr | 26.5 | 26.5 | 28% | 7.0 | 93% | KC608862.1 |
| Micromonospora sp. CMS I2-32 modular PKS (mmlA) gene, partial cds | 26.5 | 48.6 | 68% | 7.0 | 93% | KC608857.1 |
| Micromonospora sp. CMS I2-32 modular PKS (mmlA) gene, partial cds | 26.5 | 26.5 | 28% | 7.0 | 93% | KC608856.1 |
| Micromonospora sp. CMS I2-32 modular PKS (mmlA) gene, partial cds | 26.5 | 26.5 | 28% | 7.0 | 93% | KC608855.1 |
| Micromonospora sp. CMS I2-32 modular PKS-like (mmlA) gene, partial sequence | 26.5 | 26.5 | 28% | 7.0 | 93% | KC608854.1 |
| Micromonospora sp. CMS I2-32 modular PKS (mmlC) and modular PKS (mmlB) genes, partial cds | 26.5 | 26.5 | 28% | 7.0 | 93% | KC608852.1 |
| Micromonospora sp. CMS I2-32 modular PKS (mmlD) gene, partial cds; and modular PKS (mmlE) gene, complete cds | 26.5 | 26.5 | 28% | 7.0 | 93% | KC608850.1 |
| Micromonospora echinospora calicheamicin biosynthetic locus, complete sequence | 22.1 | 44.3 | 24% | 142 | 92% | AF497482.1 |
| Micromonospora sp. NRRL B-16802 phosphonate biosynthetic gene cluster, partial sequence | 20.0 | 20.0 | 18% | 640 | 100% | KF386874.1 |
| Micromonospora sp. CMS I2-32 malonyl CoA-acyl carrier protein transacylase (mmlU) gene, partial cds; and long chain fatty acid CoA ligase (mmlK) gene, c | 20.0 | 39.9 | 48% | 640 | 85% | KC608848.1 |
| Micromonospora olivasterospora genes for aminoglycoside resistance and ORFs | 20.0 | 20.0 | 26% | 640 | 85% | D13171.2 |
| Micromonospora olivasterospora formimicin biosynthesis gene cluster, strain DSM 43868 | 20.0 | 39.9 | 22% | 640 | 91% | AJ628421.2 |

2. BLASTn (NUCLEÓTIDOS) PARA EL GEN *fscA*.

fscA for- (3'-ATGGTGCCCGTCCACGCACACGACTACGTGACCGATCCGC-5')

fscA rev- (3'-GGCGGCCAGCACCTCGGCGACGGCGGTCACCACCAG-5')

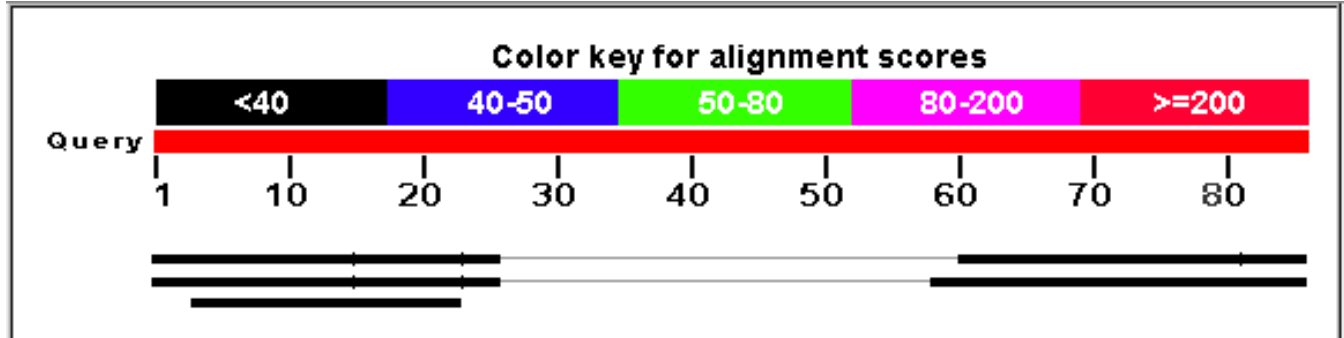


| Description | Max score | Total score | Query cover | E value | Ident | Accession |
|--|-----------|-------------|-------------|---------|-------|----------------------------|
| Micromonospora sp. L5, complete genome | 39.2 | 5452 | 79% | 0.002 | 100% | CP002399.1 |
| Micromonospora aurantiaca ATCC 27029, complete genome | 39.2 | 5062 | 79% | 0.002 | 100% | CP002162.1 |
| Micromonospora sp. ML1 thiocoraline gene cluster | 37.4 | 67.5 | 31% | 0.007 | 92% | AM113472.1 |
| Micromonospora sp. CMS I2-32 modular PKS (mmIC) and modular PKS (mmIB) genes, partial cds | 35.6 | 35.6 | 26% | 0.025 | 92% | KC608852.1 |
| Micromonospora chersina strain M956-1 hypothetical protein, NTP pyrophosphohydrolase, and hypothetical proteins genes, complete cds; 5S ribosomal R | 35.6 | 97.6 | 28% | 0.025 | 95% | EF552206.1 |
| Micromonospora echinospora calicheamicin biosynthetic locus, complete sequence | 31.9 | 175 | 61% | 0.30 | 91% | AF497482.1 |
| Micromonospora sp. TP-A0468 response regulator, hypothetical protein, 2,3-rRNA cyclase, nonribosomal peptide synthetase, peptidyl carrier protein, anthr | 30.1 | 145 | 26% | 1.0 | 88% | JN038178.1 |
| Micromonospora sp. CMS I2-32 modular PKS-like (mmIE) gene, partial sequence | 30.1 | 30.1 | 17% | 1.0 | 100% | KC608859.1 |
| Micromonospora sp. Tu 6368 hypothetical protein gene, partial cds; saquavamycin Z/qaltamycin B gene cluster, complete sequence; and hypothetical prote | 30.1 | 30.1 | 26% | 1.0 | 88% | FJ670504.1 |
| Micromonospora megalomeica subsp. nigra megalomicin biosynthetic gene cluster, partial sequence | 30.1 | 30.1 | 23% | 1.0 | 90% | AF263245.1 |
| Micromonospora sp. UTMC 536 putative NRPS gene, partial cds | 28.3 | 28.3 | 27% | 3.6 | 84% | KF032242.1 |
| Micromonospora chalcea tetrocarcin A gene cluster, complete sequence | 28.3 | 56.7 | 16% | 3.6 | 100% | EU443633.1 |

3. BLASTn (NUCLEÓTIDOS) PARA EL GEN *fscM*.

fscM for- (3'-TCGCTGGGCGAGGTGGTCCCCGAACTGT-5')

fscM rev- (3'-CGGCTTGTCCAGGGTCAGGCTGATGCCG-5')

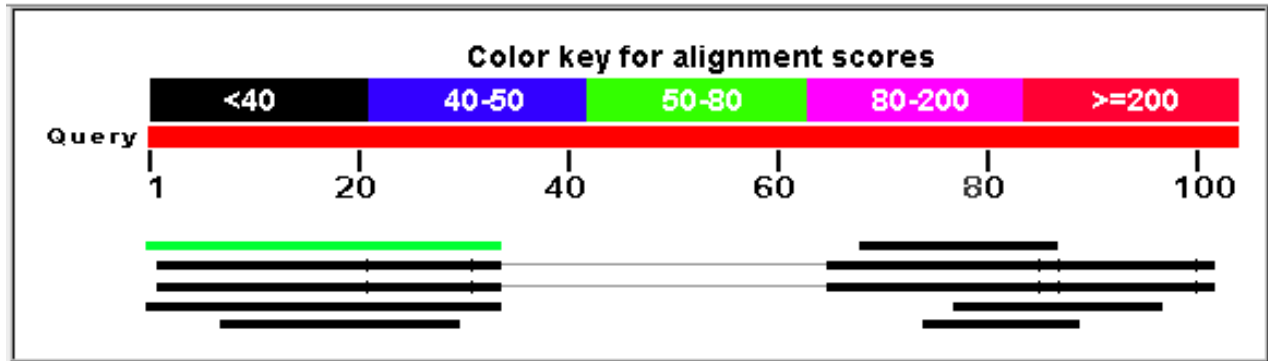


| Description | Max score | Total score | Query cover | E value | Ident | Accession |
|--|-----------|-------------|-------------|---------|-------|----------------------------|
| Micromonospora sp. L5, complete genome | 37.4 | 593 | 60% | 0.007 | 92% | CP002399.1 |
| Micromonospora aurantiaca ATCC 27029, complete genome | 35.6 | 622 | 62% | 0.023 | 92% | CP002162.1 |
| Micromonospora echinospora calicheamicin biosynthetic locus, complete sequence | 28.3 | 28.3 | 23% | 3.4 | 90% | AF497482.1 |

4. BLASTn (NUCLEÓTIDOS) PARA EL GEN *fscP*.

fscP for- (3'-GGTTCTGGCCCAGGCACTGGTGGACGCCGTAGCC-5')

fscP rev- (3'-ATGACGACCAGCCCCGGCCCGACGGTGGTCGACTTCCCAC-5')

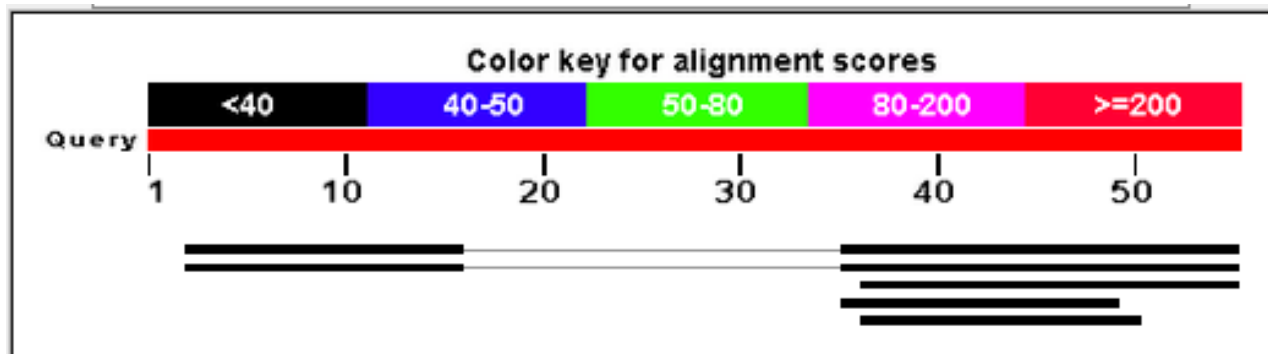


| Description | Max score | Total score | Query cover | E value | Ident | Accession |
|---|-----------|-------------|-------------|---------|-------|----------------------------|
| Micromonospora inyoensis cytochrome P450 hydroxylase gene, partial cds | 62.6 | 62.6 | 32% | 2e-10 | 100% | AF071146.1 |
| Micromonospora sp. L5, complete genome | 37.4 | 1019 | 67% | 0.008 | 85% | CP002399.1 |
| Micromonospora aurantiaca ATCC 27029, complete genome | 37.4 | 1033 | 67% | 0.008 | 85% | CP002162.1 |
| Micromonospora griseorubida gene cluster for the polyketide macrolide mvcinamicin, partial and complete cds | 35.6 | 35.6 | 32% | 0.029 | 82% | AB089954.2 |
| Micromonospora griseorubida mvcG gene for P-450-like protein, complete cds | 33.7 | 33.7 | 22% | 0.10 | 91% | D16098.1 |
| Micromonospora inyonensis strain TS388 sisomicin biosynthesis gene cluster, partial sequence | 30.1 | 30.1 | 18% | 1.2 | 95% | FJ160413.1 |
| Micromonospora olivasterospora nbp, mbs, qmt genes for nucleotide-binding protein, 2-methylenebornane synthase, geranyl diphosphate 2-methyltransfe | 28.3 | 28.3 | 19% | 4.3 | 90% | AB634561.1 |
| Micromonospora megalomicea subsp. nigra megalomicin biosynthetic gene cluster, partial sequence | 28.3 | 28.3 | 14% | 4.3 | 100% | AF263245.1 |

5. BLASTn (NUCLEÓTIDOS) PARA EL GEN *pabAB*.

pabAB for- (3'-GTCGAGAGCGCCTTCCTGAC-5')

pabAB rev- (3'-TGTCCGCCTCGGCCATGTTG-5')



| Description | Max score | Total score | Query cover | E value | Ident | Accession |
|---|-----------|-------------|-------------|---------|-------|----------------------------|
| Micromonospora sp. L5, complete genome | 30.1 | 433 | 61% | 0.51 | 100% | CP002399.1 |
| Micromonospora aurantiaca ATCC 27029, complete genome | 30.1 | 460 | 61% | 0.51 | 100% | CP002162.1 |
| Micromonospora sp. TP-A0468 response regulator, hypothetical protein, 2,3-ring cyclase, nonribosomal peptide synthetase, peptidyl carrier protein, anthranilate phosphoribosyltransferase, alpi | 26.5 | 26.5 | 34% | 6.2 | 89% | JN038178.1 |
| Micromonospora pallida partial rpoB gene for RNA polymerase B subunit, type strain DSM 43817T | 26.5 | 26.5 | 25% | 6.2 | 100% | FN659893.1 |
| Micromonospora sp. Tu 6368 hypothetical protein gene, partial cds, saquayamycin Z/galtamycin B gene cluster, complete sequence, and hypothetical protein genes, complete cds | 26.5 | 26.5 | 25% | 6.2 | 100% | FJ670504.1 |

- En la siguiente imagen se muestra una captura de la pantalla de la sección de alineamientos del BLASTn obtenido para el gen *pabAB*, para poder observar a mayor detalle las características del alineamiento y poder percibir que lo que en la gráfica de “hits”, pareciera una alineación “perfecta” de los cebadores a alguna secuencia de la base de datos, en realidad solo el cebador reversa se está alineando en distintas partes de la secuencia.

Micromonospora sp. L5, complete genome
 Sequence ID: [gb|CP002399.1](#) Length: 6962533 Number of Matches: 16

Range 1: 92330 to 92345 [GenBank](#) [Graphics](#) [Next Match](#) [Previous Match](#)

| Score | Expect | Identities | Gaps | Strand |
|---------------|--------|-------------|----------|------------|
| 30.1 bits(32) | 0.51 | 16/16(100%) | 0/16(0%) | Plus/Minus |

Features: [protein of unknown function DUF224 cysteine-rich region d...](#)

```

Query  37      GTCCGCCTCGGCCATG  52
          |||
Sbjct  92345      GTCCGCCTCGGCCATG  92330
  
```

Range 2: 799291 to 799310 [GenBank](#) [Graphics](#) [Next Match](#) [Previous Match](#) [First Match](#)

| Score | Expect | Identities | Gaps | Strand |
|---------------|--------|------------|----------|------------|
| 28.3 bits(30) | 1.8 | 18/20(90%) | 0/20(0%) | Plus/Minus |

Features: [osmosensitive K channel signal transduction histidine kinase](#)

```

Query  36      TGTCGCCTCGGCCATGTTG  55
          |||
Sbjct  799310      TGTCGCCTCGGCCATGGTG  799291
  
```

Range 3: 1431271 to 1431285 [GenBank](#) [Graphics](#) [Next Match](#) [Previous Match](#) [First Match](#)

| Score | Expect | Identities | Gaps | Strand |
|---------------|--------|-------------|----------|-----------|
| 28.3 bits(30) | 1.8 | 15/15(100%) | 0/15(0%) | Plus/Plus |

Features: [ATP-dependent transcriptional regulator, MalT-like, LuxR...](#)

```

Query  37      GTCCGCCTCGGCCAT  51
          |||
Sbjct  1431271      GTCCGCCTCGGCCAT  1431285
  
```

Range 4: 2953803 to 2953817 [GenBank](#) [Graphics](#) [Next Match](#) [Previous Match](#) [First Match](#)

| Score | Expect | Identities | Gaps | Strand |
|---------------|--------|-------------|----------|-----------|
| 28.3 bits(30) | 1.8 | 15/15(100%) | 0/15(0%) | Plus/Plus |

Features: [phosphate uptake regulator, PhoU](#)

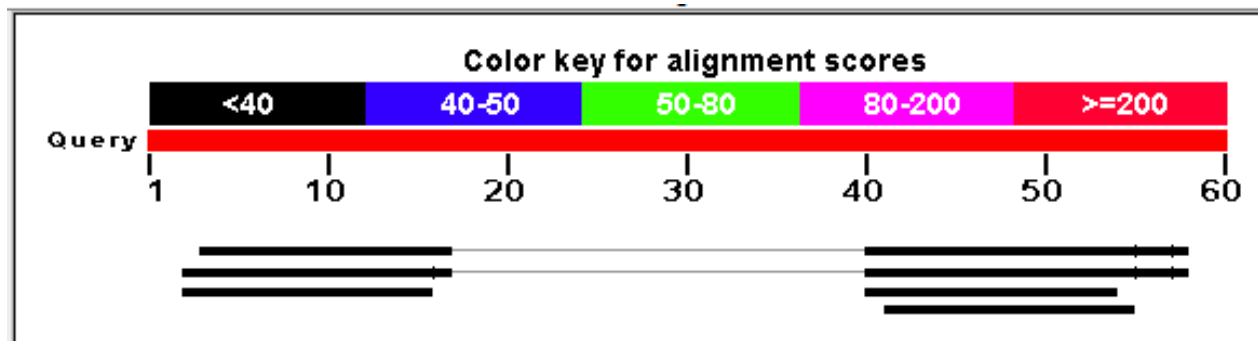
```

Query  39      CCGCCTCGGCCAIGT  53
          |||
Sbjct  2953803      CCGCCTCGGCCAIGT  2953817
  
```

6. BLASTn (NUCLEÓTIDOS) PARA EL GEN *canRA*.

canRA for- (3'-ACCGGCGTGCGAGCAGCTAC-5')

canRA rev- (3'-GCCGGCCTGGTCCAGGCTTC-5')

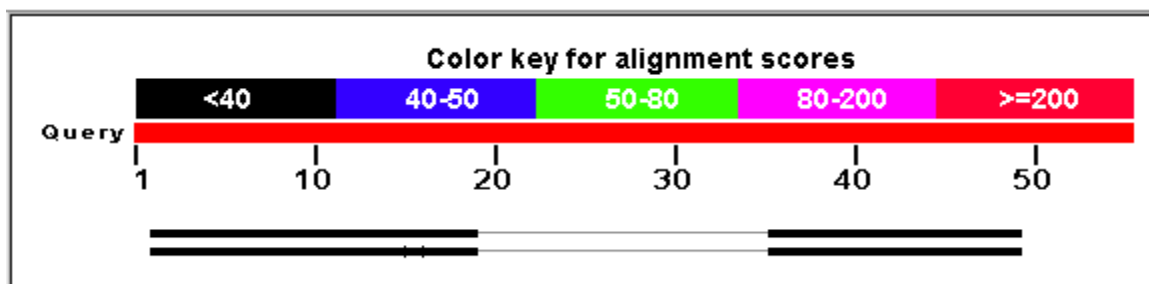


| Description | Max score | Total score | Query cover | E value | Ident | Accession |
|---|-----------|-------------|-------------|---------|-------|----------------------------|
| Micromonospora sp. L5, complete genome | 30.1 | 302 | 53% | 0.58 | 100% | CP002399.1 |
| Micromonospora aurantiaca ATCC 27029, complete genome | 30.1 | 300 | 55% | 0.58 | 100% | CP002162.1 |
| Micromonospora sp. NRRL B-16802 phosphonate biosynthetic gene cluster, partial sequence | 26.5 | 26.5 | 23% | 7.1 | 100% | KF386874.1 |
| Micromonospora chalcea tetrocarcin A gene cluster, complete sequence | 26.5 | 26.5 | 23% | 7.1 | 100% | EU443633.1 |
| Micromonospora echinospora calicheamicin biosynthetic locus, complete sequence | 26.5 | 26.5 | 23% | 7.1 | 100% | AF497482.1 |

7. BLASTn (NUCLEÓTIDOS) PARA EL GEN *canP3*.

canP3 for- (3'-CGCACCAGACCGAGCATCAT-5')

canP3 rev- (3'-GACGGCACGGTGGAAATCACT-5')



| Description | Max score | Total score | Query cover | E value | Ident | Accession |
|---|-----------|-------------|-------------|---------|-------|----------------------------|
| Micromonospora sp. L5, complete genome | 28.3 | 162 | 58% | 1.8 | 100% | CP002399.1 |
| Micromonospora aurantiaca ATCC 27029, complete genome | 28.3 | 134 | 58% | 1.8 | 100% | CP002162.1 |

BIBLIOGRAFÍA

- Aparicio, J. F., Molnár, I., Schwecke, T., König, A., Haydock, S. F., Khaw, L. E., Staunton, J. y Leadlay, P. F. (1996). Organization of the biosynthetic gene cluster for rapamycin in *Streptomyces hygroscopicus*: analysis of the enzymatic domains in the modular polyketide synthase. *Gene*. 169, 9-16.
- Aparicio, J. F., Colina, A. J., Ceballos, E. y Martín, J. F. (1999). The biosynthetic gene cluster for the 26-membered ring polyene macrolide pimaricin. *Journal of Biological Chemistry*. 274, 10133-10139.
- Aparicio, J. F., Fouces, R., Mendes, M. V., Olivera, N. y Martín, J. F. (2000). A complex multienzyme system encoded by five polyketide synthase genes is involved in the biosynthesis of the 26-membered polyene macrolide pimaricin in *Streptomyces natalensis*. *Chemistry & Biology*. 7, 895-905.
- Ara, I. y Kudo, T. (2007a). *Luedemannella* gen. nov., a new member of the family Micromonosporaceae and description of *Luedemannella helvata* sp. nov. and *Luedemannella flava* sp. nov. *Journal of General and Applied Microbiology*. 53, 39-51.
- Ara, I. y Kudo, T. (2007b). *Luedemannella* gen. nov. In List of new names and new combinations previously effectively, but not validly, published, Validation List no. 116. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 57, 1371-1373.
- Asano, K. y Kawamoto, I. (1986). *Catellatospora*, a new genus of the Actinomycetales. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 36, 512-517.
- Ayuso, A. y 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*. 49, 10-24.
- Baltz, R. H. (2006). Molecular engineering approaches to peptide, polyketide and other antibiotics. *Natural Biotechnology*. 24, 1533-1540.
- Bérdy, J. (2005). Bioactive microbial metabolites: a personal view. *Journal of Antibiotics*. 58, 1-26.
- Bevitt, D. J., Cortés, J., Haydock, S. F. y Leadlay, P. F. (1992). 6-Deoxyerythronolide B synthase from *Saccharopolyspora erythraea*. Cloning of the structural gene, sequence analysis and inferred domain structure of the multifunctional enzyme. *European Journal of Biochemistry*. 204, 39-49.
- Brautaset, T., Sekurova, O. N., Sletta, H., Ellingsen, T. E., Strom, A. R., Valla, S. y Zotchev, S. B. (2000). Biosynthesis of the polyene antifungal antibiotic nystatin in *Streptomyces noursei* ATCC 11455: analysis of the gene cluster and deduction of the biosynthetic pathway. *Chemistry & Biology*. 7, 395-403.
- Buchanan, R. E. (1916). Studies on the classification and nomenclature of the bacteria: VIII. The subgroups and genera of the Actinomycetales. *Journal of Bacteriology*. 111, 403-406.

- Bull, A. T., Stach, J. E. M., Ward, A. C. y Goodfellow M. (2005). Marine actinobacteria: Perspectives, challenges, future directions. *Antonie van Leeuwenhoek*. 87, 65–79.
- Caffrey, P., Lynch, S., Flood, E., Finnan, S., y Oliynyk, M. (2001). Amphotericin biosynthesis in *Streptomyces nodosus*: deductions from analysis of polyketide synthase and late genes. *Chemistry & Biology*. 8, 713–723.
- Campelo, A. y Gil, J. (2002). The candicidin gene cluster from *Streptomyces griseus* IMRU 3570. *Microbiology*. 148, 51-59.
- Cane, D. E., Walsh, C. T., y Khosla, C. (1998). Harnessing the biosynthetic code: combinations, permutations, and mutations. *Science*. 282, 63–68.
- Cárdenas-Perera, C. D. (2000). Levaduras del género *Candida* de procedencia clínica. Evaluación de métodos de identificación. *Tesis doctoral*. Universidad de la Laguna. España. 466 pp.
- Challis, G. L. (2008). Mining microbial genomes for new natural products and biosynthetic pathways. *Micobiology*. 154, 1555–1569.
- Chávez, G. A., Cabrera, R. A., Marín, R. M. del C., Villagómez, O. A., Méndez, R. R. y Guzmán, G. R. (2007). Incidencia y pronóstico de candidiasis invasora en pacientes no neutropénicos de terapia intensiva. *Medicina Interna de México*. 23(6), 481-485.
- Chen, S., Huang, X., Zhou, X., Bai, L., He, J., Jeong, K. J., Lee, S. J. y Deng, Z. (2003). Organizational and Mutational Analysis of a Complete FR008/Candicidin Gene Cluster Encoding a Structurally Related Polyene Complex. *Chemistry & Biology*. 10, 1065–1076.
- Cohen, M. L. (1992). Epidemiology of drug resistance: Implications for a post antimicrobial era. *Science*. 257, 1050-1055.
- Contreras, L., Fica, A., Figueroa, O., Enríquez, N., Urrutia, P., y Herrera, P. (2002). Resistencia de *Streptococcus pneumoniae* a penicilina y su asociación con factores clínicos y epidemiológicos. *Revista Médica de Chile*. 130, 26-34.
- Cortés, J., Haydock, S. F., Roberts, G. A., Bevitt, D. J. y Leadlay, P. F. (1990). An unusually large multifunctional polypeptide in the erythromycin-polyketide synthase of *Saccharopolyspora erythraea*. *Nature*. 348, 176-178.
- Couch, J. N. (1950). Actinoplanes. A new genus of the Actinomycetales. *Journal of the Elisha Mitchell Scientific Society*. 66, 87–92.
- Demain, A. (1997). Health, wealth and actinomycetes. *Xth International Symposium on biology of actinomycetes*. Beijing, China. 27-30.
- Donadio, S., Staver, M. J., McAlpine, J. B., Swanson, S. J. y Katz, L. (1991). Modular organization of genes required for complex polyketide biosynthesis. *Science*. 252, 675-679.
- Eisfeld, K. (2009). Chapter 15, Non-Ribosomal Peptide Synthetases of Fungi: 305-330. *Physiology and Genetics: Selected Basic and Applied Aspects*. Esser, K. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, Germany. 410 pp.
- Enache-Angoulvant, A. (2007). Reglas de interpretación de infecciones por

- Candida. *Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana*. 41(4), 587-593.
- Fang, J., Zhang, Y., Huang, L., Jia, X., Zhang, Q., Zhang, X., Tang, G. y Liu, W. (2008). Cloning and Characterization of the Tetrocarcin A Gene Cluster from *Micromonospora chalcea* NRRL 11289 Reveals a Highly Conserved Strategy for Tetrionate Biosynthesis in Spirotetrionate Antibiotics. *Journal of Bacteriology*. 190 (17), 6014–6025.
- Fenical, W. y Jensen, P. R. (2006). Developing a new resource for drug discovery: Marine actinomycete bacteria. *Nature Chemical Biology*. 2, 666–673.
- Fenical, W., Jensen, P. R., Palladino, M. A., Lam, K. S., Lloyd, G. K. y Potts, B. C. (2009). Discovery and development of the anticancer agent salinosporamide A (NPI-0052). *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. 17, 2175–2180.
- Fernández-Chimeno, R. I., Canedo, L., Espliego, F., Grávalos, D., De la Calle, F., Fernández-Puentes, J. L. y Romero, F. (2000). IB-96212, a novel cytotoxic macrolide produced by a marine *Micromonospora*. I. Taxonomy, fermentation, isolation and biological activities. *The Journal of Antibiotics*. 53(5), 474-478.
- Furumai, T., Maezawa, I., Matsuzawa, N., Yano, S., y Yamaguchi, T. (1977). Macrolide antibiotics M-4365 produced by *Micromonospora*. I. Taxonomy, production, isolation, characterization and properties. *The Journal of antibiotics*. 30(6), 443-449.
- Gao, B. y Gupta, R. S. (2012). Phylogenetic Framework and Molecular Signatures for the Main Clades of the Phylum *Actinobacteria*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 76 (1), 66.
- Gärtner, A., Ohlendorf, B., Schulz, D., Zinecker, H., Wiese, J., y Imhoff, J. F. (2011). Levantilides A and B, 20-membered macrolides from a *Micromonospora* strain isolated from the Mediterranean deep sea sediment. *Marine Drugs*. 9, 98-108.
- Giessen, T. W. y Marahiel, M. A. (2012). Ribosome-independent biosynthesis of biologically active peptides: Application of synthetic biology to generate structural diversity. *FEBS Letters*. doi:10.1016/j.febslet.2012.01.017
- Gil, J. A. y Campelo-Diez, A. B. (2003). Candicidin biosynthesis in *Streptomyces griseus*. *Applied and Environmental Microbiology*. 60, 633–642.
- Goodfellow, M., Mordarski, M., y Williams, S. T. (1984). The biology of the *Actinomycetes*. *Academic Press*. 14-17.
- Hatano, K., Higashide, E., y Shibata, M. (1976). Studies on juvenimicin, a new antibiotic I. *The Journal of Antibiotics*. 29, 1163–1170.
- Haydock, S. F., Aparicio, J. F., Molnar, I., Schwecke, T., Khaw, L. E., Konig, A., Marsden, A. F. A., Galloway, I. S., Staunton, J., y Leadlay, P. F. (1995). Divergent sequence motifs correlated with the substrate specificity of (methyl)malonyl-CoA:acyl carrier protein transacylase domains in modular polyketide synthases. *FEBS Letters*. 374, 246-248.
- Hirsch, P., Mevs, U., Kroppenstedt, R. M., Schumann, P. y Stackebrandt, E. (2004). Cryptoendolithic Actinomycetes from Antarctic Sandstone Rock Samples: *Micromonospora endolithica* sp. Nov. and two isolates related to *Micromonospora*

- coerulea Jensen 1932. *Systematic and Applied Microbiology*. 27, 166-174.
- Hirsch, A. M. y Valdés, M. (2009). Micromonospora: An important microbe for biomedicine and potentially for biocontrol and biofuels. *Soil Biology & Biochemistry*. 30, 1-7.
- Holt, J. G., Krieg, N. R., Sneath, P. H. A., Stanley, J. T. y Williams, S. T. (1994). *Bergey's Manual of determinative bacteriology*. 9th Edition. The Williams & Wilkins Co. Baltimore, Maryland. E.U.A. 532 pp.
- Hopwood, D. (2004). Cracking the poliketide code. *Plos Biology*. 2, 166.
- Hopwood, D. A. y Sherman, D. H. (1990). Molecular genetics of polyketides and its comparison to fatty acid biosynthesis. *Annual Review of Genetics*. 24, 37-66.
- Hopwood, D.A. (1999). Forty years of genetics with *Streptomyces*: from *in vivo* through *in vitro* to *in silico*. *Microbiology*. 145, 2183-2202.
- Hopwood, D. A. (2007). *Streptomyces in Nature and Medicine*. Oxford Univ. Press, New York.
- Hoskisson, P.A., Hobbs, G., y Sharples, G.P. (2001). Antibiotic production, accumulation of intracellular carbon reserves, and sporulation in *Micromonospora echinospora* (ATCC 15837). *Canadian Journal of Microbiology*. 47: 1-5 (2001).
- Hranueli, D., Peric, N., Borovicka, B., Bogdan, S., Cullum J., Waterman, P. y Hunter, I. (2001). Molecular biology polyketide biosynthesis. *Food Technology and Biotechnology*. 39(3), 203-213.
- Hudson, M. M. T. (2001). Antifungal resistance and over the counter availability in the UK: a current perspective. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 48, 345-350.
- Igarashi, Y., Ogura, H., Furihata, K., Oku, N., Indananda, C., y Thamchaipenet, A. (2011). Maklamicin, an antibacterial polyketide from an endophytic *Micromonospora* sp. *Journal of Natural Products*. 74(4), 670-674.
- Iizaka, Y., Higashi, N., Ishida, M., Oiwa, R., Ichikawa, Y., Takeda, M., Anzai, Y., y Kato, F. (2013). Function of cytochrome P450 enzymes RosC and RosD in the biosynthesis of rosamicin macrolide antibiotic produced by *Micromonospora rosaria*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 57 (3), 1529-1531.
- Imamura, N., Nishijima, M., Adachi, K., y Sano, H. (1993). Novel antimycin antibiotics, urauchimycins A and B, produced by marine actinomycete. *Journal of Antibiotics*. 46(2), 241-246.
- Ishizawa, S., Araragi, M. y Suzuki, T. (1969). Actinomycete flora of Japanese soils III. Actinomycete flora of paddy soils. *Soil Science and Plant Nutrition*. 15, 104-112.
- Jenke-Kodama, H. y Dittmann, E. (2009). Bioinformatic perspectives on NRPS/PKS megasynthases: Advances and challenges. *Natural Products Reports*. 26, 874-883.
- Jensen, P.R., Dwight, R. y Fenical, W. (1991). Distribution of actinomycetes in near-shore tropical marine sediments. *Applied and Environmental Microbiology*. 57, 1102-1108.
- Jørgensen, H. (2005). Analysis of genes for the biosynthesis of polyene macrocyclic

- compounds in streptomycetes isolated from the Trondheim Fjord. *Tesis doctoral*. Univesidad Noruega de Ciencia y Tecnología. Noruega. 88 pp.
- Jørgensen, H., Fjaervik, E., Hakvag, S., Bruheim, P., Bredholt, H., Klinkenberg, G., Ellingsen, T. E., y Zotchev, S. B. (2009). Candidicin biosynthesis gen cluster is widely distributed among *Streptomyces* spp. Isolated from the sediments and the neuston layer of the Trondheim Fjord, Norway. *Applied and Environmental Microbiology*. 75(10), 3296-3303.
- Kane, W. D. (1966). A new genus of Actinoplanaceae, *Pilimelia*, with a description of two species, *Pilimelia terevasa* and *Pilimelia anulata*. *Journal of the Elisha Mitchell Scientific Society*. 82, 220–230.
- Kawamoto, I. (1989). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Volume 4. Section 28: actinoplanetes. Genus *Micromonospora*, 2442-2450 pp.
- Keller, N. P., Turner, G. y Bennett, J. W. (2005). Fungal secondary metabolism from biochemistry to genomics. *Nature Reviews Microbiology*. 3, 937-947.
- Koch, C., Kroppenstedt, R. M., Rainey, F. A. y Stackebrandt, E. (1996). 16S ribosomal DNA analysis of the genera *Micromonospora*, *Actinoplanes*, *Catellatospora*, *Catenuloplanes*, *Couchioplanes*, *Dactylosporangium*, and *Pilimelia* and emendation of the family Micromonosporaceae. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 46, 765–768.
- Kondo, S., Yasui, K., Natsume, M., Katayama, M., y Marumo, S. (1988). Isolation, physicochemical properties and biological activity of pamamycin-607, an aerial mycelium inducing substance from *Streptomyces alboniger*. *Journal of Antibiotics*. 41, 1196–1204.
- Kontoyiannis, D. P. y Lewis, R. E. (2002). Antifungal drug resistance of pathogenic fungi. *Lancet*. 359, 1135-44.
- Kotowska, M., Pawlik, K., Butler, A. R., Cundliffe, E., Takano, E., y Kuczek, K. (2002). Type II thioesterase from *Streptomyces coelicolor* A3 (2). *Microbiology*. 148(6), 1777-1783.
- Krasil'nikov, N. A. (1938). *Ray Fungi and Related Organisms – Actinomycetales*. *Proceedings of the Russian Academy of Sciences*.
- Kunin, C. M. (1993). Resistance to antimicrobial drugs a worlwide calamity. *Annals of Internal Medicine*. 118, 557-561.
- Kwon, H. C., Kauffman, C. A. y Jensen, P. R. (2006) Marinomycins a-d, antitumor antibiotics of a new structure class from a marine actinomycete of the recently discovered genus *Marinispora*. *Journal of the American Chemical Society*. 128,1622–1632.
- Lazzarini, A., L. Cavaletti, G. Toppo y Marinelli, F. (2000). Rare genera of Actinomycetes as potential producers of new antibiotics. *Antonie van Leeuwenhoek*. 78, 399-405.
- Lechevalier, H., Acker, R. F., Corke, C. T., Haenseler, C. M. y Waksman, S. A. (1953). Candidicin, a new antifungal antibiotic. *Mycologia*. 45, 155–171.
- Lechevalier, H. (1960). Comparison of the in vitro activity of four polyenic antifungal

- antibiotics. *Antibiotics*. 7, 614-618.
- Lechevalier, M. P. (1977). Lipids in bacterial taxonomy - a taxonomist's view. *Critical Reviews in Microbiology*. 5, 109 –210.
- Lee, S. D. y Hah, Y. C. (2002). Proposal to transfer *Catellatospora ferruginea* and '*Catellatospora ishikariense*' to *Asanoa* gen. nov. as *Asanoa ferruginea* comb. nov. and *Asanoa ishikariense* sp. nov., with emended description of the genus *Catellatospora*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 52, 967–972.
- Leiva, S., Yañez, M. y Zaror, L. (2004). Actividad antimicrobiana de actinomicetos aislados desde ambientes acuáticos del sur de Chile. *Revista Médica de Chile*. 132, 151-159.
- Lombó, F., Velasco, A., Castro, A., Calle, F. de la, Braña, A. F., Sanchez-Puelles, J. M., Méndez, C. y Salas, J. A. (2006). Deciphering the biosynthesis pathway of the antitumor thiocoraline from a marine Actinomycete and its expression in two *Streptomyces* species. *ChemBioChem*. 7, 366-378.
- Macherla, V. R., Liu, J., Bellows, C. (2005). Glaciapyrroles A, B, and C, pyrrolosequiterpenes from a *Streptomyces* sp. isolated from an Alaskan marine sediment. *Journal of Natural Products*. 68, 780–783.
- Magarvey, N. A., Keller, J. M., Bernan, V., Dworkin, M., y Sherman, D. H. (2004). Isolation and characterization of novel marine-derived actinomycete taxa rich in bioactive metabolites. *Applied and Environmental Microbiology*. 70, 7520–7529.
- Maldonado, L. A., Stach, J. E. M., Pathom-aree, W., Ward, A. C., Bull, A. T., y Goodfellow, M. (2005a) Diversity of cultivable actinobacteria in geographically widespread marine sediments. *Antonie van Leeuwenhoek*. 87, 11-18.
- Maldonado, L. A., Fenical, W., Jensen, P. R., Kauffman, C. A., Mincer, T. J., Ward, A. C., Bull, A. T. y Goodfellow, M. (2005b). *Salinispora arenicola* gen. nov., sp. nov. and *Salinispora tropica* sp. nov., obligate marine actinomycetes belonging to the family Micromonosporaceae. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 55, 1759–1766.
- Maldonado, L. A., Stach, J. E., Ward, A. C., Bull, A. T. y Goodfellow, M. (2008). Characterisation of Micromonosporae from aquatic environments using molecular taxonomic methods. *Antonie van Leeuwenhoek*. 94, 289-298.
- Manam, R. R., Teisan, S., y White, D. J. (2005). Lajollamycin, a nitrotetraene spiro-b-lactone-g-lactam antibiotic from the marine actinomycete *Streptomyces nodosus*. *Journal of Natural Products*. 68, 240–243.
- Marquez, J. A., Kershner, A., Triuumees, I., Testa, R. T., Wagman, G. H. y Weinstein, M. J. (1976). Erythromycin production by *Micromonospora* sp. 1225. 172nd *National Meeting of American Chemical Society*. Aug. 29- Sept. 3.
- Maskey, R. P., Helmke, E., y Kayser, O. (2004). Anti-cancer and antibacterial trioxacarcins with high anti-malaria activity from a marine streptomycete and their absolute stereochemistry. *Journal of Antibiotics*. 57, 771–779.

- Matsumoto, A., Takahashi, Y., Shinose, M., Seino, A., Iwai, Y. y Omura, S. (2003). *Longispora albida* gen. nov., sp. nov., a novel genus of the family Micromonosporaceae. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 53, 1553–1559.
- McAlpine, J. B., Bachmann, B. O., Pirae, M., Tremblay, S., Alarco, A. M., Zazopoulos, E., y Farnet, C. M. (2005). Microbial genomics as a guide to drug discovery and structural elucidation: ECO-02301, a novel antifungal agent, as an example. *Journal of Natural Products*. 68, 493-496.
- Mehta, R. T., Hopfer, R. L., Gunner, L. A., Juliano, R. L. y Lopez-Berestein, G. (1987). Formulation, toxicity, and antifungal activity in vitro of liposome-encapsulated nystatin as therapeutic agent for systemic candidiasis. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 31 (12): 1897-1900.
- Mendes, T. D., Borges, W. S., Rodrigues, A., Solomon, S. E., Vieira, P. C., Duarte, M. C. T., y Pagnocca, F. C. (2013). Anti-*Candida* properties of urauchimycins from Actinobacteria associated with *Trachymyrmex* ants. *BioMed Research International*. 2013, 1-9. <http://dx.doi.org/10.1155/2013/835081>.
- Menzella, H. G., Reid, R., Carney, J. R., Chandran, S. S., Reisinger, S. J., Patel, K. G., Hopwood, D. A., y Santi, D. V. (2005). Combinatorial polyketide biosynthesis by *de novo* design and rearrangement of modular polyketide synthase genes. *Nature Biotechnology*. 23, 1171-1176.
- Mincer, T. J., Jensen, P. R., Kauffman, C. A. y Fenical, W. (2002). Widespread and persistent populations of a major new marine actinomycete taxon in ocean sediments. *Applied and Environmental Microbiology*. 68, 5005–5011.
- Mólnar, I., Aparicio, J. F., Haydock, S. F., Khaw, L. E., Schwecke, T., König, A., Staunton, J., y Leadlay, P. F. (1996). Organization of the biosynthetic gene cluster for rapamycin in *Streptomyces hygrosopicus*: analysis of genes flanking the polyketide synthase. *Gene*. 169, 1–7.
- Monciardini, P., Sosio, M., Cavaletti, L., Chiocchini, C., y Donadio, S. (2002). New PCR primers for the selective amplification of 16S rDNA from different groups of actinomycetes. *FEMS Microbiology Ecology*. 42, 419-429.
- Moore, B. S. y Hopke, J. N. (2001). Discovery of a new bacterial polyketide biosynthetic pathway. *ChemBiochem*. 2(1), 35-38.
- Nakayama, K., Yamaguchi, T., Doi, T., Usuki, Y., Taniguchi, M. y Tanaka, T. (2002). Synergistic combination of direct plasma membrane damage and oxidative stress as a cause of antifungal activity polyol macrolide antibiotic niphimycin. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 94(2), 207-211.
- Neu, H. C. (1992). The crisis in antibiotic resistance. *Science*. 257, 1064-1073.
- O’Keefe, D. P., Gibson, K. J., Emptage, M. H., Lenstra, R., Romesser, J. A, Litle, P. J., y Omer, C. A. (1991). Ferredoxins from two sulfonyleurea herbicide monooxygenase systems in *Streptomyces griseus*. *Biochemistry*. 30, 447–455.
- Ohta, E., Ohta, S., Kubota, N. K., Suzuki, M., Ogawa, T., Yamasaki, A., e Ikegami, S.

- (2001). Micromonosporide A, a new macrolide from *Micromonospora* sp. *Tetrahedron Letters*. 42, 4179–4181.
- Omura, S., y Tanaka, H. (1984). Production, structure, and antifungal activity of polyene macrolides, p. 351-404. En S. Omura (ed.) *Macrolide Antibiotics. Chemistry, Biology and Practice*, 1st ed. Academic Press, Inc., Orlando, FL.
- Omura, S., Imamura, N., Oiwa, R., Kuga, H., Iwata, R., Masuma, R. e Iwai, Y. (1986). Clostomicins, new antibiotics produced by *Micromonospora echinospora* subsp. *armeniaca* subsp. nov. I. Production, isolation and physiochemical and biological properties. *The Journal of Antibiotics*. 39, 1407-1412.
- Ørskov, J. (1923). *Investigation into the Morphology of the Ray Fungi*. Copenhagen: Levin & Munksgaard.
- Pérez-Gavilán, T. (2003). Pruebas de susceptibilidad in vitro con antifúngicos en células planctónicas y en biofilms de *Candida parapsilosis*. *Tesis de maestría*. Universidad Autónoma de Nuevo León. México. 79 pp.
- Qiu, D., Ruan, J., y Huang, Y. (2008). Selective Isolation and Rapid Identification of Members of the Genus *Micromonospora*. *Applied and Environmental Microbiology*. 74(17), 5593–5597
- Rheims, H., Schumann, P., Rhode, M. y Stackebrandt, E. (1998). *Verrucosipora gifhornensis* gen. nov., sp. nov., a new member of the actinobacterial family Micromonosporaceae. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 48, 1119–1127.
- Rivas, R., Sánchez, M., Trujillo, M. E., Zurdo-Piñeiro, J. L., Mateos, P. F., Martínez-Molina, E. y Velázquez, E. (2003). *Xylanimonas cellulosityca* gen. nov., sp. nov., a xylanolytic bacterium isolated from a decayed tree (*Ulmus nigra*). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 53, 99-103.
- Rodríguez-Martínez, R. (2008). Análisis de la población bacteriana endófito presente en nódulos de *Lupinus*: interacción y localización *in situ*. *Tesis de doctorado*. Universidad de Salamanca. España. 236 pp.
- Sanz, L. de A. A. (2005). Aislamiento y caracterización de genes de la ruta biosintética de un antifúngico oxopentaeno producido por *Streptomyces* sp. *Tesis Doctoral*. Universidad de Alcalá. Madrid, España. 178 pp.
- Satoi, S., Muto, N., Hayashi, M., Fujii, T. y Otani, M. (1980). Mycinamicins, new macrolide antibiotics. I Taxonomy, production, isolation, characterization and properties. *The Journal of Antibiotics*. 33(4), 364-376.
- Saxena, P. y Yadav, G. (2003). A new family of type III polyketide synthase in *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of Biological Chemistry*. 278(45), 44780-44790.
- Schneemann, I., Nagel, K., Kajahn, I., Labes, A., Wiese, J., y Imhoff, J. F. (2010). Comprehensive Investigation of Marine *Actinobacteria* Associated with the Sponge *Halichondria panacea*. *Applied and Environmental Microbiology*. 76(11), 3702-3715.

- Schwecke, T., Aparicio, J. F., Molnár, I., König, A., Ee Khaw, L., Haydock, S. F., Oliynyk, M., Caffrey, P., Cortés, J., Lester, J. B., Böhm, G. A., Staunton, J., y Leadlay, P. (1995). The biosynthetic gene cluster for the polyketide immunosuppressant rapamycin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 92, 7839-7843.
- Seco, E., Pérez Zúñiga, F. J., Rolón, S. y Malpartida, F. (2004). Starter Unit Choice Determines the Production of Two Tetraene Macrolides, Rimocidin and CE-108. in *Streptomyces diastaticus* var., 108. *Chemistry & Biology*. 11, 357-366.
- Seipke, R. F., Kaltenpoth, M. y Hutchings, M.I. (2012). Streptomyces as symbionts: an emerging and widespread theme?. *FEMS Microbiology Reviews*. 36, 862–876.
- Stackebrandt, E., Rainey, F. A. y Ward-Rainey, N. L. (1997). Proposal for a new hierarchic classification system, Actinobacteria classis nov. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 47, 479–491.
- Stackebrandt, E. y Schumann, P. (2006). Introduction to the taxonomy of Actinobacteria. En: Falkow, S., Rosenberg, E., Schleifer, K. H., Stackebrandt, E. *The Prokaryotes*. 3rd edn. Vol. 3: Archaea. Bacteria: Firmicutes, Actinomycetes. Nueva York: Springer.
- Stephenson, J. (1997). Investigators seeking new ways to stem rising tide of resistant fungi. *Journal of the American Medical Association*. 277, 5-6.
- Suárez, J. E. y Hardisson, C. (1985). Morphological Characteristics of Colony Development in *Micromonospora chalcea*. *Journal of Bacteriology*. 162(3), 1342-1344.
- Takesako, K. y Beppu, T. (1985). Demalonyl derivatives of guanidylfungin A and copiamycin: their synthesis and antifungal activity. *Journal of Antibiotics*. 38(10), 1363-1369.
- Tamaoki, T., Kasai, M., Shirahatas, K., Ohkubo, S., Morimoto, M., Mineura, K., Ishii, S. y Tomita, F. (1980). Tetrocarcins, novel antitumor antibiotics. II. Isolation, characterization and antitumor activity. *The Journal of Antibiotics*. 33, 946-950.
- Tamura, T., Nakagaito, Y., Nishii, T., Hasegawa, T., Stackebrandt, E. y Yokota, A. (1994). A genus of the order Actinomycetales, *Couchioplanes* gen. nov., with descriptions of *Couchioplanes caerulens* (Horan and Brodsky 1986) comb. nov. and *Couchioplanes caerulens* subsp. azurens subsp. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 44, 193–203.
- Tamura, T., Hayakawa, M. y Hatano, K. (1997). A new genus of the order Actinomycetales, *Spirilliplanes* gen. nov., with description of *Spirilliplanes yamanashiensis* sp. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 47, 97–102.
- Tamura, T., Hayakawa, M. y Hatano, K. (2001). A new genus of the order Actinomycetales, *Virgisporangium* gen. nov., with descriptions of *Virgisporangium ochraceum* sp. nov. and *Virgisporangium aurantiacum* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 51, 1809–1816.
- Tamura, T., Hatano, K. y Suzuki, K. (2006). A new genus of the family Micromonosporaceae, *Polymorphospora* gen. nov., with description of

- Polymorphospora rubra sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 56, 1959–1964.
- Thawai, C., Tanasupawat, S., Itoh, T., Suwanborirux, K. y Kudo, T. (2005). *Micromonospora ebyrnea* sp. nov., isolated from Thai peat swamp forest. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 55, 417-422.
- Thawai, C., Tanasupawat, S., Itoh, T. y Kudo, T. (2006). *Actinocatenispora thailandica* gen. nov., sp. nov., a new member of the family Micromonosporaceae. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 56, 1789–1794.
- Thiemann, J. E., Pagani, H. y Beretta, G. (1967). A new genus of the Actinoplanaceae: *Dactylosporangium* gen. nov. *Archives of Microbiology*. 58, 42–52.
- Tomita, F., y Tamaoki, T. (1980). Tetrocarcins, novel antitumor antibiotics. I. Producing organism, fermentation and antimicrobial activity. *The Journal of Antibiotics*. 33, 940–945.
- Ventura, M., Canchaya, C., Tauch, A., Chandra, G., Fitzgerald, G. F., Chater, K. F. y van Sinderen, D. (2007) Genomics of actinobacteria: tracing the evolutionary history of an ancient phylum. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 71: 495–548.
- Wagman, G. H., Waitz, J. A., Marquez, J., Murawski, A., Oden, E. M., Testa, R. T. y Weinstein, M. J. (1972). A new *Micromonospora*-produced macrólido antibiotic, Rosamicin. *The Journal of Antibiotics*. 25(2), 641-646.
- Waitz, J. A., Moss, E. L., Oden, E. y Weinstein, M. J. (1969). Biological activity of Megalomicin, a new *Micromonospora*-produced macrolide antibiotic complex. *The Journal of Antibiotics*. 22(6), 265-272.
- Wakil, S. J. (1989). Fatty acid synthase, a proficient multifunctional enzyme. *Biochemistry*. 28, 4523-4530.
- Waksman, S. A. y Henrici, A. T. (1943). The nomenclature and classification of the actinomycetes. *Journal of Bacteriology*. 46, 337-341.
- Waksman, S. A., Lechevalier, H. A. y Schaffner, C. P. (1965). Candicidin and Other Polyenic Antifungal Antibiotics. A Review. *Bulletin of the World Health Organization*. 33, 219-226.
- Ward, A. C., y Bora, N. (2006). Diversity and biogeography of marine actinobacteria. *Current Opinion in Microbiology*. 9, 279–286.
- Weber, J. M., Leung, J. O., Swanson, S. J., Idler, K. B., y McAlpine, J. B. (1991). An erythromycin derivative produced by targeted gene disruption in *Saccharopolyspora erythraea*. *Science*. 252, 114-117.
- Weinstein, M. J., Wagman, G. H., Marquez, J. A., Testa, R. T., Oden, E. y Waitz, J. A. (1969). Megalomicin, a new macrolide antibiotic produced by *Micromonospora*. *Journal of Antibiotics*. 22, 253-258.
- Yokota, A., Tamura, T., Hasegawa, T. y Huang, L. H. (1993). *Catenuloplanes japonicus* gen. nov., sp. nov., nom. rev., a new genus of the order Actinomycetales. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 43, 805–812.
- Zengler, K., Toledo, G., Rappé, M., Elkins, J., Mathur, E. J., Short, J. M., y Keller M.

- (2002). Culturing the uncultured. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 99, 15681-15689.
- Zhao, H., Kassama, Y., Young, M., Kell, D. B. y Goodacre, R. (2004). Differentiation of *Micromonospora* isolates from a coastal sediment in Wales on the basis of fourier transform infrared spectroscopy, 16S rRNA sequence analysis, and the amplified fragment length polymorphism technique. *Applied and Environmental Microbiology*. 70, 6619-6627.
- Zhao, X. Q., Jiao, W., Jiang, B., Yuan, W. J., Yang, T. H., y Hao, S. (2009). Screening and identification of actinobacteria from marine sediments: Investigation of potential producers for antimicrobial agents and type I polyketides. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 25, 859-866.
- Zotchev, S. B. (2003). Polyene Macrolide Antibiotics and their Applications in Human Therapy. *Current Medicinal Chemistry*. 10, 211-223.