



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO (UNAM)
POSGRADO EN CIENCIAS DEL MAR Y LIMNOLOGÍA**

UNIDAD ACADÉMICA DE CIENCIAS Y TECNOLOGÍA DE LA UNAM EN YUCATÁN
FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM – SISAL, YUCATÁN
(QUÍMICA ACUÁTICA)

**“BIOGEOGRAFÍA DE CEPAS DE *Salinispora arenicola* EVIDENCIADA
POR EL TIPO DE METABOLITOS SECUNDARIOS QUE PRODUCEN”**

TESIS

**QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE
MAESTRA EN CIENCIAS**

PRESENTA

BIÓL. NATALIA CHÁVEZ CARABANTES

DIRECTORA DE TESIS

DRA. ALEJANDRA PRIETO DAVÓ³

COMITÉ TUTOR

**DRA. JUDITH SÁNCHEZ RODRÍGUEZ¹
DR. MANUEL BENIGNO AGUILAR RAMÍREZ²
DR. SERGIO RODRÍGUEZ MORALES³
DR. LUIS MANUEL PEÑA RODRÍGUEZ⁴
ASESOR EXTERNO: DR. PAUL R. JENSEN⁵**

1. Instituto de Ciencias del Mar y Limnología, UNAM – Campus Puerto Morelos.
2. Instituto de Neurobiología – UNAM. Juriquilla, Querétaro.
3. Unidad Académica de Ciencias y Tecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) en Yucatán
4. Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C. (CICY) - Unidad Académica: Biotecnología.
5. Scripps Institution of Oceanography, UC San Diego.

SISAL, YUCATÁN - JUNIO, 2016.



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO (UNAM)

“BIOGEOGRAFÍA DE CEPAS DE *Salinispora arenicola* EVIDENCIADA POR EL TIPO DE METABOLITOS SECUNDARIOS QUE PRODUCEN”

T E S I S

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO ACADÉMICO DE

**MAESTRA EN CIENCIAS
(Química Acuática)**

P R E S E N T A:

BIÓL. NATALIA CHÁVEZ CARABANTES

DIRECTORA DE TESIS:

DRA. ALEJANDRA PRIETO DAVÓ³

COMITÉ TUTOR:

**DRA. JUDITH SÁNCHEZ RODRÍGUEZ¹
DR. MANUEL BENIGNO AGUILAR RAMÍREZ²
DR. SERGIO RODRÍGUEZ MORALES³
DR. LUIS MANUEL PEÑA RODRÍGUEZ⁴
ASESOR EXTERNO: DR. PAUL R. JENSEN⁵**

1. Instituto de Ciencias del Mar y Limnología, UNAM – Puerto Morelos.
2. Instituto de Neurobiología – UNAM. Juriquilla, Querétaro.
3. Unidad Académica de Ciencias y Tecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) en Yucatán
4. Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C. (CICY) - Unidad Académica: Biotecnología.
5. Scripps Institution of Oceanography, UC San Diego.

SISAL, YUCATÁN - JUNIO, 2016.



CONACYT
Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología

El presente estudio se realizó en el Laboratorio de Química A, de la Facultad de Química en la Unidad Académica de Ciencias y Tecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) de Yucatán por medio del Posgrado en Ciencias del Mar y Limnología (ICMyL), bajo la dirección de la Dra. Alejandra Prieto Davó, con una beca (CVU: 544689) proporcionada por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT).

Agradecimientos

Al programa de Posgrado en Ciencias del Mar y Limnología de la Universidad Nacional Autónoma de México (ICMyL, UNAM) por el excelente programa de posgrado de alta calidad académica con el que cuentan y que formó parte indispensable en mi desarrollo profesional.

Al Consejo Nacional de Ciencias y Tecnología (CONACYT), por el apoyo brindado para la realización de este trabajo de maestría por medio de la beca otorgada durante mis estudios (CVU: 544689).

A mi directora de Tesis, Dra. Alejandra Prieto Davó. Le agradezco su apoyo incondicional en mi trabajo, así como su tiempo y dedicación para compartir su conocimiento para guiar mis ideas, ha sido un aporte invaluable. Agradezco también el haberme facilitado siempre los medios suficientes para llevar a cabo todas las actividades propuestas durante el desarrollo de esta tesis. Muchas gracias.

A los miembros de mi jurado de maestría: Dra. Judith Sánchez Rodríguez, Dr. Manuel B. Aguilar Ramírez, Dr. Sergio Rodríguez Morales, Dr. Luis Manuel Peña Rodríguez y Dr. Paul R. Jensen, por compartir su tiempo, conocimiento y sabiduría en la revisión y excelentes recomendaciones para una mejor redacción de este trabajo.

A mi compañera M. en C. Yessica Parera, por la identificación molecular de la especie *Salinispora arenicola* y al personal técnico en Scripps Institution of Oceanography, UC San Diego, por el análisis de las muestras en el equipo de espectrometría de masas de alta resolución de su laboratorio.

Dedicatoria

La presente tesis está dedicada a las personas que más influencia tienen en mi vida, dándome los mejores consejos así como palabras llenas de sabiduría y motivación cuando más las he necesitado. A mi mamá por ser el pilar en mi vida, quien siempre me ha dado su amor, confianza y apoyo incondicional en las decisiones que he tomado en mi camino profesional. A mi papá por inculcarme valores para dar pasos llenos de firmeza y enfrentar los retos de cada día. A mis hermanos, por ser mis amigos y brindarme siempre excelentes consejos.

¡Muchas Gracias!

ÍNDICE DE CONTENIDO

ÍNDICE.....	I
ÍNDICE DE FIGURAS.....	IV
ÍNDICE DE TABLAS.....	VIII
ABREVIATURAS Y FÓRMULAS.....	IX
RESUMEN.....	XI
ABSTRACT.....	XII

ÍNDICE	Página
Capítulo I.	
INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 ANTECEDENTES.....	3
1.1.2 Biogeografía de microorganismos marinos.....	3
1.1.3 Actinomicetos en ambientes marinos.....	6
1.1.4 Papel ecológico de los actinomicetos en ambientes marinos.....	7
1.1.5 Orden Actinomycetales: primeros indicios del género <i>Salinispora</i>	8
1.1.6 Distribución geográfica del género <i>Salinispora</i>	9
1.1.7 Metabolitos secundarios producidos por <i>Salinispora</i>	10
1.1.8 Salinosporamida A.....	17
1.2 HIPÓTESIS.....	18
1.3 OBJETIVOS.....	18
1.3.1 Objetivo general.....	18
1.3.2 Objetivos específicos.....	18

*Biogeografía de cepas de *Salinispora arenicola* evidenciada por el tipo de metabolitos secundarios que producen*

1.4 JUSTIFICACIÓN	19
1.5 ÁREA DE ESTUDIO.....	20
1.5.1 Golfo de California (Mar de Cortés).....	20
1.5.2 Mar Caribe.....	21
Capítulo II.	
MÉTODOS.....	23
2.1 Trabajo en campo.....	23
2.1.1 Colecta y procesamiento de las muestras.....	23
2.2 Diseño experimental.....	24
2.2.1 Aislamiento de cepas de <i>Salinispora</i>	24
2.2.2 Procesamiento de cepas criogenizadas (Reactivación).....	25
2.2.3 Cultivo de cepas aisladas.....	26
2.2.4 Obtención de ADN genómico.....	26
2.2.5 Identificación de cepas por métodos moleculares.....	27
2.2.5.1 PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa).....	27
2.2.5.1.1 Oligonucleótidos empleados en el análisis de PCR.....	27
2.2.6 Protocolo de cultivo de <i>Salinispora</i> usando rojo fenol.....	28
2.3 Extractos crudos.....	30
2.3.1 Extracción líquido-líquido.....	30
2.3.1.1 Procedimiento experimental.....	30
2.3.1.2 Etapas de la extracción líquido-líquido.....	31
2.4 Análisis de los extractos crudos a partir de cepas de <i>S. arenicola</i>	34
2.4.1 Análisis de extractos crudos por el método de Cromatografía de Líquidos acoplado a detector de masas de alta resolución.	34
2.4.1.1 Técnica analítica de ionización por ElectroSpray en el detector de masas de alta resolución Q-TOF MS.....	35

2.4.1.2 Procedimiento para el manejo de archivos de cromatografía LC-HRMS y espectrometría de MS.....	37
Capítulo III.	
RESULTADOS.....	41
3.1 Peso total de los extractos crudos.....	41
3.2 Análisis de dereplicación en la plataforma: The Global Natural Products Social Molecular Networking (GNPS) para los iones con parentescos esperados.....	41
3.3 Red molecular correspondiente a los espectros de MS de <i>S. arenicola</i>	43
3.4 Metabolitos secundarios identificados mediante Cromatografía LC-HRMS y espectrometría de MS en <i>S. arenicola</i>	46
3.4.1 Salinicetal A - Cepa AMS 155.....	46
3.4.2 Salinicetal A - Cepa S 680.....	46
3.4.3 Estaurosporina - Cepa S 680.....	55
3.4.4 Arenimicina B - Cepa NCA 087.....	59
Capítulo IV.	
DISCUSIÓN.....	63
4.1 Conclusiones.....	72
4.2 Perspectivas.....	74
Capítulo V.	
REFERENCIAS.....	75
Capítulo VI.	
ANEXO.....	92

ÍNDICE DE FIGURAS	Página
Figura 1. a) <i>S. arenicola</i> b) <i>S. tropica</i> c) <i>S. pacifica</i>	8
Figura 2. Distribución global del género <i>Salinispora</i>	9
Figura 3. Área de estudio.....	22
Figura 4. Imágenes tomadas durante la colecta con la draga de sedimento.....	23
Figura 5. Procedimiento para la separación de las fases orgánica y acuosa.....	31
Figura 6. Procedimiento para la obtención de extractos crudos de <i>S. arenicola</i>	33
Figura 7. Red molecular correspondiente a los espectros de MS de <i>S. arenicola</i> y grupos de similitud.....	45
Figura 8 a. Cromatograma LC-HRMS correspondiente a la cepa AMS 155 del Golfo de California.....	48
b. Perfil cromatográfico LC-HRMS correspondiente al metabolito secundario Salinicetal A, cepa AMS 155.....	48
c. Espectro de MS correspondiente a la cepa AMS 155 del Golfo de California.....	49
d. Ampliación del espectro de MS, cepa AMS 155. Salinicetal A: Ión molecular $m/z = 418.262 [M+Na]^+$:	49
e. Espectro del patrón de fragmentación del metabolito secundario	

Biogeografía de cepas de Salinispora arenicola evidenciada por el tipo de metabolitos secundarios que producen

Salinicetal A de la biblioteca GNPS con señales de m/z menores al ión molecular.....	50
f. Serie isotópica, se muestra el ión molecular siendo la m/z = 418.262 [M+Na] ⁺ monoisotópica.....	50
g. Patrón de fragmentación del compuesto Salinicetal A.....	50
h. Serie isotópica con señales ~419, 420 y 421, siendo la m/z = 418.262 [M+Na] ⁺ monoisotópica.....	50
Figura 9 a. Cromatograma LC-HRMS correspondiente a la cepa S 680 del Golfo de California.....	51
b. Perfil cromatográfico LC-HRMS correspondiente al metabolito secundario Salinicetal A, cepa S 680.....	51
c. Espectro de MS correspondiente a la cepa S 680 del Golfo de California.....	52
d. Ampliación del espectro de MS, cepa S 680. Salinicetal A: Ión molecular m/z= 418.262 [M+Na] ⁺ :.....	52
e. Espectro del patrón de fragmentación del metabolito secundario Salinicetal A de la biblioteca GNPS con señales de m/z menores al ión molecular.....	53
f. Serie isotópica, se muestra el ión molecular siendo la m/z = 418.262 [M+Na] ⁺ monoisotópica.....	53
g. Patrón de fragmentación del compuesto Salinicetal A.....	53

Biogeografía de cepas de Salinispora arenicola evidenciada por el tipo de metabolitos secundarios que producen

h. Serie isotópica con señales ~419, 420 y 421, siendo la $m/z = 418.262$ $[M+Na]^+$ monoisotópica.....	53
i. Comparación del patrón de fragmentación del espectro de MS (superior) con el de la biblioteca GNPS (inferior). Salinicetal A, cepa S 680.....	54
j. Ampliación de la comparación del espectro de MS (superior) con el de la biblioteca GNPS (inferior). Salinicetal A, cepa S 680.....	54
Figura 10 a. Cromatograma LC-HRMS correspondiente a la cepa S 680 del Golfo de California.....	56
b. Perfil cromatográfico LC-HRMS correspondiente al metabolito secundario Estaurosporina, cepa S 680.....	56
c. Espectro de MS correspondiente a la cepa S 680 del Golfo de California.....	57
d. Ampliación del espectro de MS, cepa S 680. Estaurosporina. Ión molecular $m/z= 467.21$ $[M+H]^+$	57
e. Comparación del patrón de fragmentación del espectro de MS (superior) con el de la biblioteca GNPS (inferior). Estaurosporina, cepa S 680.....	58
f. Ampliación de la comparación del espectro de MS (superior) con el de la biblioteca GNPS (inferior). Estaurosporina, cepa S 680.....	58
Figura 11 a. Cromatograma LC-HRMS correspondiente a la cepa NCA 087 del Mar Caribe.....	60
b. Perfil cromatográfico LC-HRMS correspondiente al metabolito secundario	

Biogeografía de cepas de Salinispora arenicola evidenciada por el tipo de metabolitos secundarios que producen

Arenimicina B, cepa NCA 087.....	60
c. Espectro de MS correspondiente a la cepa NCA 087 del Mar Caribe.....	61
d. Ampliación del espectro de MS, cepa NCA 087. Arenimicina B. Ión molecular $m/z=809.325$ $[M+H]^+$	61
e. Comparación del patrón de fragmentación del espectro de MS (superior) con el de la biblioteca GNPS (inferior). Arenimicina B, cepa NCA 087.....	62
f. Ampliación de la comparación del espectro de MS (superior) con el de la biblioteca GNPS (inferior). Arenimicina B, cepa NCA 087.....	62

ÍNDICE DE TABLAS	Página
Tabla 1. Metabolitos secundarios reportados para <i>Salinispora</i> spp. (Jensen <i>et al.</i> , 2015).....	10
Tabla 2. Estructura química de los metabolitos secundarios reportados en <i>Salinispora</i> spp.....	11
Tabla 3. Contenido del medio de cultivo A1 para un litro de agua de mar..	24
Tabla 4 y 5. Cepas de <i>Salinispora arenicola</i> aisladas a partir de sedimentos en el Golfo de California y el Mar Caribe.....	25
Tabla 6. Secuenciación de ADN genómico. Oligonucleótidos y condiciones de PCR.....	28
Tabla 7. Propiedades químicas del acetato de etilo (AcOEt).....	30
Tabla 8. Iones aducto más comunes que se forman durante la técnica analítica por ElectroSpray (ESI, en inglés).....	36
Tabla 9 y 10. Peso total de los extractos crudos y rendimiento celular (mg/mL) a partir de cepas del Golfo de California y el Mar Caribe.....	41
Tabla 11. Metabolitos secundarios identificados mediante la biblioteca GNPS, red molecular y espectros de MS de <i>S. arenicola</i>	42
Tabla 12. Compuestos asociados a los espectros de MS de las cepas de <i>S. arenicola</i> a partir del análisis de dereplicación. Se indica el ión molecular $[M+H]^+$ a mediante el cual se realizó la comparación.....	93
Tabla 13 a y b. Diferencia de masa (Da) entre las moléculas identificadas en las bibliotecas GNPS con respecto a los espectros de MS de <i>S. arenicola</i>	94

ABREVIATURAS Y FÓRMULAS

- **UFC** Unidades formadoras de colonias (UFC/mL⁻¹)
- **GC** Golfo de California
- **MC** Mar Caribe
- **16S rRNA** Gen 16S de Ácido Ribonucléico ribosomal.
- **SWA** Seawater agar (en inglés), agua de mar artificial (agar con agua desionizada).
- **LC-HRMS** Cromatografía de Líquidos acoplado a detector de masas de alta resolución (Liquid Chromatography-High Resolution Mass Spectrometry, en inglés).
- **MS** Espectrometría de masas
- **GNPS** The Global Natural Products Social Molecular Networking.
- **Q-TOF MS** Detector de masas de alta resolución: analizador Cuadrupolo-tiempo de vuelo acoplado a espectrometría de masas.
- **ppm** Partes por millón

Biogeografía de cepas de Salinispora arenicola evidenciada por el tipo de metabolitos secundarios que producen

- **Da** Daltones: Unidades de masa atómica (u.m.a.)
En dónde: $1 \text{ Da} = 1.660\ 538\ 921 \times 10^{-27} \text{ kg}$.
- **[M+H]⁺** Ión molecular protonado
- **[M+Na]⁺** Ión molecular de aducto sodio
- **m/z** Relación masa/carga. En dónde:
m= número de masa atómica o molecular
z= número de carga del ión
- **AcOEt** Acetato de etilo
- **MeOH** Metanol
- **NaCl** Cloruro de sodio
- **TFA** Ácido trifluoroacético
- **MeCN** Acetonitrilo

RESUMEN

Se realizó la colecta y aislamiento de 18 cepas de *Salinispora arenicola* a partir de muestras de sedimento colectadas en el Mar Caribe (siete cepas) por métodos scuba y en el Golfo de California (11 cepas) mediante una draga de sedimento, respectivamente, con la finalidad de estudiar la biogeografía la especie a partir de los metabolitos secundarios que producen. Se hicieron precultivos bajo condiciones estandarizadas y se determinó el volumen de las células mediante el conteo en tubos PCV (5 μ l/100 μ l). Se realizó el cultivo de las cepas usando rojo de fenol como indicador y se detuvo cuando alcanzaron la fase de crecimiento estacionaria a pH 8. La obtención de los extractos crudos (extracción líquido-líquido) se realizó con acetato de etilo (AcOEt) como disolvente (24 horas). Los extractos crudos se resuspendieron en metanol (MeOH) (1 mg/mL) y fueron analizados en el sistema de Cromatografía de líquidos acoplado a un detector de masas de alta resolución (LC-HRMS, QTOF). Los datos de los 18 espectros (LC-HRMS y MS) se compararon con los 23 compuestos de *Salinispora* spp. reportados en las bibliotecas de la plataforma GNPS y se sometieron a una red molecular de trabajo (MS) en el programa Cytoscape. La tolerancia de masa entre fragmentos y el ión molecular $[M+H]^+$ fue de ± 0.5 Da. Sólo en cuatro de las 18 cepas analizadas fue posible identificar compuestos conocidos como metabolitos secundarios. Los metabolitos secundarios identificados fueron: Salinicetal A $m/z= 418.26 [M+Na]^+$, cepas: AMS-155 y S-680, Estaurosporina $m/z= 467.214 [M+H]^+$, cepa: S-680 y Arenimicina B $m/z= 809.325 [M+H]^+$, cepa: NCA-087, con un intervalo de diferencia de masa de 0.01 Da. No fue posible elaborar un perfil metabólico específico a *S. arenicola* de cada localidad. El único indicio de un perfil de este tipo se presentó en dos cepas del Golfo de California las cuales mostraron producción de Salinicetal A.

Palabras clave. Biogeografía, *S. arenicola*, Metabolitos secundarios, LC-HRMS, MS, GNPS, Red molecular, Ión molecular $[M+H]^+$ y Patrón de fragmentación.

ABSTRACT

Eighteen *Salinispora arenicola* strains were collected and isolated from sediment the collection was made at the Caribbean Sea (seven strains) via scuba methods and at the Gulf of California (11 strains) by sediment dredge, respectively. The main course of this study was to know the biogeography of the species from its secondary metabolites. The eighteen precultures were grown under standardized conditions and the cell volume was determined by cell counts on PCV tubes (5 μ l/100 μ l). Strains were cultured using red phenol as a pH indicator, the culture growth was stopped once the strains reached pH 8 indicating use of all acetate in the medium and therefore reach of a stationary phase. The crude extract was obtained using ethyl acetate (EtOAc) as eluent used for a liquid-liquid extraction for 24 hrs. Crude extracts were dried and resuspended in methanol (MeOH) (1mg/mL) and were analyzed on a chromatography system liquid coupled to a spectrometer (LC-HRMS-Q-TOF). The eighteen spectra data obtained from LC-HRMS and MS were compared with 23 previously reported compounds of *Salinispora* spp. on The Global Natural Product Social Molecular Network platform (GNPS) libraries and were submitted to a MS molecular network using the program Cytoscape for its visualization. Mass tolerance between fragments and molecular ion $[M+H]^+$ was \pm 0.5 Da Only four of the 18 analyzed strains showed identifiable compounds known as secondary metabolites. The identified secondary metabolites from these strains were: saliniketal A $m/z=$ 418.26 $[M+Na]^+$, strains: AMS 155 and S 680, staurosporine $m/z=$ 467.214 $[M+H]^+$, strain: S-680 and arenimycine B $m/z=$ 809.325 $[M+H]^+$, strain: NCA 087 with a mass difference interval of 0.01 Da A specific metabolic outline for the biogeography of *S. arenicola* could not be developed. Nevertheless, a trace for an outline of this kind was observed on two strains from Gulf of California which share the production of saliniketal A.

Keywords: Biogeography, *S. arenicola*, Secondary metabolites, LC-HRMS, MS, GNPS, Molecular network, Molecular ion $[M+H]^+$ and Fragmentation pattern.

CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN

Los océanos cubren más del 70% de la superficie del planeta y comprenden una diversidad biológica extraordinaria (Lam, 2006). Sin embargo, aunque constituyen un enorme reservorio de diversidad, se estima que solo el 15% de las especies conocidas pertenecen a este hábitat (Briggs, 1994). Esto convierte a los océanos en una fuente importante de diversidad inexplorada a la que pertenecen comunidades de bacterias, hongos, levaduras, protozoos, virus y algas (Briggs, 1994). En las últimas décadas, se ha hecho evidente la importancia del estudio de la microbiología marina para comprender el papel que juegan los microorganismos en los procesos biológicos que ocurren en el océano (Azam *et al.*, 1983). Su importancia radica en aspectos como: 1) ser los habitantes más antiguos de la Tierra con más de 3 500 m.a. de antigüedad, 2) ser parte fundamental en los ciclos biogeoquímicos, 3) ser indicadores de condiciones ambientales, y 4) representar un gran potencial para biotecnología debido a sus aplicaciones clínicas, industriales y en biorremediación (Azam *et al.*, 1983). Los estudios de aplicaciones clínicas incluyen la búsqueda de nuevas sustancias biológicamente activas producidas por microorganismos marinos, como son: antibióticos, antitumorales y antivirales (Fenical y Jensen, 1993). Más aún, se calcula que el potencial biotecnológico de los microorganismos marinos en el descubrimiento de productos naturales bioactivos es inmenso a juzgar por su extensión y su diversidad taxonómica (Ortiz *et al.*, 2004). La producción de compuestos nuevos por parte de la comunidad microbiana marina puede deberse a que estas formas de vida han evolucionado en un ambiente distinto al terrestre y, por lo tanto, están expuestas a condiciones ambientales completamente diferentes (Barbier y Prieur, 1991). Por ende, es válido suponer que pueden presentar características fisiológicas distintas y producir diversos compuestos bioactivos con estructuras químicas nuevas (Lam, 2006). Debido a que la gran mayoría de los compuestos bioactivos descubiertos en la actualidad, provienen de un pequeño grupo

Biogeografía de cepas de Salinispora arenícola evidenciada por el tipo de metabolitos secundarios que producen

microbiano, se han incrementado los esfuerzos en la búsqueda de nuevos grupos de microorganismos con la certeza de que se descubrirán metabolitos secundarios novedosos (Fenical y Jensen, 1993).

Las bacterias de la clase Actinobacteria pertenecientes al orden de los Actinomycetales (Gram positivas, con alto contenido de guanina y citosina en su genoma), son un grupo de interés debido a que producen más del 50% de los antibióticos microbianos descubiertos hasta ahora (Bérdy, 2005). Además, dos tercios de los antibióticos utilizados actualmente como la estreptomicina, tetraciclina y cloramfenicol, entre otros, son los productos fermentativos de actinobacterias (Challis y Hopwood, 2003; Magarvey *et al.*, 2004; Fenical y Jensen, 2006). Sin embargo, estos compuestos sólo han sido detectados en un grupo selecto de los géneros *Streptomyces* y *Micromonospora*: el primero, ha demostrado una gran capacidad de producción de metabolitos secundarios al contar con un total de 7,600 compuestos bioactivos reportados hasta 2005 (Bérdy, 2012), mientras que el segundo presenta un total de 740 compuestos activos (Bérdy, 2012; Mincer *et al.*, 2002). El estudio del cultivo de los actinomicetos y su actividad biológica ha dado resultados alentadores ya que, en algunos casos, entre 35 y 80% de las cepas cultivadas han demostrado algún tipo de actividad antitumoral o antibiótica (Fenical y Jensen, 2006). Dentro de los metabolitos secundarios que han demostrado tener potencial farmacológico está el agente anticancerígeno Salinosporamida A aislado del actinomiceto *Salinispora tropica*, que actualmente se encuentra en la fase clínica I de tratamiento contra cáncer (Mincer *et al.*, 2002; Maldonado *et al.*, 2005a, Fenical *et al.*, 2009). Las Actinobacterias, mejor conocidas como actinomicetos, se desarrollan en ambientes como los sedimentos marinos y su desarrollo puede verse afectado tanto por interacciones con otras poblaciones (sinérgicas, antagónicas, etc.), como por las características físicas y químicas de su ambiente (Crawford y Crawford, 1978; Maier *et al.*, 2000). Como consecuencia de esas interacciones, estos

*Biogeografía de cepas de *Salinispora arenicola* evidenciada por el tipo de metabolitos secundarios que producen*

microorganismos tienen la capacidad de formar un micelo radial que les permite la colonización de substratos lejos de su centro de crecimiento y producen metabolitos secundarios con actividad biológica como agentes de dispersión y supervivencia (Fenical y Jensen, 2006; Prieto-Davó *et al.*, 2008). La producción de sustancias antagonistas específicas es una estrategia competitiva que puede inhibir o regular el crecimiento de ciertos microorganismos en una población (Vernam y Evans, 2000). La capacidad de algunos actinomicetos para producir este tipo de metabolitos secundarios les ofrece una respuesta más eficaz a diferentes factores de estrés y una ventaja de supervivencia con respecto a aquellos que no los producen (Maier *et al.*, 2000; Surajit-Das *et al.*, 2006). Es importante tomar en cuenta que las comunidades microbianas marinas han tenido que adaptarse a condiciones extremas tales como: altas presiones (~1100 atmósferas), niveles bajos de oxígeno, condiciones ácidas (pH de hasta 2.8) y temperaturas superiores a 100 °C en los respiraderos hidrotermales e inferiores a 0 °C en los polos (Lam, 2006). Más aún, se sabe que los actinomicetos como los del género *Salinispora* spp., son productores de metabolitos secundarios (Jensen *et al.*, 2015). Las distintas cepas estudiadas hasta el momento muestran la producción de compuestos bioactivos que está determinada por su biogeografía (Jensen *et al.*, 2015). Por ende, las distintas adaptaciones que pueden tener los actinomicetos marinos a determinadas condiciones biogeográficas los convierte en una fuente prometedora para el descubrimiento de compuestos bioactivos nobedosos (Fenical y Jensen, 2006).

1.1 ANTECEDENTES

1.1.2 Biogeografía de microorganismos marinos

La biogeografía se encarga del estudio de la distribución de cualquier organismo en un determinado espacio y tiempo, considerando también los procesos

*Biogeografía de cepas de *Salinispora arenicola* evidenciada por el tipo de metabolitos secundarios que producen*

biológicos, físicos y ambientales que dieron lugar a dicha distribución (Morrone *et al.*, 1996). La biogeografía sobre las especies bacterianas sigue siendo un tema poco claro en microbiología (Fenchel, 2003). Esto se debe al pequeño tamaño de estos microorganismos, la alta abundancia que pueden llegar a presentar y la facilidad de dispersión de algunas cepas (Fenchel, 2003). La hipótesis que prevalece en el campo de la microbiología es que algunas bacterias de vida libre no están sujetas al aislamiento geográfico y, sin esta restricción deben exhibir una distribución cosmopolita (Staley y Gosink, 1999; Martiny *et al.*, 2006). La evidencia sobre la existencia del cosmopolitismo entre bacterias incluye taxones con estrategias de supervivencia, como el género *Bacillus* formador de esporas, del cual se ha demostrado que las tasas de migración son suficientemente altas para evitar el aislamiento geográfico (Roberts y Cohan, 1995). Evidencia adicional proviene de un estudio genético de cepas de *Pseudomonas* en donde se determinó el cosmopolitismo de este género por medio del análisis del gen 16S rRNA y, en menor medida de los genes 16S-23S rRNA (Cho y Tiedje, 2000). No obstante, también está ampliamente aceptado que los géneros bacterianos presentan una extensa distribución en sus respectivos hábitats (Hedlund y Staley, 2004). En la actualidad existe un debate sobre la magnitud de la dispersión microbiana. Finlay (2002), ha argumentado que es probable que cualquier organismo de menos de 1 mm de tamaño se encuentre en todas partes. El primer paradigma en biogeografía microbiana, "todo está en todas partes, pero el ambiente selecciona", fue ofrecida por Baas-Becking (1934) hace más de 81 años y sigue siendo citado en casi cada publicación reciente sobre biogeografía microbiana (de Wit y Bouvier, 2006). Papke y Ward (2004) citan estudios como evidencia de la ocurrencia de endemismo microbiano, incluyendo el trabajo de los microbios de aguas termales (Papke *et al.*, 2003; Whitaker *et al.*, 2003) y *Pseudomonas* del suelo (Cho y Tiedje, 2000) así como entre procariotas que habitan en ambientes con condiciones extremas (Staley y Gosink, 1999; Papke *et al.*, 2003). La afirmación "todo está en todas partes" implica que los

*Biogeografía de cepas de *Salinispora arenicola* evidenciada por el tipo de metabolitos secundarios que producen*

microorganismos presentan una gran capacidad de dispersión (Martiny, 2006). En la actualidad hay poco apoyo para el “todo está en todas partes, pero el ambiente selecciona” cuando se aplica a nivel de especie. Más aún, el estudio de esta distribución todavía será extenso, debido a que existe información escasa sobre las tasas reales de dispersión microbiana (Martiny, 2006). Debido a esto, y a la poca comprensión que se tiene sobre la medida en que el aislamiento geográfico puede afectar la estructura de la población de especies bacterianas, no ha sido posible estimar con precisión la riqueza de especies de bacterias a nivel mundial y no se ha logrado entender las condiciones que impulsan la especiación entre bacterias. Más aún, no ha sido posible conocer a fondo la existencia de diferencias entre dos especies próximas, que motiva su separación definitiva (Cohan, 2002). Además, lo que está menos claro es la distribución de los rasgos metabólicos específicos entre las poblaciones geográficamente distintas de bacterias (Martiny, 2006). Para resolver estos planteamientos, se ha propuesto el uso de secuencias de datos moleculares que permitan definir las unidades naturales de diversidad bacteriana (Gevers *et al.*, 2005). Estas unidades pueden ser reconocidas como grupos de secuencias genéticas que comparten una mayor similitud entre sí, y podrían permitir el reconocimiento de eco-poblaciones o ecotipos (Cohan, 2002). Cuando se habla de un ecotipo, se hace referencia a poblaciones adaptadas a condiciones ambientales locales propias que presentan formas genéticamente diferenciadas de otras especies que viven en un hábitat o ecosistema determinados (Smith y Smith, 2006). Los ecotipos pueden surgir a través de diversos procesos (Gevers *et al.*, 2005), incluyendo el aislamiento geográfico o la selección natural y pueden ser reconocidos a través del gen 16S rRNA (Fox *et al.*, 1992; Palys *et al.*, 1997; Staley y Gosink, 1999). En estudios previos, se ha demostrado que las especies bacterianas pueden conformarse de múltiples ecotipos (Palys *et al.*, 2000), lo cual implica que las especies bacterianas generalmente reconocidas hoy en día estén compuestas de ecotipos múltiples y que cada uno posea propiedades de especies individuales, convirtiendo a estos

Biogeografía de cepas de Salinispora arenicola evidenciada por el tipo de metabolitos secundarios que producen

organismos en un modelo para comprobar la hipótesis sobre la biogeografía bacteriana y los procesos que conducen a la especiación o formación de ecotipos (Cohan, 2002).

1.1.3 Actinomicetos en ambientes marinos

A pesar de que existe la posibilidad de que el origen de los actinomicetos marinos de las zonas costeras sea terrestre, se ha demostrado que estos microorganismos son metabólicamente activos en el medio marino (Bredholdt *et al.*, 2007). Más aún, el aislamiento de cepas colectadas en sedimentos marinos a grandes profundidades, así como la dependencia al sodio para su crecimiento (Mincer *et al.*, 2002; Maldonado *et al.*, 2005), excluye la hipótesis de un origen terrestre (Bredholdt *et al.*, 2007). Los estudios más recientes demuestran la presencia de distintos géneros halotolerantes de actinomicetos en el océano, entre ellos: *Micromonospora*, *Streptomyces*, *Nocardia*, *Rhodococcus*, *Dietzia*, *Prauserella*, *Serinicoccus*, *Marinophilus*, *Solwaraspora*, *Lamerjespora*, *Aeromicrobium*, *Williamsia*, *Marinactinospora* y *Sciscionella* (Subramani y Aalbersberg, 2012). Actualmente se han descrito géneros como *Marinospora* y *Salinispora* caracterizados por producir compuestos bioactivos con actividad citotóxica (Jensen *et al.*, 2005; Mincer *et al.*, 2005; Maldonado *et al.*, 2005). Las investigaciones previas que hablan sobre el requerimiento absoluto del sodio para el crecimiento de las especies de *Salinispora* (*S. arenicola*, *S. pacifica* y *S. tropica*) (Tsueng y Lam, 2010) indican que el potasio y el litio podrían reemplazar el sodio para soportar un máximo de crecimiento (Tsueng y Lam, 2010). Otro ejemplo de esto, lo mencionan Tsueng y Lam (2010) indicando que sólo $5 \mu\text{mol L}^{-1}$ de sodio es requerido para soportar el crecimiento de *S. arenicola*. El requerimiento absoluto de sodio puede causar mayores cambios en el metabolismo primario y secundario de las células bacterianas (Malin y Lapidot, 1996; Kempf y Bremer, 1998). La mayoría de las actinobacterias marinas son capaces de crecer y producir metabolitos secundarios en presencia de agua marina (Jensen y Fenical,

Biogeografía de cepas de Salinispora arenicola evidenciada por el tipo de metabolitos secundarios que producen.

1996). Esto lo pueden realizar a través de la membrana citoplasmática que constituye una barrera que separa al citoplasma del medio externo para compensar la presión osmótica y en el que pueden producirse cambios en la concentración de iones de sodio (Madigan *et al.*, 2004). Además, se ha demostrado que existe una adaptación de la composición lipídica de las membranas celulares frente a una nueva situación de cambios osmóticos (Madigan *et al.*, 2004; Russell, 1993). El desarrollo óptimo de los actinomicetos se presenta a una temperatura de 25 °C (mesófilos) y a pH alcalino (pH \approx 9) con un rango de tolerancia de pH de 6 a 9. Bajo estas condiciones pueden alcanzarse densidades de población entre 10^8 y 10^{11} unidades formadoras de colonias (UFC/mL⁻¹) (Rothschild y Manicinielli, 2001).

1.1.4 Papel ecológico de los actinomicetos en ambientes marinos

La degradación y el procesamiento de diversos materiales en el océano es un proceso mediado por la acción de diversos microorganismos (Das y Khan, 2006). Por ejemplo, los géneros *Arthrobacter*, *Brevibacterium*, *Corynebacterium* y *Nocardia* entran en el grupo de microorganismos importantes en la degradación de aceites en hábitats acuáticos, incluso con la capacidad de crecer en tanques con combustible (Goodfellow y Williams, 1983). En el caso de los actinomicetos marinos, se han reportado cepas con capacidad de descomposición de agar, alginato, laminarina, celulosa, quitina y otros hidrocarburos de petróleo (Lam, 2006; Das, 2006). Como degradadores de materia orgánica los actinomicetos juegan un papel muy importante en los procesos biogeoquímicos que ocurren en el océano, entre ellos la remineralización, la inmovilización de nutrientes minerales y la fijación y liberación de nitrógeno molecular (Lam, 2006). El papel ecológico de los actinomicetos es esencial para entender tanto su potencial en la producción biotecnológica de metabolitos secundarios de interés biotecnológico como para mejorar su potencial en biorremediación debido a su capacidad para degradar compuestos contaminantes (Machado, 2013).

1.1.5 Orden Actinomycetales: primeros indicios del género *Salinispora*

El muestreo para actinomicetos marinos comenzó a finales del 1960 (Weyland, 1969). En 1984 se realizó la descripción taxonómica del primer actinomiceto marino, *Rhodococcus marinonascens* (Helmke y Weyland, 1984) y para 1991 se descubrió el género *Salinispora* cuando se reportó el aislamiento y distribución de actinomicetos de la familia Micromonosporaceae en Bahamas (Jensen *et al.*, 1991; Mincer *et al.*, 2002; Maldonado *et al.*, 2005a). Para este género, se han descrito tres especies: *S. arenicola* y *S. tropica* en 2005 (Maldonado *et al.*, 2005a; Fenical y Jensen, 2006; Jensen, 2010) y en 2013 se aceptó a la tercera especie del género *S. pacifica* (Figura 1), descrita por medio de un análisis polifásico (Ahmed *et al.*, 2013) en el cual se realizó la caracterización morfológica, fisiológica, quimio-taxonómica y análisis filogenético este último a través de la comparación de las secuencias de los 16S rRNA (Mincer *et al.*, 2002). Después de la aplicación de métodos basados en la secuencia de ADN para inferir relaciones evolutivas (filogenéticas), se hizo evidente que estas bacterias son distintas (Mincer *et al.*, 2002). Una particularidad de este género es que sus especies están relacionadas en un 99% cuando se realiza una comparación entre en el gen 16S rRNA (Jensen, 2010). Sin embargo, el metabolismo secundario representa una de las principales diferencias fenotípicas observadas entre las tres especies de *Salinispora* (Tabla 1) (Jensen *et al.*, 2007a).



Figura 1. a) *S. arenicola*. b) *S. tropica*. c) *S. pacifica*

1.1.6 Distribución geográfica del género *Salinispora*

La distribución geográfica de las tres especies de *Salinispora* es variable. *S. arenicola* presenta una distribución más amplia y puede concurrir con *S. tropica* que sólo ha sido reportada en el Caribe (Jensen y Mafnas, 2006) y con *S. pacifica* que presenta una distribución más amplia pero no se ha reportado en regiones del Caribe (Mincer *et al.*, 2005; Jensen y Mafnas, 2006) (Figura 2).

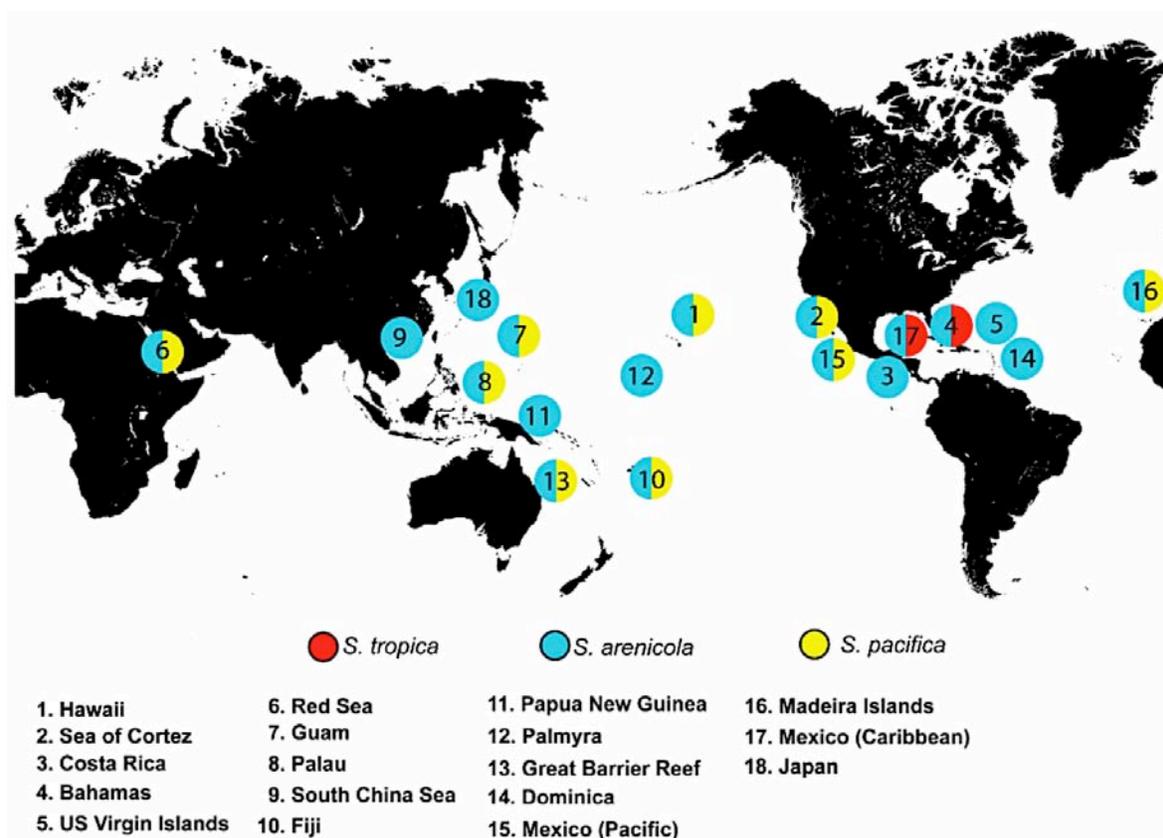


Figura 2. Distribución global del género *Salinispora*. La información se obtuvo de múltiples grupos de investigación además de estar basada en el GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) que cuenta con los depósitos de secuencias de 16S rRNA de *Salinispora* en el mundo (Jensen *et al.*, 2015).

1.1.7 Metabolitos secundarios producidos por *Salinispora*

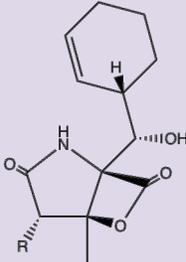
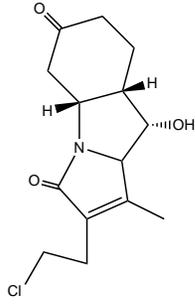
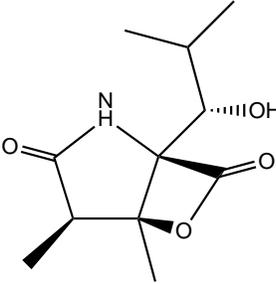
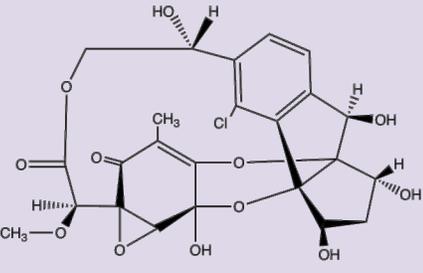
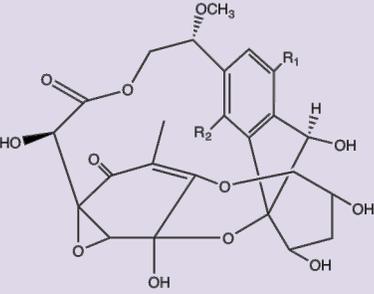
El actinomiceto *Salinispora*, se ha empleado como modelo para el descubrimiento e investigación de productos naturales. Esto se ha logrado con el esfuerzo de un trabajo interdisciplinario (Jensen *et al.*, 2015). Los metabolitos secundarios producidos por *Salinispora* spp. son compuestos químicos altamente eficientes contra agentes patógenos que afectan a la salud humana (Tabla 1 y 2) (Davies, 2006; Surajit-Das *et al.*, 2006; Jensen *et al.*, 2007b; 2015).

Tabla 1. Metabolitos secundarios reportados para *Salinispora* spp. (Jensen *et al.*, 2015).

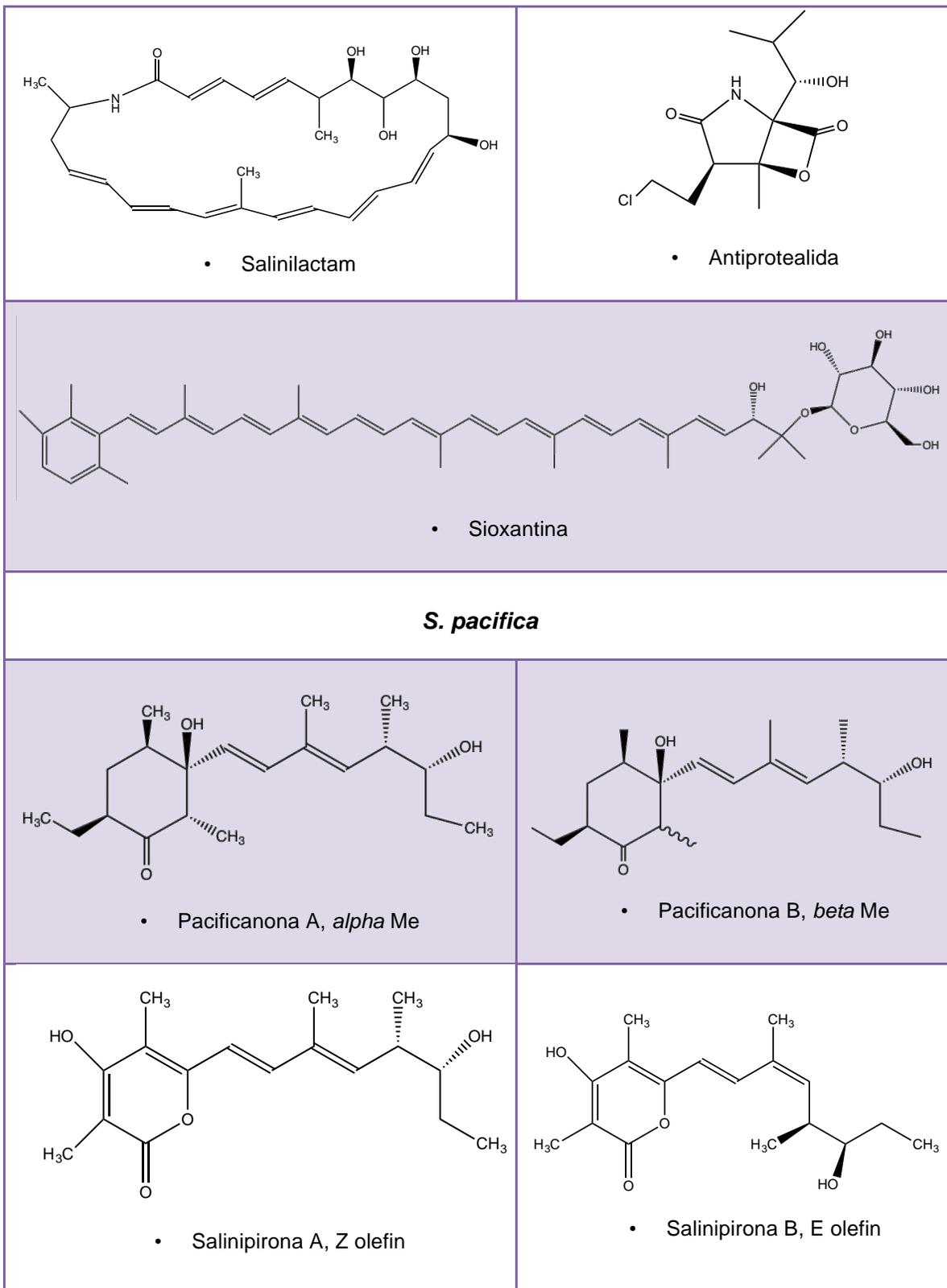
No	Especies ^a	Compuesto	Formula molecular	Masa atómica (Da)	Origen biosintético	Novedoso	Actividad	Ref.
1	<i>S. tropica</i>	Salinosporamida A	C ₁₅ H ₂₀ ClNO ₄	313.777	PKS-NRPS	Nuevo	Proteosoma	34
2	<i>S. tropica</i>	Esporolida A	C ₂₄ H ₂₃ ClO ₁₂	538.885	ePKS	Nuevo	Transcriptasa reversa	15
3	<i>S. tropica</i>	Salinilactam	C ₂₈ H ₃₉ NO ₅	469.613	Tipo I PKS	Nuevo	ND	128
4	<i>S. tropica</i>	Sioxantina	C ₄₆ H ₆₂ O ₇	726.9803	Terpeno	Nuevo	ND	109
5	<i>S. tropica</i>	Antiprotealida	C ₁₂ H ₁₈ ClNO ₄	275.729	PKS-NRPS	Nuevo	Proteosoma	81
6	<i>S. pacifica</i>	Pacificanona A	C ₂₀ H ₃₄ O ₃	322.482	Tipo PKS	Nuevo	ND	97
7	<i>S. pacifica</i>	Salinipirona A y B	C ₁₇ H ₂₄ O ₄	292.37	Tipo I PKS	Nuevo	ND	97
8	<i>S. pacifica</i>	Cianosporosida A	C ₂₁ H ₂₀ ClNO ₆	417.8396	PKSe	Nuevo	ND	96
9	<i>S. pacifica</i>	Lomaiviticina A	C ₆₈ H ₈₀ N ₆ O ₂₄	136.5389	Tipo II PKS	Nuevo	Citotóxica (ADN)	48
10	<i>S. pacifica</i>	Enterocina	C ₂₂ H ₂₀ O ₁₀	444.388	Tipo II PKS	Conocido	Antibiótica	11
11	<i>S. arenicola</i>	Salinicetal A	C ₂₂ H ₃₇ NO ₅	395.267	Tipo I PKS	Nuevo	Ornitina descarboxilasa	138
12	<i>S. arenicola</i>	Arenicolida A	C ₄₅ H ₇₂ O ₁₂	805.046	Tipo I PKS	Nuevo	ND	139
13	<i>S. arenicola</i>	Saliniquinona A-F	C ₂₃ H ₁₆ O ₇	404.369	Tipo II PKS	Nuevo	Citotóxica	91
14	<i>S. arenicola</i>	Ciclomarín A	C ₅₆ H ₈₂ N ₆ O ₁₁	1043.297	NRPS	Conocido	Anti-inflamatoria	106
15	<i>S. arenicola</i>	Ciclomarazina	C ₂₃ H ₃₁ N ₃ O ₃	397.510	NRPS	Nuevo	ND	119
16	<i>S. arenicola</i>	Arenimicina	C ₃₃ H ₃₃ NO ₁₄	667.613	NRPS	Nuevo	Antibiótica	3
17	<i>S. arenicola</i>	Arenamida A	C ₃₆ H ₅₇ N ₅ O ₇	671.867	Tipo II PKS	Nuevo	Anti_inflamatoria (NFkB)	2
18	<i>S. arenicola</i>	Estaurosporinas	C ₂₈ H ₂₆ N ₄ O ₃	466.531	Alcaloide	Conocido	Proteína quinasa	57
19	<i>S. arenicola</i>	Isopimara-8,15-dien-19-ol	C ₂₀ H ₃₂ O	288.467	Terpeno	Nuevo	ND	141
20	<i>S. arenicola</i>	Rifamicina B	C ₃₉ H ₄₉ NO ₁₄	755.805	Tipo I PKS	Conocido	ARN Polimerasa	64
21	<i>S. arenicola</i>	Mevinolina	C ₂₄ H ₃₆ O ₅	404.540	PKS	Conocido	HMG-CoA reductasa	12
22	<i>St, Sa, and Sp</i>	Desferrioxamina B	C ₂₅ H ₄₈ N ₆ O ₈	560.684	NRPS	Conocido	Quelante del hierro	29
23	<i>St, Sa, and Sp</i>	Limphostina	C ₁₆ H ₁₄ N ₄ O ₃	310.307	NRPS-PKS	Conocido	Inmunosupresor	89

^a Reporte de la detección de compuestos de *Salinispora* spp. ND: No determinado.

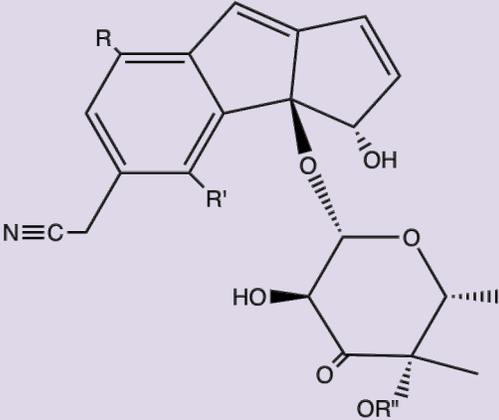
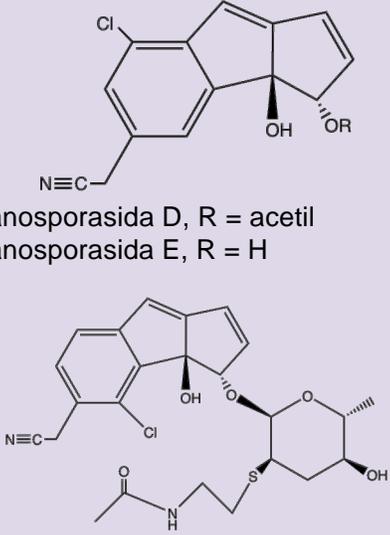
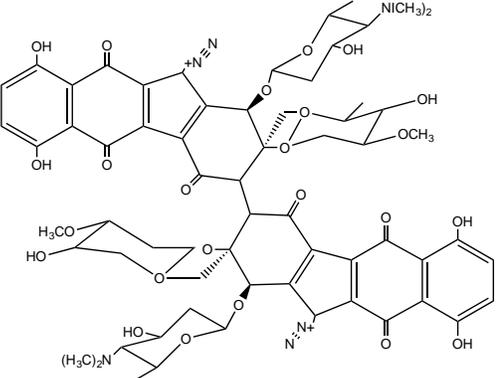
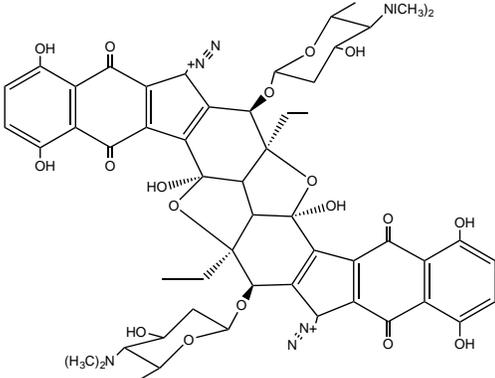
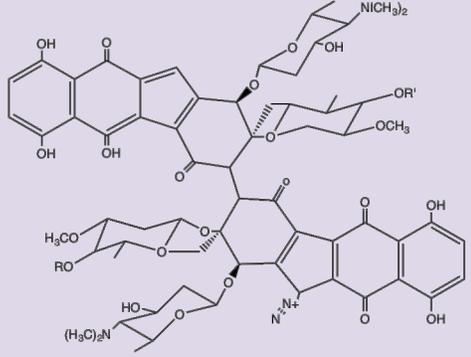
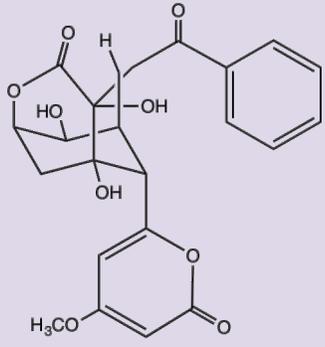
Biogeografía de cepas de Salinispora arenicola evidenciada por el tipo de metabolitos secundarios que producen

Tabla 2. Estructura química de los metabolitos secundarios reportados en <i>Salinispora</i> spp.	
<i>S. tropica</i>	
 <ul style="list-style-type: none"> • Salinosporamida A, R = CH₂CH₂Cl • Salinosporamida B, R = CH₂CH₃ • Salinosporamida D, R = CH₃ • Salinosporamida E, R = CH₂CH₂CH₃ • Bromosalinosporamida, R = CH₂CH₂Br • Salinosporamida K, R = H • Fluorosalinoporamida, R = CH₂CH₂FC₂₄H₂₃ClO₁₂ • Salinosporamida F, R = CH₂CH₂Cl • Salinosporamida G, R = CH₃ • Salinosporamida H, R = CH₂CH₃ 	 <ul style="list-style-type: none"> • Salinosporamida I, R₁ = CH₂CH₃, R₂ = OH  <ul style="list-style-type: none"> • Salinosporamida J, R₁ = CH₃, R₂ = H
 <ul style="list-style-type: none"> • Salinosporamida C 	 <ul style="list-style-type: none"> • Omuralida
 <ul style="list-style-type: none"> • Esporolida A, R₁ = H, R₂ = Cl 	 <ul style="list-style-type: none"> • Esporolida B, R₁ = Cl, R₂ = H

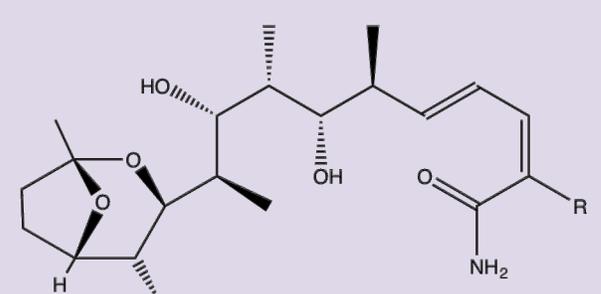
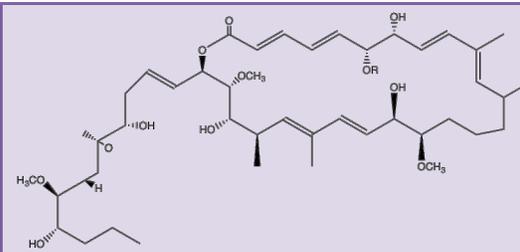
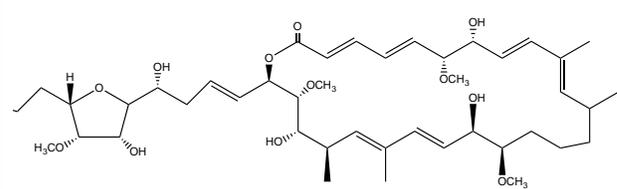
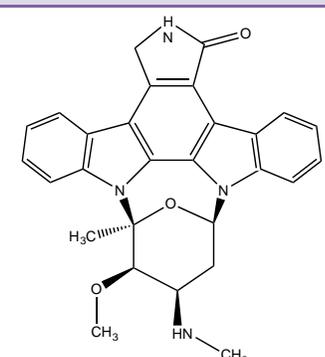
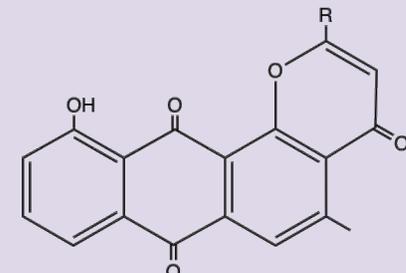
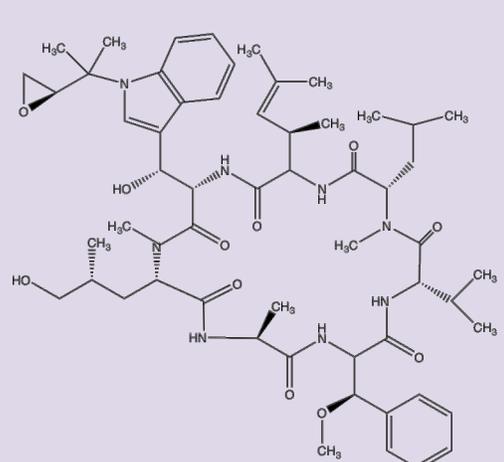
Biogeografía de cepas de Salinispora arenicola evidenciada por el tipo de metabolitos secundarios que producen



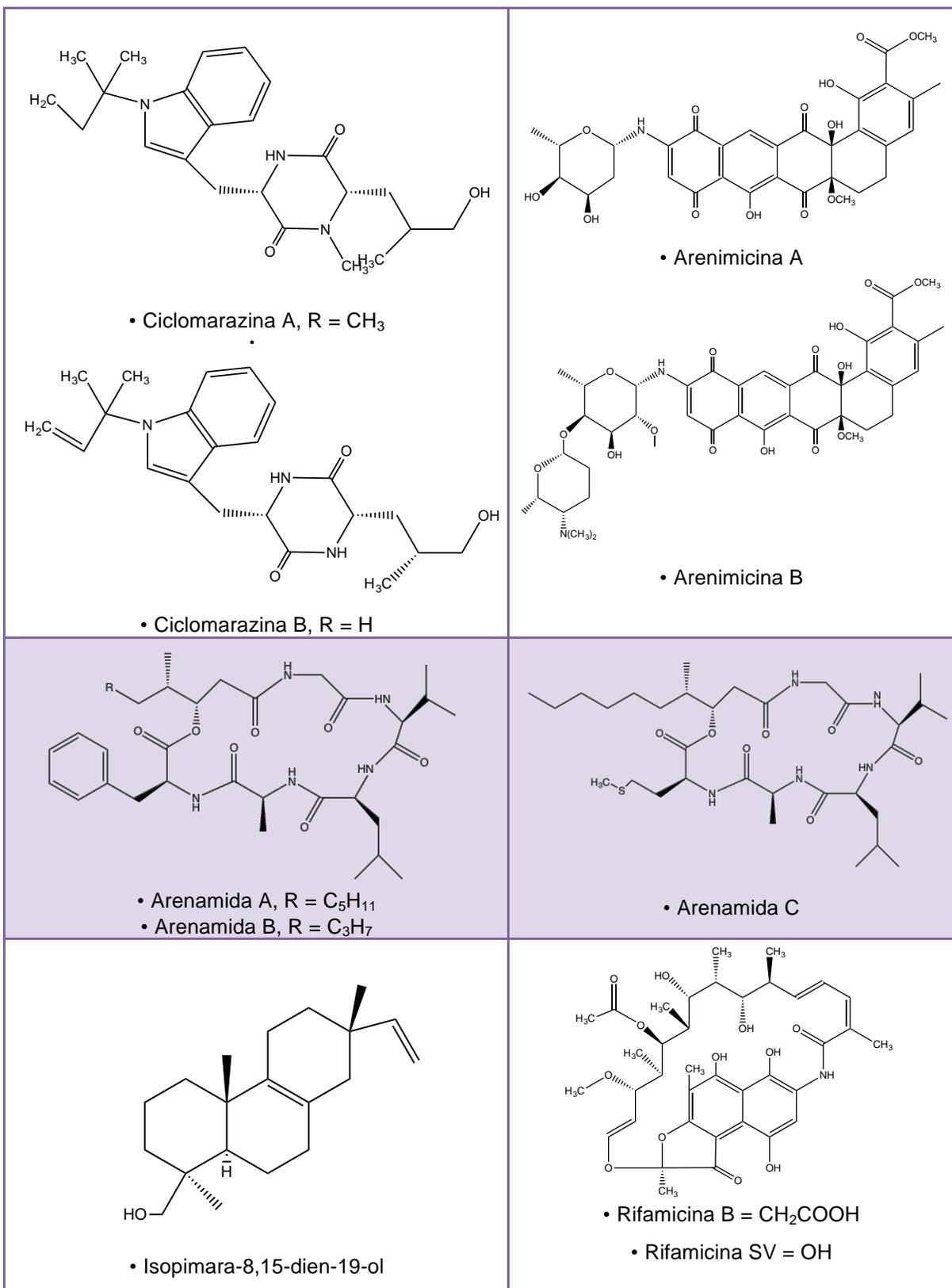
Biogeografía de cepas de Salinispora arenicola evidenciada por el tipo de metabolitos secundarios que producen

 <p> <ul style="list-style-type: none"> • Cianosporasida A, R = H, R' = Cl, R'' = H • Cianosporasida B, R = Cl, R' = H, R'' = H • Cianosporasida C, R = H, R' = Cl, R'' = acetil </p>	 <p> <ul style="list-style-type: none"> • Cianosporasida D, R = acetil • Cianosporasida E, R = H • Cianosporasida F </p>
 <p>• Lomaiviticina A</p>	 <p>• Lomaiviticina B</p>
 <p> <ul style="list-style-type: none"> • Lomaiviticina C, R = R' = H • Lomaiviticina D, R = H, R' = CH₃, R'' = CH₃, R''' = H • Lomaiviticina E, R = R' = CH₃ </p>	 <p>• Enterocina</p>

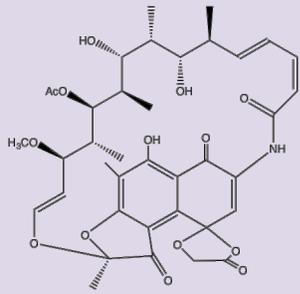
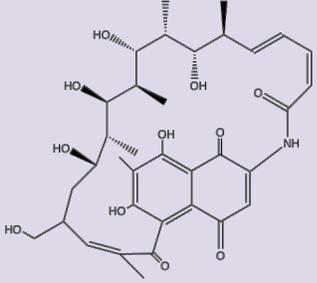
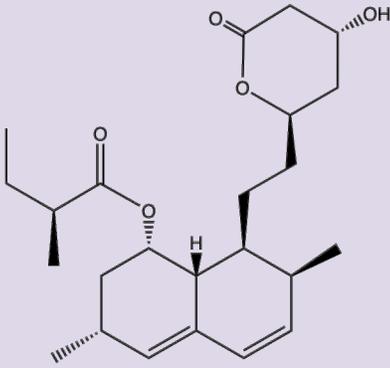
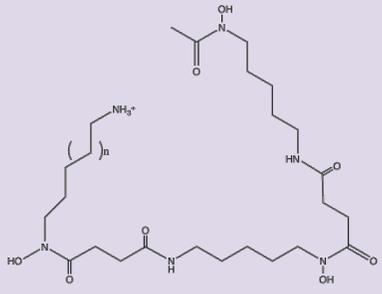
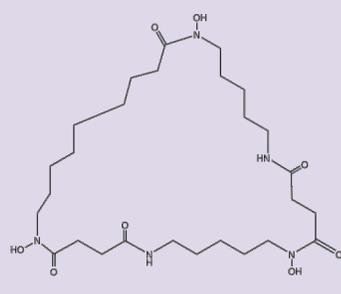
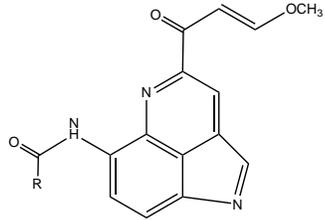
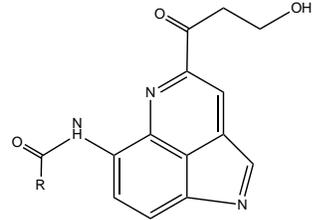
Biogeografía de cepas de Salinispora arenicola evidenciada por el tipo de metabolitos secundarios que producen

S. arenicola	
 <ul style="list-style-type: none"> • Salinicetal A, R = H • Salinicetal B, R = OH 	 <ul style="list-style-type: none"> • Arenicolida A, R = CH₃ • Arenicolida B, R = H
 <ul style="list-style-type: none"> • Arenicolida C 	 <ul style="list-style-type: none"> • Estaurosporina
 <ul style="list-style-type: none"> • Saliniquinona A, R = • Saliniquinona B, R = • Saliniquinona C, R = • Saliniquinona D, R = • Saliniquinona E, R = • Saliniquinona F, R = 	 <ul style="list-style-type: none"> • Ciclomarin A

Biogeografía de cepas de Salinispora arenicola evidenciada por el tipo de metabolitos secundarios que producen



Biogeografía de cepas de Salinispora arenicola evidenciada por el tipo de metabolitos secundarios que producen

 <ul style="list-style-type: none"> • Rifamicina O  <ul style="list-style-type: none"> • Rifamicina W 	 <ul style="list-style-type: none"> • Mevinolina
<p><i>S. pacifica, tropica y arenicola</i></p>	
 <ul style="list-style-type: none"> • Desferroxamina B, n = 1 • Desferroxamina N, n = 2 	 <ul style="list-style-type: none"> • Desferroxamina E
 <ul style="list-style-type: none"> • Limfostina, R = metil • Neolimfostina A, R = isoprop • Neolimfostina B, R = etil • Neolimfostina C, R = secu-butil • Neolimfostina D, R = isobutil 	 <ul style="list-style-type: none"> • Limfostina, R = metil • Neolimfostina A, R = isoprop • Neolimfostina B, R = etil • Neolimfostina C, R = secu-butil • Neolimfostina D, R = isobutil

1.1.8 Salinosporamida A

En 2003, se reportó el aislamiento de un potente agente anticancerígeno nombrado Salinosporamida A (Feling *et al.*, 2003). Este compuesto fue descubierto en el Instituto de Oceanografía de Scripps por William Fenical y Paul Jensen a partir del extracto de *Salinispora tropica*. La salinosporamida A, pertenece a la serie de compuestos conocidos como salinosporamidas y posee una γ -lactama- β -lactona y un anillo bicíclico (Feling *et al.*, 2003). Además, presenta una potente citotoxicidad contra células HTC -116 de carcinoma de colon humano, células NCI-H226 de cáncer de pulmón, células SF-539 del cáncer SNC (Sistema Nervioso Central), células SK- MEL- 28 de melanoma, y células MDA-MB435 de cáncer de mama (Feling *et al.*, 2003).

De acuerdo a Feling *et al.* (2003), Salinosporamida A tiene eficacia *in vivo* contra tumores humanos en modelos de ratón cuando se administra vía oral. También, inhibe la actividad del proteosoma mediante la modificación covalente del sitio activo de treonina en el proteosoma 20S (Feling *et al.*, 2003). La primera síntesis estereoselectiva fue presentada por Rajender Reddy Leleti y E.J. Corey (Reddy *et al.*, 2004) quienes presentaron rutas sintéticas posteriores reportadas más adelante. Hasta el 2011, la salinosporamida A se encontraba en fase clínica I contra mieloma de múltiple recaída, y actualmente se realizan más ensayos con este fármaco en diferentes tipos de cáncer (Reddy *et al.*, 2004; Ling *et al.*, 2007; Ma y Romo, 2007; Endo y Danishefsky, 2005). Es importante destacar que la búsqueda de nuevos metabolitos secundarios en microorganismos ha sido compleja, debido a que diferentes cepas que pertenecen a la misma especie pueden producir diferentes metabolitos secundarios mientras que, cepas taxonómicamente diversas, pueden producir metabolitos idénticos (Jensen *et al.*, 2007b). Las bases para que se presente esta diversificación de metabolitos secundarios basados en la distribución geográfica, han sido poco estudiadas.

Biogeografía de cepas de Salinispora arenicola evidenciada por el tipo de metabolitos secundarios que producen

Nemergut *et al.* (2011), mencionan que se han considerado como evidencias que la distribución geográfica de las bacterias está correlacionada con su ecología y fisiología, y por lo tanto existe una correlación significativa entre la producción de determinados metabolitos secundarios con la distribución biogeográfica (Valero y Martín, 1984).

1.2 HIPÓTESIS

Es posible evidenciar una división biogeográfica entre cepas de *Salinispora arenicola* cultivadas del Golfo de California (Mar de Cortés) y del Mar Caribe dado el tipo de metabolitos secundarios que producen.

1.3 OBJETIVOS

1.3.1 Objetivo general

Comparar la diversidad de metabolitos secundarios presentes en cepas de *Salinispora arenicola* aisladas de sedimentos marinos del Golfo de California (Mar de Cortés) y del Mar Caribe.

1.3.2 Objetivos específicos

1. Aislar y cultivar cepas de *Salinispora arenicola* a partir de sedimentos del Golfo de California (GC) y del Mar Caribe (MC).
2. Caracterizar los metabolitos secundarios producidos por 18 cepas de *Salinispora arenicola* aisladas de ambas localidades (GC-1-11 y MC-1-7) mediante comparación de extractos crudos de fermentación utilizando el análisis de LC-HRMS.
3. Determinar la existencia de metabolitos secundarios exclusivos de cepas de *Salinispora arenicola* de cada localidad.

1.4 JUSTIFICACIÓN

A pesar de los grandes esfuerzos realizados en los últimos 20 años, la investigación de los actinomicetos marinos como una fuente de nuevos metabolitos secundarios se encuentra en una etapa temprana (Subramani y Aalbersberg, 2012). En el contexto del descubrimiento de nuevos productos naturales a partir de microorganismos de origen marino, como se ha logrado con el género *Salinispora*, se hace evidente la necesidad que existe de conocer a fondo los aspectos relacionados con los procesos de fermentación, tiempos de ocurrencia de las etapas de crecimiento y la producción de metabolitos secundarios, para comprender el verdadero potencial biotecnológico de estas bacterias marinas (Subramani y Aalbersberg, 2012).

Por otro lado, en las últimas décadas se han elaborado diversos estudios acerca de la distribución geográfica de las bacterias en los cuales se evidencia una relación ecológica y fisiológica que al parecer genera una distribución limitada y apoya la teoría de “todo está en todos lados y el ambiente selecciona” (Whitfield, 2005; Nemergut *et al.*, 2011). En el caso de *S. arenicola*, se observa una distribución pan-tropical (Feling *et al.*, 2003) que podría estar relacionada con la diversidad de metabolitos secundarios que produce ya que éstos podrían ofrecerle la ventaja adaptativa a los distintos ambientes que coloniza (Whitfield, 2005). Los estudios más recientes del género *Salinispora*, muestran que los altos niveles de dispersión de *S. arenicola* están asociados a una contundente diversidad genética (Freel *et al.*, 2012). Más aún, se ha demostrado que la recombinación y adquisición de genes de resistencia a antibióticos en este género ha creado una separación genética entre cepas de *S. arenicola* presentes en el Mar Caribe norteamericano y en el Mar de Cortés (Freel *et al.*, 2012). El análisis de los metabolitos secundarios presentes en cepas de *Salinispora arenicola* provenientes del Golfo de California y del Mar Caribe, permitirá evidenciar si el aislamiento

*Biogeografía de cepas de *Salinispora arenicola* evidenciada por el tipo de metabolitos secundarios que producen.*

geográfico entre dos poblaciones de una misma especie contribuye a su diversidad química. Con los resultados de este trabajo será posible contribuir al conocimiento de los metabolitos secundarios producidos por cepas de *S. arenicola* y se validará el uso de estudios de biogeografía en microorganismos marinos como un método para el descubrimiento de productos naturales.

1.5 ÁREA DE ESTUDIO

1.5.1 Golfo de California (Mar de Cortés)

El Golfo de California establece comunicación con el Océano Pacífico a través de una boca de 220 km de ancho (Figura 3 a). Se localiza entre los 20° y 32° grados latitud norte y los 105.5° y 114.5° grados longitud oeste en el Pacífico Oriental. Se sitúa entre la Península de Baja California, al Oeste y las costas de Sonora y Sinaloa al Este. Al norte limita con la desembocadura del río Colorado y al sur con una línea imaginaria desde la península de California hasta Cabo Corrientes en Jalisco, México (Roden y Emilsson, 1979). Las masas superficiales de agua en la parte sur del Golfo son de tres tipos: agua fría (8-9 °C) de baja salinidad de la corriente de California, agua del Golfo de California templada y muy salina y agua cálida (29 °C) de salinidad intermedia del Pacífico Tropical del este (34 a 35.5 ppm) (Roden y Groves, 1959; Stevenson, 1970). La circulación general del agua se debe principalmente al efecto del viento que en invierno y primavera conduce el agua superficial hacia la parte sur, causando surgencias en áreas de la costa este. Gran parte del transporte de nutrientes se lleva a cabo por giros de mesoescala (Lavín *et al.*, 1997). La presencia de giros en la región se debe a la confluencia de masas de agua de origen y composición diferentes, que produce estructuras frontales que funcionan como precursores de giros y filamentos (Lavín *et al.*, 1997). Los tipos de sedimentos que predominan son arenas mixtas, limo, fango, arrecifes rocosos y mantos de rodolitos (Lavín *et al.*, 1997).

1.5.2 Mar Caribe

El Mar Caribe con un área aproximada de 2,754,000 km², es un mar tropical parcialmente cerrado formado por el arco de las Antillas Mayores y Menores y las costas atlánticas de Venezuela, Colombia, Centroamérica y la península de Yucatán (CONANP, 2009) (Figura 3 b). En promedio, la salinidad del Mar Caribe es de 35 a 36 (ppm) y la temperatura superficial es de 28 °C (CONANP, 2009). La ecorregión del Mar Caribe está formada sedimentos mixtos, con componentes terrígenos que van aumentando sobre todo en su parte occidental. Las principales masas de agua superficial que entran en la región provienen ya sea de la corriente del Norte de Brasil, que alrededor de Trinidad vira al oeste, a lo largo del talud continental, para entrar en el sur del Caribe (CONANP, 2009). Aunque la surgencia que se registra a lo largo de la costa norte de Colombia contribuye a una productividad relativamente alta en pequeñas zonas del sur del Caribe, el resto de la región se compone principalmente de aguas claras pobres en nutrientes, excepto en zonas costeras con alto aporte de sedimentos fluviales y, por tanto, de nutrientes (Wilkinson *et al.*, 2009).

Los elementos cruciales del ecosistema de aguas someras son los lechos de pastos marinos, los bancos de arena y las zonas de fondo lodoso (CONANP, 2009). En el Mar Caribe, los arrecifes de coral son sumamente importantes en cuanto a diversidad biológica, pero conforman un área relativamente pequeña de la totalidad del hábitat bentónico de agua somera. En su mayoría, los arrecifes están formados de corales que secretan calcio y prosperan en aguas oceánicas claras, someras y bajas en nutrientes, con luz solar en abundancia y temperaturas cálidas (Wilkinson *et al.*, 2009).

En los arrecifes de coral y en los lechos de pasto marino en el Caribe es común encontrar una gran variedad de especies de esponjas, las cuales desempeñan un

*Biogeografía de cepas de *Salinispora arenicola* evidenciada por el tipo de metabolitos secundarios que producen.*

papel importante en el mantenimiento de la claridad del agua y en la producción secundaria (Wilkinson *et al.*, 2009). Además, los manglares controlan la erosión, la retención de nutrientes y el amortiguamiento de las tormentas (Wilkinson *et al.*, 2009).

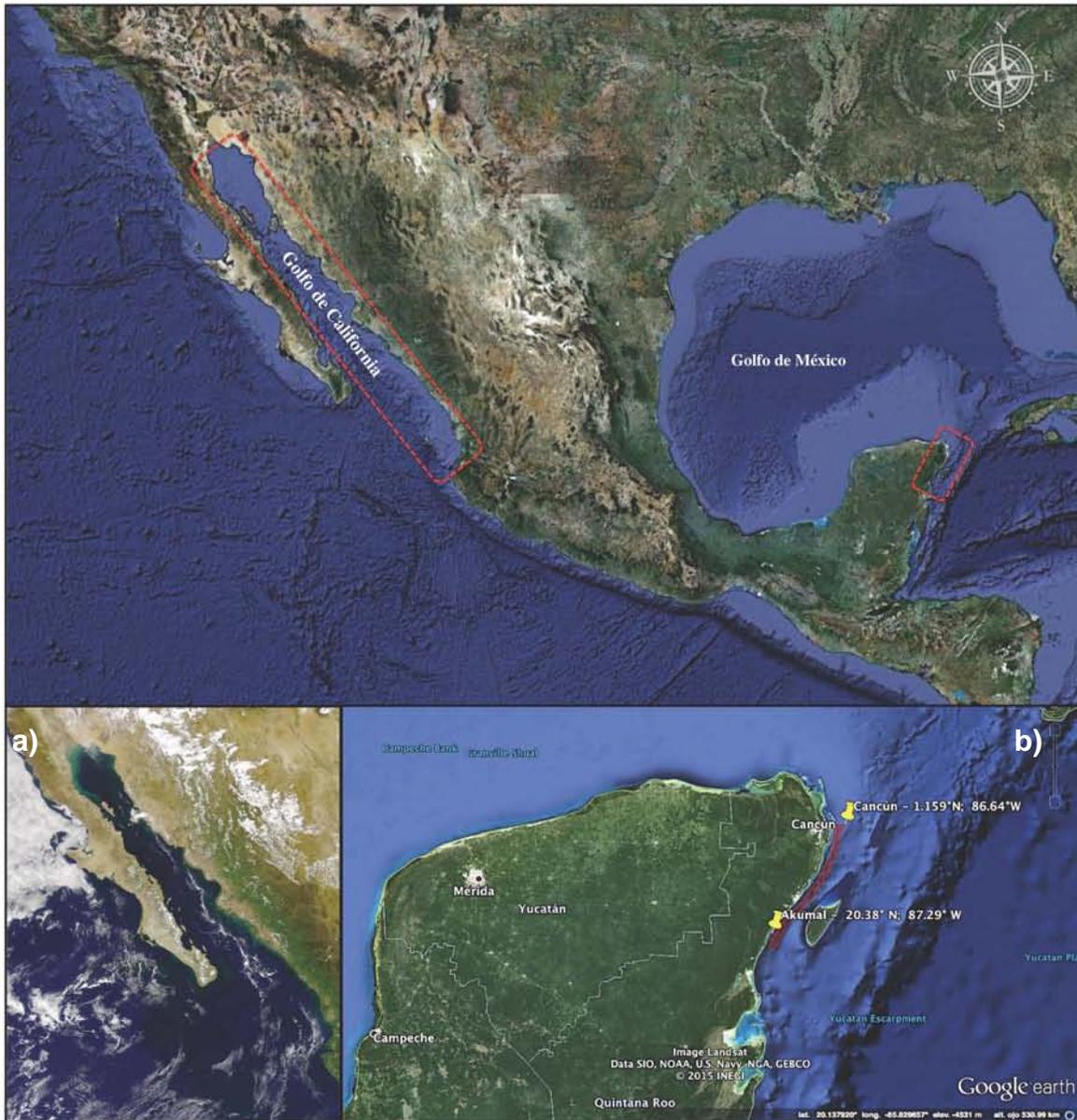


Figura 3. Área de estudio. a) Golfo de California y b) Mar Caribe (Imagen tomada de Google Earth, 2015).

CAPÍTULO II. MÉTODOS

2.1 Trabajo en campo

2.1.1 Colecta y procesamiento de las muestras

Las muestras de la zona del Mar Caribe fueron tomadas por métodos scuba a profundidades entre 5 y 30 metros en el estado de Quintana Roo. Por otro lado, las muestras del Golfo de California (Mar de Cortés) fueron obtenidas utilizando una draga de sedimento diseñada para utilizarse con facilidad fuera de borda (Figura 4).



Figura 4. Imágenes tomadas durante la colecta con la draga de sedimento.

Para el aislamiento de actinomicetos se utilizaron dos métodos:

1. Método de esponja: consistió en utilizar una esponja estéril, colocarla sobre la muestra seca y pasarla al medio siguiendo un patrón circular para realizar una dilución.
2. Método de dilución en serie: se tomó 1 mL de la muestra de sedimento y se diluyó primero en 4 mL de agua de mar estéril (1:5) y fue tratado durante 5 min a 65 °C para eliminar bacterias no resistentes al estrés del calor. De

Biogeografía de cepas de Salinispora arenicola evidenciada por el tipo de metabolitos secundarios que producen

esta dilución se continuó con una dilución serial en las siguientes proporciones: 1:10, 1:100 y 1:1000 de la respectiva muestra.

3. Posteriormente se utilizaron 50 µl de cada dilución para sembrar en cajas Petri con medio de cultivo A1 (Tabla 3) sólido + antibiótico.
4. Las muestras se incubaron a 28 °C durante 1-2 semanas hasta observar crecimiento de colonias con morfología similar a las reportadas para el género *Salinispora* (Maldonado *et al.*, 2005).

Tabla 3. Contenido del medio de cultivo A1 para un litro de agua de mar.

Reactivo	A1 sólido (g)	A1 líquido (g)	SWA*
Almidón	10	10	-
Levadura	4	4	-
Peptona	2	2	-
Agar	16	-	16
Agua de mar (L)	1	1	-
Agua desionizada (L)	-	-	1
Antibiótico (Rifampicina)	5 µg mL ⁻¹	5 µg mL ⁻¹	-

* SWA: Seawater agar (en inglés) o agua desionizada

2.2 Diseño experimental:

2.2.1 Aislamiento de cepas de *Salinispora*

Se obtuvieron 18 cepas pertenecientes a esta especie (Tabla 4 y 5). Adicionalmente, mediante la observación al microscopio se confirmó la morfología característica a la del género *Salinispora* (Maldonado *et al.*, 2005), como prueba de confirmación del género, las cepas se cultivaron en medio A1 (A1: agar con agua desionizada o también llamada Seawater agar (SWA, en inglés) (Tabla 3) para verificar su dependencia al agua de mar para su crecimiento.

2.2.2 Procesamiento de cepas criogenizadas (Reactivación)

Las cepas del Golfo de California (11 cepas) (Tabla 4) y del Mar Caribe (7 cepas) (Tabla 5) congeladas, se reactivaron descongelándolas y tomando 100 µl con una pipeta. Posteriormente se pasaron a un tubo de polipropileno de 1.5 mL (tubo “ependorf”) para macerar las células con un pistilo estéril y se transfirió a una caja Petri con medio A1 y, a la vez, a matraces de 125 mL con 50 mL de medio A1 líquido ambos con antibiótico (rifampicina a 5 µg mL⁻¹), con la finalidad de evitar la posible contaminación por bacterias Gram negativas. Las cajas y matraces se incubaron por un periodo de entre 1 y 2 semanas a 28 °C.

Tabla 4 y 5. Cepas de *Salinispora arenicola* aisladas a partir de sedimentos en el Golfo de California y el Mar Caribe.

Golfo de California		Mar Caribe	
Cepa (Clave)		Cepa (Clave)	
AMS	155	NCA	041
S	680	NCA	038
CNY	686	NCA	080
CNY	687	NCA	083
CNY	688	NCA	081
CNY	689	NCA	087
CNY	690	NCA	088
CNY	691		
CNY	692		
CNY	695		
CNY	696		

2.2.3 Cultivo de las cepas aisladas

En ambos casos (cultivo y reactivación), las cepas aisladas fueron sembradas de forma estriada para purificar colonias y más adelante una colonia fue cultivada en medio de cultivo A1 líquido descrito anteriormente en la Tabla 3. Una vez obtenida una densidad de cultivo óptima para preservación (0.0169 – 0.0405 mL) se agregó glicerol en una concentración final de 20% y fueron guardadas a -80 °C.

2.2.4 Obtención de ADN genómico

La extracción de ADN genómico se realizó mediante una modificación de lisis *in situ* y absorción en sílice reportado por Rojas-Herrera *et al.* (2008):

1. Se tomaron 500 µl del cultivo líquido en un tubo “eppendorf” y se homogenizó con un agitador “vortex” durante 1 minuto.
2. Se centrifugó durante 5 minutos a 12,000g a temperatura ambiente.
3. Se añadió 1mL de solución TEN (solución para lisis celular que contenía: Tris-HCl 10mM a pH 8.0, ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) 1mM a pH 8.0) y se agitó en el “vortex” durante 30 segundos.
4. Los tubos se incubaron a 37 °C durante 1 hora a baño maría, y se agitaron suavemente cada 10 minutos.
5. Transcurrido el tiempo se colocaron las muestras durante 10 minutos en un baño de hielo/alcohol (-10 °C) y luego 5 minutos en un baño de agua a 65 °C. Este ciclo se repitió tres veces.
6. Posteriormente, se añadieron 20 µl de la solución SDS al 20% y se agitó en “vortex” durante 1 minuto.
7. Se incubaron en un baño de agua durante 30 minutos a 30 °C.
8. Se centrifugó durante 10 minutos a 10,000g a temperatura ambiente.

Biogeografía de cepas de Salinispora arenicola evidenciada por el tipo de metabolitos secundarios que producen

9. Se transfirió el sobrenadante a un tubo “eppendorf” y se añadieron 500 µl de acetato de potasio 5 M.
10. Se incubó durante 5 minutos en un baño de agua a 65 °C.
11. Se incubó en un baño de hielo/alcohol durante 20 minutos.
12. Se centrifugó durante 30 minutos a 11,000g a 4 °C.
13. Se transfirió el sobrenadante a un tubo “eppendorf” nuevo y se añadieron 200 µl de la suspensión de SiO₂ (Óxido de silicio) al 4% en agua destilada
14. Se agitó por inversión durante 3 minutos.
15. Se centrifugó durante 2 minutos a 11,000g a temperatura ambiente y se desechó el sobrenadante.
16. Se lavó el precipitado, dos veces con 1 mL de etanol al 70% (sin agitar) y centrifugando cada vez 2 minutos a 11,000g a temperatura ambiente.
17. Se eliminó el exceso de etanol y se dejó evaporar el resto sobre la mesa.
18. Se resuspendió la pastilla con 50 µ L de agua destilada y se incubó durante 5 minutos en un baño de agua a 55 °C con agitación ocasional.
19. Se centrifugó durante 5 minutos a 11,000g a temperatura ambiente.
20. Se transfirió el sobrenadante a un tubo nuevo, cuidando de no llevar parte del sílice (SiO₂) que se encontraba precipitado.

2.2.5 Identificación de cepas por métodos moleculares

2.5.1 PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa): Método de Kary Mullis, 1986 (modificado).

2.2.5.1.1 Oligonucleótidos empleados en el análisis de PCR

Para la identificación de cepas, se utilizó la secuencia del gen 16S rRNA (Moore Foundation Sequencing Facility, en UC San Diego). Todas las reacciones se iniciaron bajo las siguientes condiciones: 2 µl de ADN genómico, 4 µl 10X buffer

Biogeografía de cepas de Salinispora arenicola evidenciada por el tipo de metabolitos secundarios que producen

de PCR, 4 µl de MgCl₂ (25 mM), 0.5 µl de cada oligonucleótido (25 mM), 1.6 µl de dNTP mix (10mM), 5U Taq DNA polimerasa, 2.4 µl de DMSO y 23.6 µl de agua MilliQ estéril. La desnaturalización inicial se realizó a 94 °C durante 10 minutos, seguido de 35 ciclos a 94 °C durante un minuto. Las temperaturas de alineamiento de los oligonucleótidos se presentan en la Tabla 6: 1 minuto para alargamiento a 72 °C y el último paso, la extensión a 72 °C durante 7 minutos.

Tabla 6. Secuenciación de ADN genómico. Oligonucleótidos y condiciones de PCR.

Gen	Nombre del Oligo.	Secuencia de los oligonucleótidos (5'-3')	Temp. (°C)	Medida de la ampliación (pb)
¹ 16S	FC27	CCGCGGCTGCTGGCACGTA		
² rRNA	RC1492	GTGCGGGCCCCCGTCAATT	63	1465
³ gyrB	7G_gyrB_F	GTICGYAWVCGICCSGGHATGTAC	60	1460
	7G_gyrB_R	CCGTCVACRTCRGCRTCSGCCATS		
	gyrB_TPF	CGACGAGGGCGACGATGGCAAGAT	60	824
	gyrB_TPR	GGATRCCGGTGCCGAGCG		

¹16S = Gen 16S de ARN ribosomal.

²rRNA = Gen ARN ribosomal.

³gyrB = Codificador girasa B o topoisomerasa II.

2.2.6 Protocolo de cultivo de *Salinispora arenicola* usando rojo de fenol (Sarkar, 2014).

Materiales:

1. Canica o esfera de cristal de tamaño 750-1000 µm (Sigma-Aldrich, esferas de borosilicato, diámetro 1 mm).
2. Rojo de Fenol (Sigma, 1000 X, Stock 10 mg/mL en agua desionizada estéril).
3. Tubos PCV, conteo de células empaquetadas (TPP cell counting PCV tubes: MidSci™, Sigma-Aldrich).

Precultivo

1. En un matraz Erlenmeyer de 125 mL se agregaron 20 esferas por cada 50 mL de medio A1, se ajustó el pH hasta 6.5 con ácido clorhídrico (HCl) y se esterilizó en autoclave (Harvey - Sterile Max) (1 hora 20 minutos a 100 °C).
2. En cada matraz que contenía los 50 mL de medio líquido A1 (precultivo), se sembraron las 18 cepas puras de *S. arenicola* identificadas previamente y sembradas en primera instancia en cajas Petri y se precultivaron por mezclado a 160 RPM a 28 °C de 5 a 10 días.
3. Se dejaron crecer los precultivos hasta que las células empaquetadas alcanzaron un volumen 5 µl/100 µl del cultivo y se midió el volumen de las células empaquetadas mediante el conteo en tubos PCV (TPP cell counting packed cell volume PCV tubes: MidSci™, Sigma Aldrich). Para medir los parámetros en los tubos PCV, en un tubo “ependorf” se transfirió 1 mL del precultivo y las células se maceraron con un pistilo estéril. De ahí, se transfirieron 100 µl a un tubo PCV y se centrifugó a 15000 RPM durante 11 minutos.

Cultivo

1. En un frasco esterilizado Erlenmeyer de 125 mL con 20 esferas en una concentración de 20 esferas por 50 mL de medio A1 para producción (20 esferas/50 mL) se inocularon 2 mL del precultivo.
2. Se agregaron 50 µl de rojo de fenol filtrado y esterilizado.
3. Se dejaron crecer de 1-3 semanas y el cultivo terminó cuando viró a un color rojo, el cual correspondía a un pH de 8. Para medir el pH se tomó 1

Biogeografía de cepas de Salinispora arenicola evidenciada por el tipo de metabolitos secundarios que producen

mL del medio de cultivo y se midió en un “eppendorf” mediante el uso de un papel indicador de pH (MACHEREY-NAGEL).

4. Cuando se alcanzó el pH 8, se añadió de inmediato el acetato de etilo (AcOEt).

2.3 Extractos crudos

2.3.1 Extracción líquido-líquido

2.3.1.1 Procedimiento experimental

- a. La extracción se realizó con un volumen equitativo de acetato de etilo (50 mL AcOEt - Fischer Scientific) y se dejó en agitación durante 24 horas.
- b. La elección del acetato de etilo (AcOEt) como disolvente se basó en cinco criterios (Tabla 7):
 1. Que fuera inmisible en agua.
 2. Que disolviera en mayor cantidad que el agua, a los compuestos químicos con polaridad media.
 3. Con un punto de ebullición bajo de manera que, una vez finalizada la extracción, el soluto pudiera recuperarse eliminando el disolvente a presión reducida en el rotaevaporador.
 4. Que no reaccionara con los compuestos químicos a extraer.
 5. No fuera tóxico y, entre varios disolventes posibles, el más accesible.

Tabla 7. Propiedades químicas del acetato de etilo (AcOEt).

Disolvente	Fórmula química	Densidad (g/mL) (g)	Solubilidad en agua (g/100 mL)	Punto de ebullición	Agua disuelta (g/100 mL)
Acetato de etilo	CH ₃ -C(=O)-O-CH ₂ -CH ₃	0.894	8.0	77 °C	2.9

2.3.1.2 Etapas de la extracción líquido-líquido:

- a) Preparación del material.
- b) Adición de las fases.
- c) Separación de las fases.
- d) Secado de la fase orgánica.
- e) Filtración y eliminación del disolvente (AcOEt).

a) Preparación del material:

- La extracción se realizó en un embudo de separación provisto de un tapón y una llave que ajustó perfectamente sin causar pérdidas.
- Se colocó el embudo de decantación cónico sobre un aro metálico unido a un soporte. Y se comprobó que la llave estuviera cerrada (Figura 5 a).

b) Adición de las fases:

- Se vertió al embudo de decantación la disolución que contenía el medio de cultivo y el acetato de etilo (Figura 5 b).

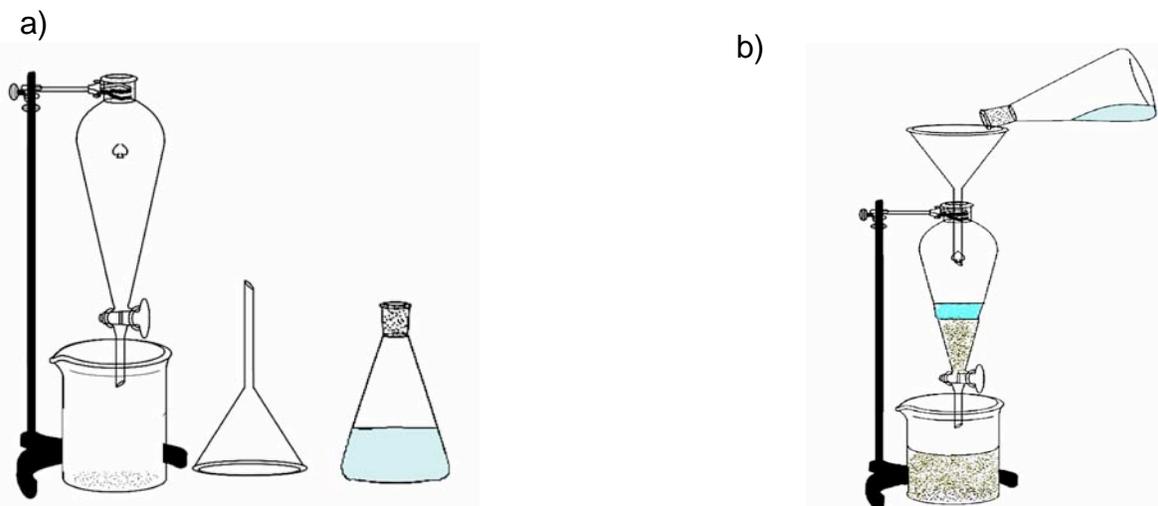


Figura 5. Procedimiento para la separación de las fases orgánica y acuosa.

a) Preparación del material. b) Adición de las fases.

*Biogeografía de cepas de *Salinispora arenicola* evidenciada por el tipo de metabolitos secundarios que producen.*

c) Separación de las fases (orgánica y acuosa):

- Una vez que la disolución se vertió en el embudo de decantación se esperó unos minutos hasta que las fases se separaran y se observó claramente la línea de separación.
- Para separar las fases líquidas inmiscibles por completo se añadió una disolución saturada de cloruro de sodio (NaCl) y se agitó suavemente. El cloruro de sodio es un electrolito fuerte para la fase acuosa, por lo que contribuyó a la separación completa de las fases orgánica y acuosa.
- La fase inferior (acuosa) se separó del embudo abriendo la llave. Y a medida que el volumen de la fase inferior fue disminuyendo, se cerró gradualmente hasta que la línea de las fases se aproximó a la llave.
- La fase superior (orgánica) se colocó en un matraz.

d) Secado de la fase orgánica:

- Para eliminar los restos de agua en la fase orgánica se añadió a la solución un agente desecante inerte: en este caso fue sulfato de sodio anhidro (Na_2SO_4) que cubrió el fondo del matraz y se agitó ligeramente alrededor de su posición vertical.
- Se dejó en reposo (10 a 15 minutos) hasta que la turbidez desapareció y la disolución se veía completamente transparente.

e) Filtración y eliminación del disolvente:

- El agente desecante hidratado (sulfato de sodio anhidro, Na_2SO_4) se filtró por gravedad sobre un matraz utilizando un embudo cónico y papel filtro.
- El matraz, el agente desecante y el filtro se lavaron con el mismo disolvente para evitar pérdidas del producto químico (Figura 6).

Biogeografía de cepas de Salinispora arenicola evidenciada por el tipo de metabolitos secundarios que producen.

- El disolvente se eliminó a presión reducida o vacío en el rotavapor (BUCHI), y de este modo se obtuvo el compuesto extraído.
- Los extractos crudos se conservaron en viales color ámbar etiquetados a -20 °C

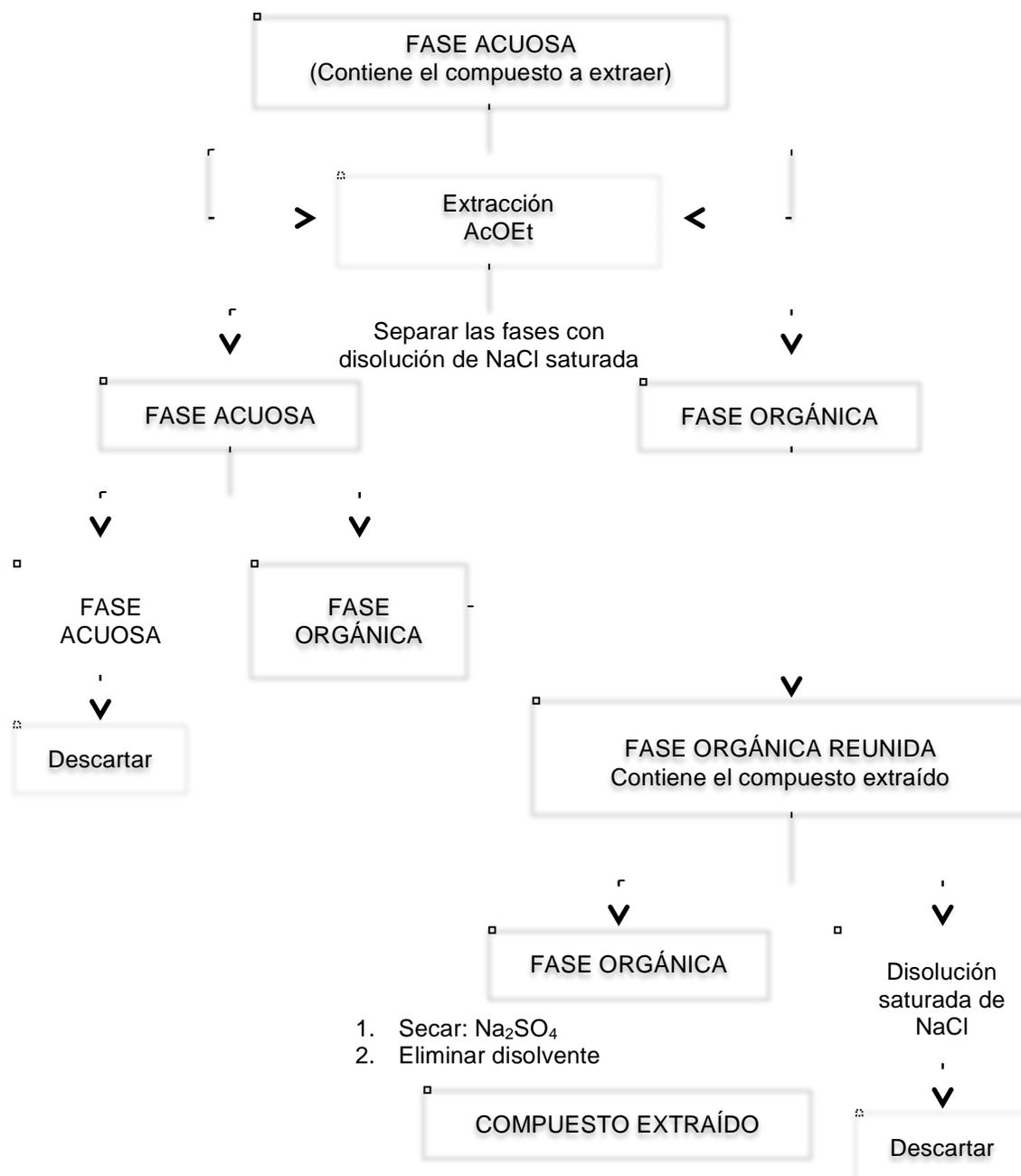


Figura 6. Procedimiento para la obtención de extractos crudos de *S. arenicola*.

2.4 Análisis de los extractos crudos a partir de cepas de *S. arenicola*

2.4.1 Análisis de extractos crudos por el método de Cromatografía de Líquidos acoplado a detector de masas de alta resolución (Liquid Chromatography-High Resolution Mass Spectrometry: LC-HRMS y MS) (Duncan *et al.*, 2015).

Los extractos crudos se resuspendieron en metanol (MeOH) a una concentración final de 1 mg/mL y fueron inyectados en un sistema cromatográfico Agilent 1260 acoplado a un detector de Masas de Alta Resolución Agilent 6530 Accurate-Mass Q-TOF, con las siguientes condiciones de análisis: columna de cromatografía líquida de alto rendimiento (CLAR, UPLC en inglés) C18 de fase reversa (Kinetex, diámetro de la partícula 2.6 μm , 100 x 4.6 mm, Phenomenex Inc.) con un flujo de 0.71 mL/min. Las muestras fueron analizadas utilizando un sistema de Cromatografía líquida Agilent 1260 acoplado a un detector de Masas de Alta resolución Agilent 6530 Accurate-Mass Q-TOF bajo las siguientes condiciones de LC: ácido trifluoroacético (TFA) al 0.1% (v/v) (en solución con 10 % de acetonitrilo (MeCN) en agua) de 1 a 5 minutos, 10 a 100% de MeCN de 5 a 26 minutos y 100% de MeCN de 26 a 30 minutos. La válvula de desvío se estabilizó durante los primeros 5 minutos en los cuales no se toman datos (waste). Los ajustes del Q-TOF MS (Quadrupole Time-of-Flight o cuadrupolo tiempo de vuelo) durante el gradiente de LC, fueron los siguientes: modo de iones positivos con un intervalo de masas entre 300-2500 m/z, tasa de escaneo de MS 1/s, tasa de escaneo MS 5/s, energía de colisión fija de 20 electrón-volts (eV), temperatura de la fuente del gas de 300 °C, flujo del gas de 11 litros por minuto y el nebulizador a 45 psig (libras por pulgada cuadrada). Los parámetros de la fuente de escaneo fueron: Vcap 3000, fragmentador 100, skimmer1 65 y octopoleRFPeak 750. El MS fue autosintonizado usando la solución de sintonización Agilent en un modo positivo antes de cada determinación.

*Biogeografía de cepas de *Salinispora arenicola* evidenciada por el tipo de metabolitos secundarios que producen.*

Los datos de **LC-HRMS** fueron analizados con el software ChemStation (Agilent) que realizó el registro de los datos cromatográficos. Los datos de los 18 espectros de **MS** (un espectro por cada cepa) fueron analizados con el software MassHunter (Agilent) que realiza el análisis cuantitativo y cualitativo de compuestos.

2.4.1.1 Técnica analítica de ionización por ElectroSpray (ESI, en inglés) en el detector de masas de alta resolución Q-TOF MS (Cuadrupolo tiempo de vuelo o Quadrupole Time-of-Flight, en inglés)

La técnica de ionización por ElectroSpray (ESI, en inglés) para el análisis los 18 extractos crudos de *S. arenicola* es el método de ionización más empleado en los análisis de Líquidos Masas (LC-HRMS). Esta técnica analítica se basó en la transferencia de cargas (ión positivo) y estabilización del ión molecular, siendo este el $[M+H]^+$. Durante el análisis por ESI se utilizó energía para asistir la transferencia de iones de una solución a una fase gaseosa antes de que la muestra fuera sometida a análisis por espectrometría de masas de alta resolución.

La transferencia de especies iónicas de la solución a fase gaseosa por ElectroSpray, involucró tres pasos:

1. Dispersión de pequeñas gotas cargadas por un fino spray.
2. Evaporación del solvente
3. Expulsión de los iones a partir de las gotas altamente cargadas.

El tubo en donde se realizó la colisión fue mantenido a alto voltaje (20 electrón-volts (eV)). Se generó una niebla cargada con pequeñas gotas de alta energía con la misma polaridad del capilar de voltaje. Se aplicó una nebulización por gas (Nitrógeno), que cortó alrededor de la muestra en solución eluida. Las gotas de agua cargadas, generadas a la salida de la punta del ElectroSpray, se

Biogeografía de cepas de Salinispora arenicola evidenciada por el tipo de metabolitos secundarios que producen

transmitieron por un gradiente de presión y un gradiente de potencial a través de la región del analizador del espectrómetro de masas para su subsecuente análisis de masa molecular y determinación de la intensidad del ión. Para obtener la información estructural de la molécula, los iones moleculares fueron seleccionados por su masa y posteriormente fragmentados en una celda de colisión.

Durante el análisis por ElectroSpray se detectó la formación de aductos de sodio $[M+Na]^+$ y aductos protonados $[M+H]^+$. El término "ion aducto" es un término conocido en los análisis por cromatografía de líquidos acoplado a un detector de masas de alta resolución (LC-HRMS) para describir iones formados por la adición de protones $[M+H]^+$ como sales o trazas de iones cargados. Estos iones, se vieron reflejados en la masa del ión molecular de los compuestos identificados. Además, los iones aducto de metal más comúnmente observados en los análisis de ElectroSpray durante la ionización positiva, son aductos de sodio y potasio $[M+Na]^+$ y $[M+K]^+$, respectivamente. Sin embargo, en la técnica analítica por ElectroSpray en LC-HRMS también se pueden formar otras especies de aductos, por ejemplo, iones de amonio $[M+NH_4]^+$; iones metálicos $[M+Fe]^+$ y moléculas de disolventes $[M+H+H_2O]^+$. En el análisis de ionización negativa, se forman especies como $[M+Cl]^-$. En la Tabla 8, se muestran los tipos de iones aductos más comunes que se observan en ESI y el valor correspondiente de m/z.

Tabla 8. Iones aducto más comunes que se forman durante la técnica analítica por ElectroSpray (ESI, en inglés).

Ión aducto	Valor de m/z observado
$[M+H]^+$	M+1
$[M+Na]^+$	M+23
$[M+K]^+$	M+39
$[M+xH]^+$	$(M+x)/x$
$[M+xNa]^{+x}$	$(M+23x)/x$
$[M+xK]^{+x}$	$[M+39x]/x$
$[M+xNa+yK+zH]^{+(x+y+z)}$	$[M+23x+39y+z]/(x+y+z)$

Biogeografía de cepas de Salinispora arenicola evidenciada por el tipo de metabolitos secundarios que producen

El análisis por ElectroSpray es una técnica suave que no rompe por completo a la molécula, por esta razón, la fragmentación de las moléculas durante el análisis fue menor. Durante el análisis ESI, se separaron los iones moleculares que fueron generados por su relación masa carga (m/z) y la forma de observar la abundancia relativa de cada ión molecular fue a través de los espectros de MS de cada muestra de *S. arenicola*. La identificación de los metabolitos secundarios se realizó por masas de alta resolución.

2.4.1.2 Procedimiento para el manejo de archivos de cromatografía LC-HRMS y espectrometría de MS

Los datos de cromatografía líquida y fragmentación de masas, LC-HRMS y MS, respectivamente, fueron generados para investigar los compuestos producidos por *S. arenicola* bajo las condiciones descritas anteriormente. Los datos crudos del LC-HRMS y MS se analizaron mediante una búsqueda de masas de alta resolución y comparando contra distintas bibliotecas de compuestos de la base de datos en la plataforma **The Global Natural Product Social Molecular Networking (GNPS)** ([www.http://gnps.ucsd.edu](http://gnps.ucsd.edu)).

Primeramente se compararon los 18 espectros generados a partir de los extractos crudos de las cepas contra los 23 compuestos de *Salinispora* spp. previamente reportados (Tabla 1). Los tres compuestos identificados pertenecieron a este grupo y fueron: Salinicetal A, Estaurosporina y Arenimicina B. La identificación de estos compuestos se realizó utilizando los espectros de MS los cuales se emparentaron con iones de masas reportados y por medio del uso de los parámetros preestablecidos de búsqueda en la plataforma GNPS con tolerancia de diferencia de masa de ± 0.5 Da entre fragmentos (1 Da: unidad de masa atómica (u.m.a.), equivale a $1.660\ 538\ 921 \times 10^{-27}$ kg (valor recomendado por el Comité de Información para Ciencia y Tecnología, 1966) (International Bureau of

*Biogeografía de cepas de *Salinispora arenicola* evidenciada por el tipo de metabolitos secundarios que producen.*

Weights and Measures, 2006) así como el ión molecular $[M+H]^+$. Los compuestos identificados se relacionaron con patrones de fragmentación de los espectros de MS de la plataforma GNPS y se sometieron a una red de trabajo de MS ("Molecular Networking") utilizando el programa Cytoscape para su visualización.

Los métodos incluyeron:

1. Función de extracción de iones del MassHunter.
2. Búsqueda de LC-HRMS y MS en la plataforma GNPS y en una red molecular de datos en Cytoscape.
3. Búsqueda de fragmentos previamente reportados análogos a fragmentos de los espectros de MS de cada muestra.

Para realizar este procedimiento se realizaron los siguientes pasos:

1. Se instaló el entorno Windows 8.1
 - Se utilizó el programa de entorno Windows para Mac OSX (Parallels Desktop).
2. Convertir archivos de .d a .mzXML
 - Para transformar los archivos de .d a mzXML en el entorno Windows se utilizó el programa **MSConvert (Versión 3.0, Proteowizard)**. Este programa permitió convertir los archivos que contenían los datos de espectrometría que el LC-HRMS guardó como .d en mzXML.
3. Visualización de los archivos de espectro transformados
 - Para visualizar los archivos en .mzXML se utilizó el programa **SeeMS (Versión 3.0, Proteowizard)**.
4. Transferencia de los archivos en .mzXML vía ftp a **GNPS**:
 - Existen varios programas para la transferencia de archivos vía ftp. como: Filezilla, Cyberduck, Transmit, etc.
 - Para el manejo de los archivos de espectro de MS de *S. arenicola* se utilizó el programa **Cyberduck** y realizó lo siguiente:

*Biogeografía de cepas de *Salinispora arenicola* evidenciada por el tipo de metabolitos secundarios que producen*

- Se creó un usuario en la plataforma GNPS.
- En Host: ccms-ftp01.ucsd.edu
- En el programa Cyberduck se seleccionaron los archivos en .mzXML y se subieron a la plataforma GNPS.

5. Red de trabajo: **The Global Natural Products Social Molecular Networking (GNPS):**

- En la plataforma GNPS se asignó un nombre al proyecto (“Archivos de espectro: *S. arenicola*”).
- Se seleccionaron los archivos para generar la red de trabajo (“Archivos de espectro”) y se subió el trabajo.
- Cuando concluyó el trabajo, se seleccionó la opción “Mirar todos los clusters” (View All Clusters).
- En la tabla de descargas, se revisó “Tab-delimited Result” y se observaron los resultados en: All. Download. Seleccionando la opción Spreadsheet.
- Se cambiaron los archivos de “networkedges_selfloops” y “clusterinfosummarygroup_attributes_withIDs” generados en la plataforma GNPS a formato .txt haciendo un cambio de terminación en el nombre del archivo.

6. Programa Cytoscape para generar redes moleculares:

- Se cargaron los archivos a **Cytoscape** (“networkedges_selfloops” primero), en donde: La fuente de interacción fue: Columna 1, Tipo de Interacción, Columna 5, Columna 2.
- Se importó la tabla: Clusterinfo summary.
- Los espectros fueron alineados con los resultados del coseno calculado con similitud de “1” idéntico al espectro y “0” con ninguna similitud alguna. Esta opción está preestablecida en el programa Cytoscape.

Biogeografía de cepas de Salinispora arenicola evidenciada por el tipo de metabolitos secundarios que producen.

- Se generó la red de trabajo molecular en donde cada nodo representa el ión molecular $[M+H]^+$ de un determinado espectro y el grosor representa los resultados del coseno.
- Se asignaron colores a los grupos ("Fill Color"), de acuerdo a la zona de cada muestra.
- En la red molecular, se indican los compuestos reportados en las bibliotecas GNPS que se asociaron al ión molecular $[M+H]^+$ del espectro de MS.

7. Dereplicación

- El proceso de **dereplicación** se realizó en la plataforma GNPS. Este análisis también relaciona patrones de fragmentación similares para asociar a las moléculas que pueden considerarse como la misma.
- En la plataforma GNPS se asignó un nombre al proyecto y se seleccionaron los 18 archivos de espectro de MS (uno por cada cepa) a los cuales se les realizó el análisis de dereplicación.
- Las bibliotecas con las que se realizó la búsqueda fueron seleccionadas a partir de su contenido, principalmente las que estaban basadas en productos naturales: NIH Natural Products Library, NIH Pharmacologically Active Compounds, PhytoChemicalLibrary, FDA: Approved Drug Library from Selleck Chem (FDA Library).
- Se revisaron los 18 espectros correspondientes a los extractos crudos de las cepas los cuales se relacionaron con los compuestos de las bibliotecas seleccionadas. Los resultados se analizaron mediante el comando "View All Spectra, DB", y se determinó qué compuesto se encontraba en cada cepa de *S. arenicola* asociando su ión molecular $[M+H]^+$ y su patrón de fragmentación con el obtenido para cada cepa.

CAPÍTULO III. RESULTADOS

3.1 Peso total de los extractos crudos

Tabla 9 y 10. Peso total de los extractos crudos y rendimiento celular (mg/mL) a partir de cepas del Golfo de California y el Mar Caribe.

Golfo de California			
Cepa		Peso	Rto. celular
(Clave)		(mg)	(mg/mL)*
AMS	155	1.8	0.036
S	680	2.1	0.042
CNY	686	68.8	1.376
CNY	687	1.6	0.032
CNY	688	2.3	0.046
CNY	689	1.4	0.028
CNY	690	6.9	0.138
CNY	691	53.3	1.066
CNY	692	2.1	0.042
CNY	695	136.5	2.73
CNY	696	8.5	0.17

Mar Caribe			
Cepa		Peso	Rto. celular
(Clave)		(mg)	(mg/mL)*
NCA	041	2	0.04
NCA	038	2.5	0.05
NCA	080	7.3	0.146
NCA	083	59.5	1.19
NCA	081	5.3	0.106
NCA	087	4.3	0.086
NCA	088	1.7	0.034

*Rto.: Rendimiento celular de los extractos crudos= Peso final (mg)/mL de cultivo.

3.2 Análisis de dereplicación en la plataforma: The Global Natural Products Social Molecular Networking (GNPS) para los iones con parentescos esperados

En el análisis de **dereplicación**, en donde dos compuestos que tienen patrones de fragmentación idénticos o similares se asocian, el programa utiliza algoritmos con los que se procesaron los 18 espectros de MS de las cepas de *S. arenicola*.

Biogeografía de cepas de Salinispora arenicola evidenciada por el tipo de metabolitos secundarios que producen

El análisis de alta resolución por ElectroSpray (ESI, en inglés) reflejó iones “pseudomoleculares” como la adición de protones de sodio $[M+Na]^+$ y iones protonados $[M+H]^+$. El análisis indicó un total de tres compuestos que presentaron semejanza estructural con los compuestos previamente reportados en base a los parámetros establecidos. La forma de identificar estos compuestos fue a través del **ión molecular $[M+H]^+$** , siendo éste el ión que corresponde a la masa molecular del compuesto, el cual se disoció en iones producto de menor masa molecular que conforman a la molécula (fragmentos). Estos compuestos fueron: **Salinicetal A** ($m/z=418.26 [M+Na]^+$, cepas: AMS-155 y S-680), **Estaurosporina** ($m/z= 467.214 [M+H]^+$, cepa: S-680) y **Arenimicina B** ($m/z= 809.325 [M+H]^+$, cepa: NCA-087) (Tabla 11).

En el compuesto Salinicetal A (cepas AMS 155 y S 680) se presentaron diferencias entre la masa exacta reportada en la literatura con la masa del ión molecular, esta diferencia fue de 23 unidades de m/z que corresponden a la formación de un aducto de sodio $[M+Na]^+$. En los compuestos Estaurosporina y Arenimicina B, la diferencia de masa fue de una unidad de m/z y se formó un aducto protonado $[M+H]^+$ (Tabla 11).

La diferencia de masa entre el ión molecular $[M+H]^+$ de los espectros de MS con el ión de los compuestos de las bibliotecas GNPS se encontró dentro de un intervalo de ± 0.01 Da, indicando que se trataba de un mismo compuesto (Tabla 11).

Tabla 11. Metabolitos secundarios identificados mediante la biblioteca GNPS, red molecular y espectros de MS de <i>S. arenicola</i> .									
	Metabolito secundario	Muestra / localidad		Masa exacta	Ión molecular $[M+H]^+$ m/z	Dif. de masa m/z	Aducto	Fuente de ionización/ Instrumento	Ión
		Golfo California	Mar Caribe						
1	Salinicetal A	AMS 155		395.5329	418.262	23	$[M+Na]^+$	LC-ESI - qTof	Positivo
2	Salinicetal A	S 680		395.5329	418.262	23	$[M+Na]^+$	LC-ESI - qTof	Positivo
3	Estaurosporina	S 680		466.5310	467.214	1	$[M+H]^+$	LC-ESI - qTof	Positivo
4	Arenimicina B		NCA 087	808.305	809.325	1	$[M+H]^+$	LC-ESI - qTof	Positivo

1. Salinicetal A: Ión molecular $[M+Na]^+$ espectro de MS= 418.262 y espectro GNPS= 418.26 m/z : Diferencia de masa 0.002 Da
2. Estaurosporina: Ión molecular $[M+H]^+$ espectro de MS= 467.214 y espectro GNPS= 467.208 m/z : Diferencia de masa 0.006 Da
3. Arenimicina B: Ión molecular $[M+H]^+$ espectro de MS= 809.325 y espectro GNPS= 809.314 m/z : Diferencia de masa 0.011 Da

*Biogeografía de cepas de *Salinispora arenicola* evidenciada por el tipo de metabolitos secundarios que producen*

Adicionalmente, se comparó el patrón de fragmentación de cada molécula para confirmar que se trataba del mismo compuesto. Los fragmentos correspondían a fragmentos más ligeros y a carbocationes más estables que son átomos de carbono cargados positivamente, que se formaron por descomposición del ión molecular $[M+H]^+$.

A continuación, se hace una descripción de los metabolitos secundarios que se lograron identificar a partir de los análisis anteriormente descritos. En primera instancia se presenta la red molecular de trabajo que representa una visualización sobre la presencia de estos compuestos y que relacionó iones moleculares $[M+H]^+$ basada en la similitud de la abundancia relativa de cada ión (Figura 7). Posteriormente se presentan los cromatogramas (LC-HRMS) y espectros de MS con base en la identificación del ión molecular $[M+H]^+$, patrón de fragmentación y la estructura molecular de cada compuesto (Figuras 8 a 11).

3.3 Red molecular correspondiente a los espectros de MS de *S. arenicola*

La red molecular comparó iones moleculares $[M+H]^+$ generados en el análisis por ElectroSpray (ESI, en inglés) y relacionó nodos de acuerdo a la masa monoisotópica de cada ión molecular. Los tres compuestos asociados con las bibliotecas GNPS e identificados en los 18 espectros de MS de *S. arenicola* también fueron reconocidos en la red molecular de trabajo MS (Figura 7 a).

En esta red de trabajo MS se caracterizaron los compuestos por espectrometría de masas de alta resolución (MS) utilizando el patrón de fragmentación de los 18 espectros de los extractos crudos. Se generaron grupos (clúster, en inglés) de similitud a partir de iones moleculares $[M+H]^+$ y se compararon con los patrones de fragmentación previamente reportados en las bibliotecas GNPS (Figura 7). La red de trabajo MS muestra un total de 1,132 grupos y 2,971 nodos los cuales conforman la red de trabajo molecular de *S. arenicola* (Figura 7 a).

Biogeografía de cepas de Salinispora arenicola evidenciada por el tipo de metabolitos secundarios que producen

Dicha organización en redes o grupos permitió encontrar las relaciones entre los compuestos espectralmente idénticos. De los 1,132 grupos, solamente tres fueron reconocidos como un compuesto previamente reportado para *S. arenicola* de acuerdo al ión molecular $[M+H]^+$ y se señalaron en la Figura 7 con un cuadro de color. Como se puede observar, existen redes y nodos de ambas localidades relacionados entre sí como ocurrió con los compuestos Salinicetal A (cuadro rosa) y Estaurosporina (cuadro rojo), y, se identificó la presencia de nodos situados de forma individual, es decir, que no se relacionaron con otro ión molecular. Estos nodos corresponden a compuestos estructuralmente divergentes del resto y se fragmentaron en una única vía, formaron un único y específico grupo y nodo, agrupándose así con otros nodos aislados que no presentaron áreas relacionadas con otros compuestos, siendo este el caso del compuesto Arenimicina B (cuadro azul) que se encontró de forma aislada del resto de los nodos presentando una línea curva (Figura 7 b).

En la Figura 7 a y b se observa que en el compuesto Estaurosporina existen nodos de ambas localidades relacionados entre sí, y con una misma masa, sin embargo, cuando se realiza la comparación del patrón de fragmentación, es posible descartar que ambos iones moleculares sean de un mismo compuesto.

En la mayoría de las redes y nodos observados en la constelación, no se encontró relación con algún compuesto determinado y previamente reportado en las bibliotecas GNPS. Sin embargo, son estos compuestos no identificados los que mayoritariamente están presentes en cepas de ambas localidades. La descripción de los compuestos de esta red molecular, se enfocó solamente, en tres grupos de compuestos correspondientes a espectros de masas previamente descritos para *S. arenicola*.

Biogeografía de cepas de Salinispora arenicola evidenciada por el tipo de metabolitos secundarios que producen

• **RED MOLECULAR *S. arenicola***

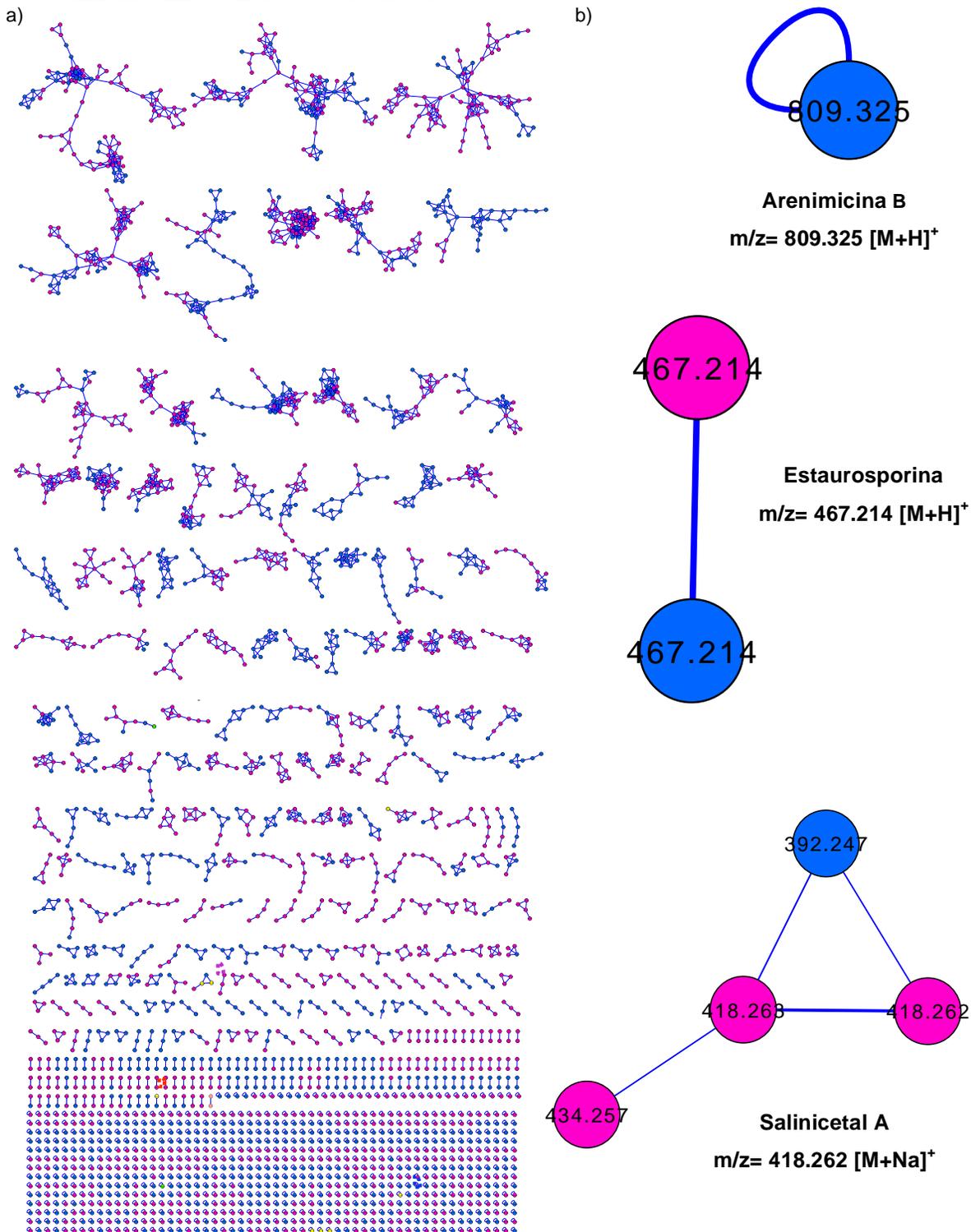


Figura 7. a) Red molecular correspondiente a los espectros de MS de *S. arenicola* y clusters de similitud. Los fragmentos son visualizados como un nodo (círculos), y la relación de cada nodo está definida por un borde (líneas). El grosor de los bordes define el grado de similitud de los espectros de MS. Nodo rosa: Golfo de California. Nodo azul: Mar Caribe. b) Metabolitos secundarios identificados en las bibliotecas GNPS de acuerdo al ión molecular $[M+H]^+$ de cada compuesto.

3.4 Metabolitos secundarios identificados mediante cromatografía LC-HRMS y espectrometría de MS en *S. arenicola*

- **Golfo de California**

- **3.4.1 Salinicetal A - Cepa AMS 155 y S 680**

El compuesto **Salinicetal A** es un metabolito secundario previamente reportado y producido por *S. arenicola* (Tabla 1) (Jensen *et al.*, 2015). Este compuesto es un policétido bicíclico. En su estructura contiene un anillo 1,4-dimetil-2,8-dioxabicyclo[3.2.1]-octa-3-ilo (Williams *et al.*, 2007). De acuerdo a la descripción de Williams y colaboradores (2007), la molécula contiene cinco grados de insaturación (dobles enlaces) un grupo metilo alílico (C-18), un grupo metilo unido a un carbono cuaternario sp² y un grupo carbonilo de amida (o una amida). También, presenta tres carbonos de metino unidos por grupos metilo. La estructura contiene dos grupos metino unidos a oxhidrilo o dos alcoholes secundarios, además de dos anillos oxigenados fusionados (Figura 8 d).

En el cromatograma LC-HRMS de la cepa AMS 155, el tiempo de retención para Salinicetal A fue de 13.39 a 13.64 minutos (Figura 8 a-b). En el espectro de MS así como en la respectiva ampliación, se reconoció el ión molecular m/z= 418.262 [M+Na]⁺ (Figura 8 c-d).

La diferencia de masa entre el ión molecular del espectro de MS con el de la biblioteca GNPS fue de 0.002 Da. También, se logró identificar el nodo correspondiente al ión molecular en la red molecular de trabajo MS. Para autentificar que se trataba de este metabolito, se realizó la comparación entre el patrón de fragmentación de Salinicetal A descrito en la biblioteca GNPS con el espectro de MS obtenido de la muestra. Con esta comparación se logró reconocer

Biogeografía de cepas de Salinispora arenicola evidenciada por el tipo de metabolitos secundarios que producen.

el mismo patrón de fragmentación entre ambos espectros. Por ende, cada fragmento representó un componente de este compuesto (Figura 8 e-h).

En el espectro de MS de la cepas S 680 así como en la respectiva ampliación, también se logró identificar el metabolito secundario **Salinicetal A**. En el cromatograma LC-HRMS, el tiempo de retención fue de 13.21 a 13.83 minutos (Figura 9 a-b).

Se puede observar con mayor claridad el ión molecular $m/z = 418.262 [M+Na]^+$ en la ampliación del espectro de MS (Figura 9 c-d). En ambas cepas, se presentó una diferencia entre la masa exacta con el ión molecular de 23 unidades de m/z indicado la formación de un aducto de sodio $[M+Na]^+$. La diferencia de masa entre el ión molecular del espectro de MS con el de la biblioteca GNPS fue de 0.002 Da.

De la misma forma que en la muestra anterior, para confirmar que se trataba de este metabolito secundario, se realizó la comparación entre el patrón de fragmentación de Salinicetal A descrito en la biblioteca GNPS con el del espectro de MS obtenido de la muestra. Cada fragmento representó un componente del compuesto y de esta manera fue posible encontrar las semejanzas estructurales y observar la similitud en el patrón de fragmentación en ambos espectros, indicando que se trataba del compuesto Salinicetal A (Figura 9 e-k).

Biogeografía de cepas de Salinispora arenicola evidenciada por el tipo de metabolitos secundarios que producen

- **Cromatograma LC-HRMS - Salinicetal A - Cepa: AMS 155**

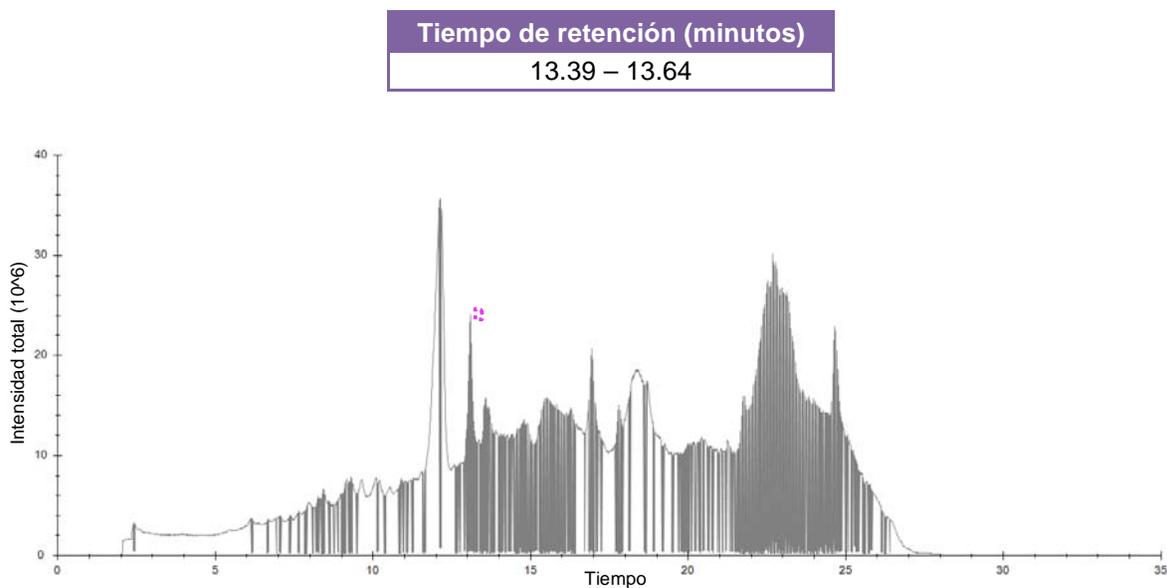


Figura 8 a. Cromatograma LC-HRMS correspondiente a la cepa AMS 155 del Golfo de California (línea punteada: fragmento del cromatograma en donde se encuentra el compuesto Salinicetal A).

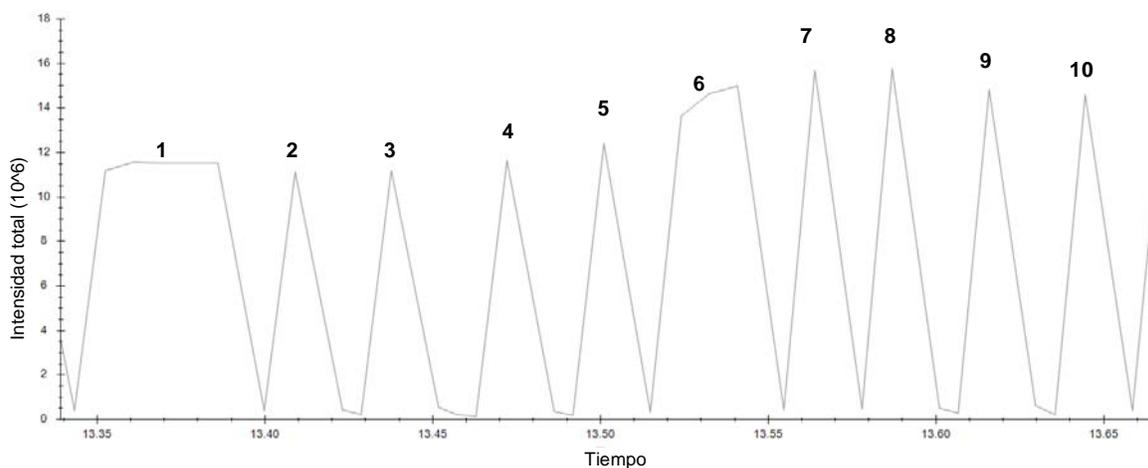


Figura 8 b. Perfil cromatográfico LC-HRMS correspondiente al metabolito secundario Salinicetal A, cepa AMS 155 (se indica el número de picos formados durante el análisis).

• **Espectro de MS - Salinicetal A - Cepa: AMS 155**

Fórmula molecular	Masa exacta	Ión molecular m/z	Biblioteca GNPS	Aducto	Dif. Masa m/z
C₂₂H₃₇NO₅	395.5329	418.262	418.26	[M+Na] ⁺	23

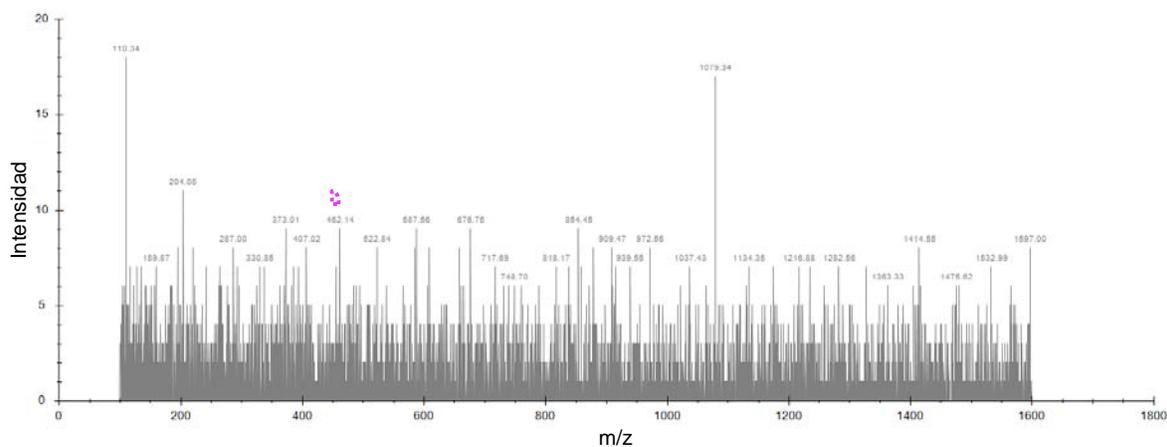


Figura 8 c. Espectro de MS correspondiente a la cepa AMS 155 del Golfo de California (línea punteada: fragmento del espectro en donde se encuentra el compuesto Salinicetal A).

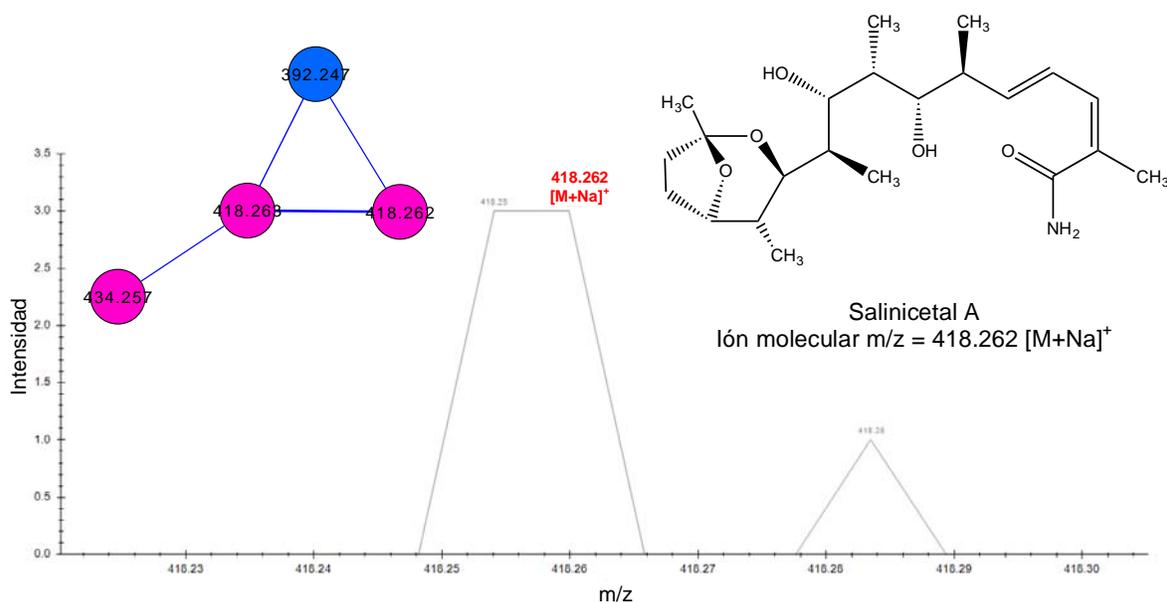
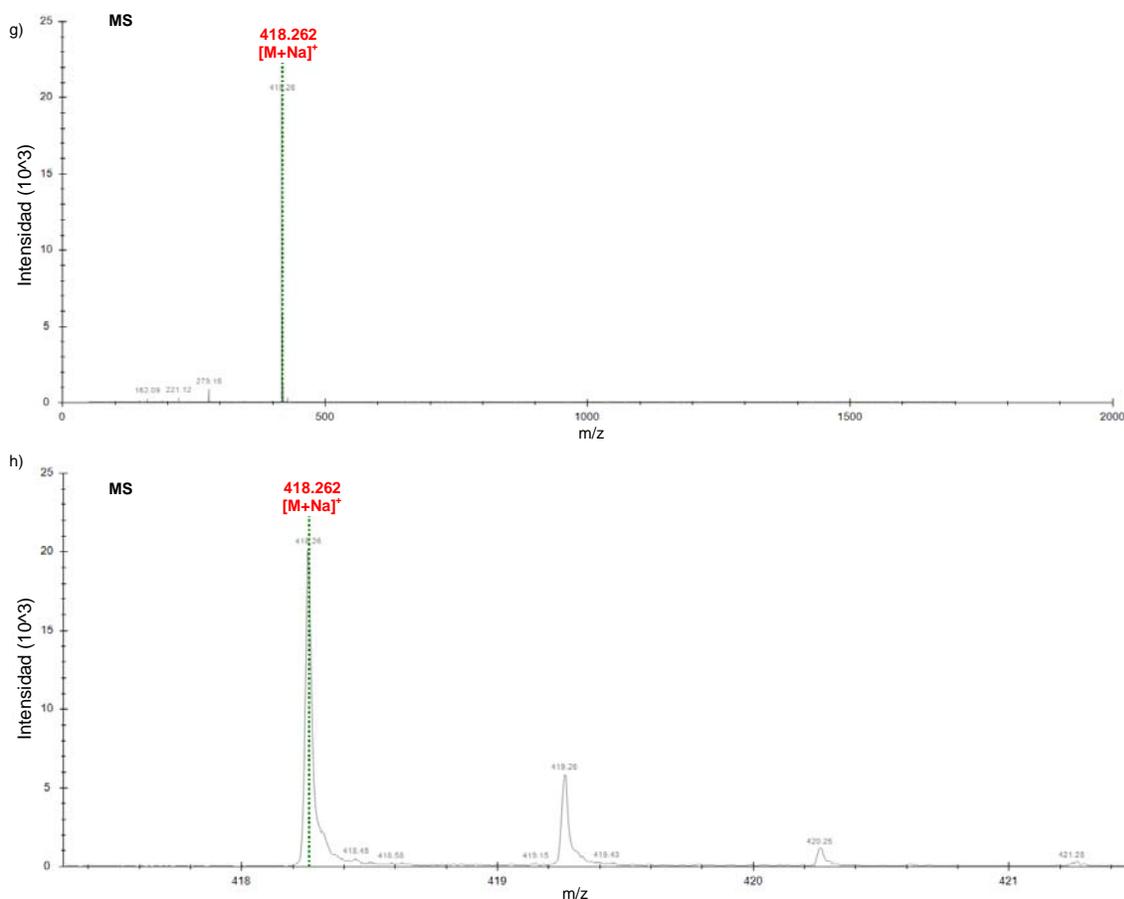
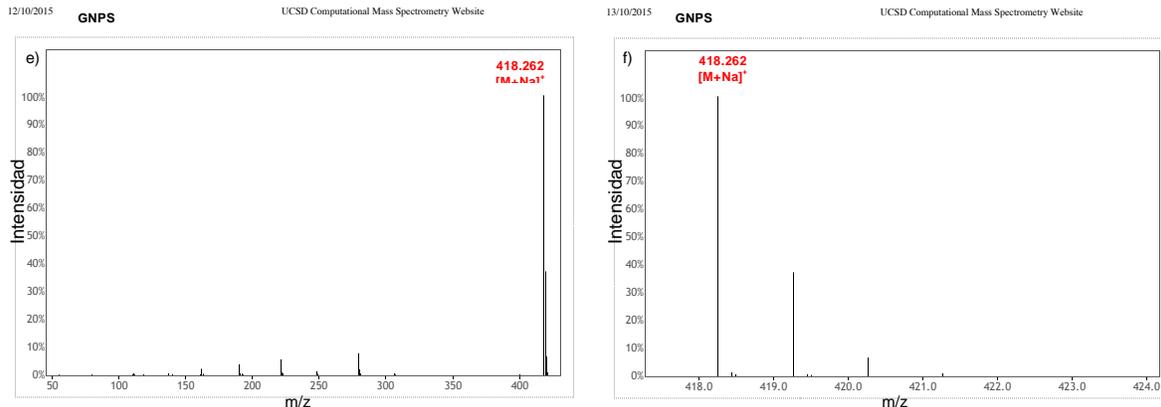


Figura 8 d. Ampliación del espectro de MS, cepa: AMS 155. Salinicetal A: Ión molecular m/z= 418.262 [M+Na]⁺. Identificado mediante la biblioteca GNPS, red molecular y espectro de MS.

Biogeografía de cepas de Salinispora arenicola evidenciada por el tipo de metabolitos secundarios que producen



3.4.2 Salinicetal A - Cepa: S 680

- **Cromatograma LC-HRMS - Salinicetal A - Cepa: S 680**

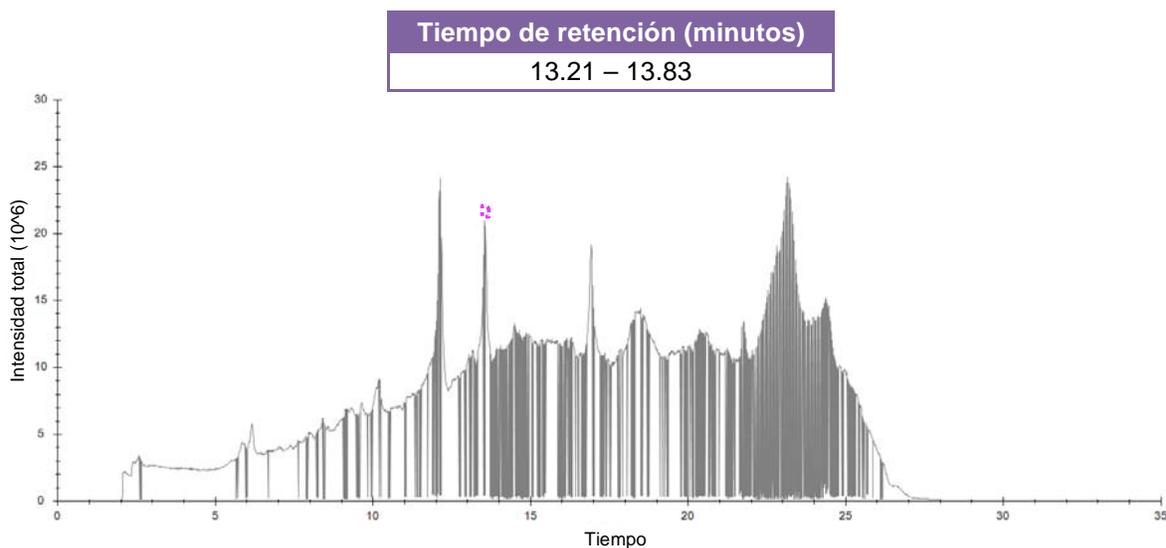


Figura 9 a. Cromatograma LC-HRMS correspondiente a la cepa S 680 del Golfo de California (línea punteada: fragmento del cromatograma en donde se encuentra el compuesto Salinicetal A).

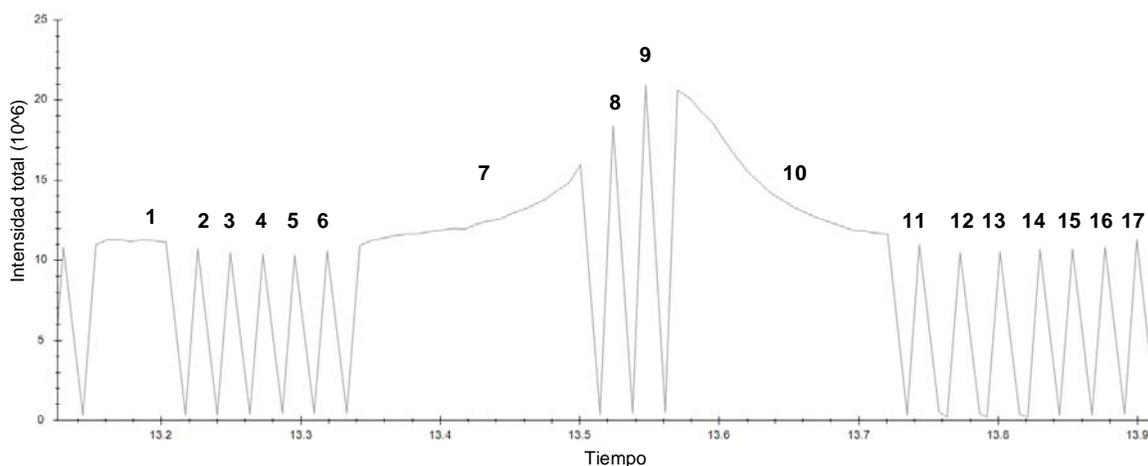


Figura 9 b. Perfil cromatográfico LC-HRMS correspondiente al metabolito secundario Salinicetal A, cepa S 680 (se indica el número de picos formados durante el análisis).

• **Espectro de MS - Salinicetal A - Cepa: S 680**

Fórmula molecular	Masa exacta	Ión molecular m/z	Biblioteca GNPS	Aducto	Dif. Masa m/z
C₂₂H₃₇NO₅	395.5329	418.262	418.26	[M+Na] ⁺	23

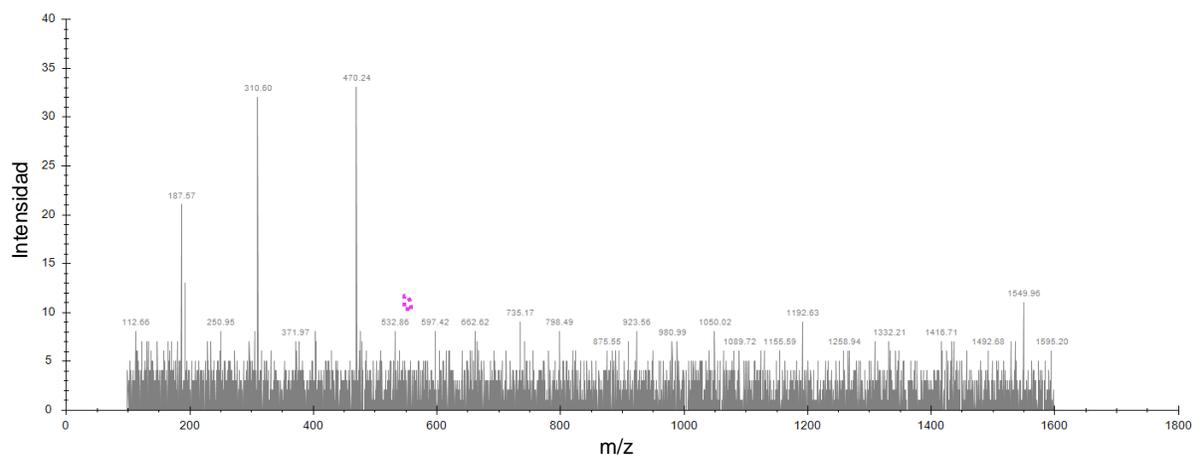


Figura 9 c. Espectro de MS correspondiente a la cepa S 680. Golfo de California (línea punteada: fragmento del espectro en donde se encuentra el compuesto Salinicetal A).

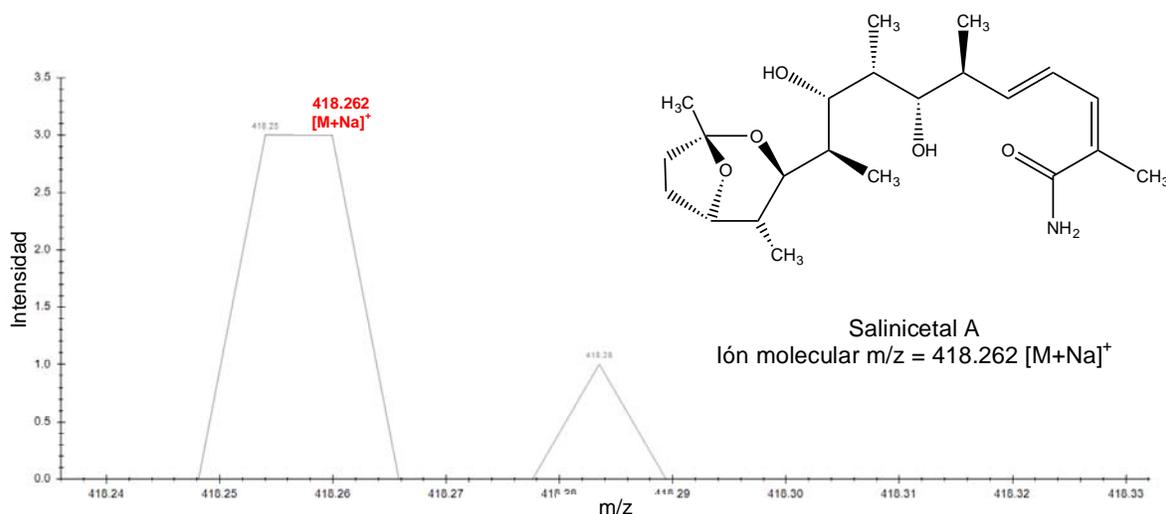
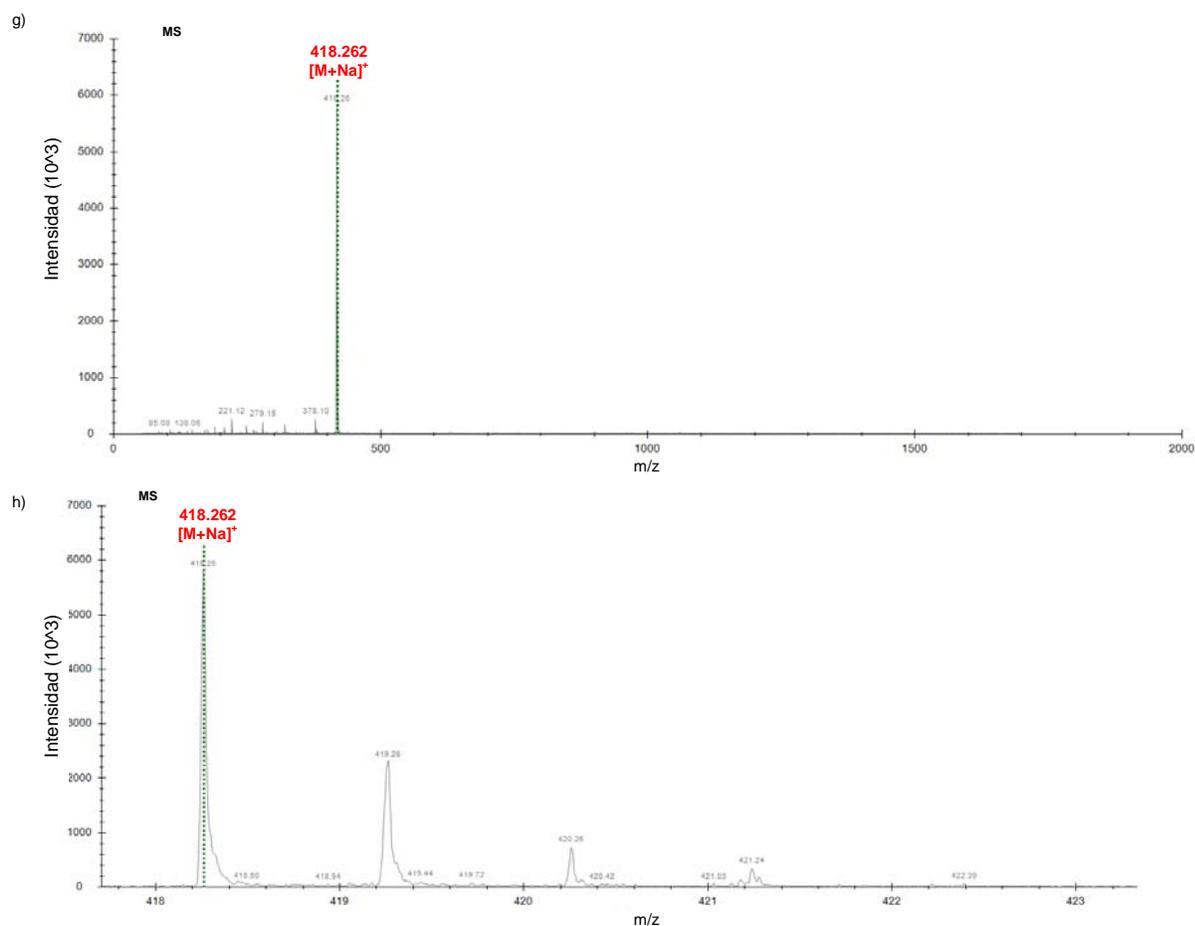
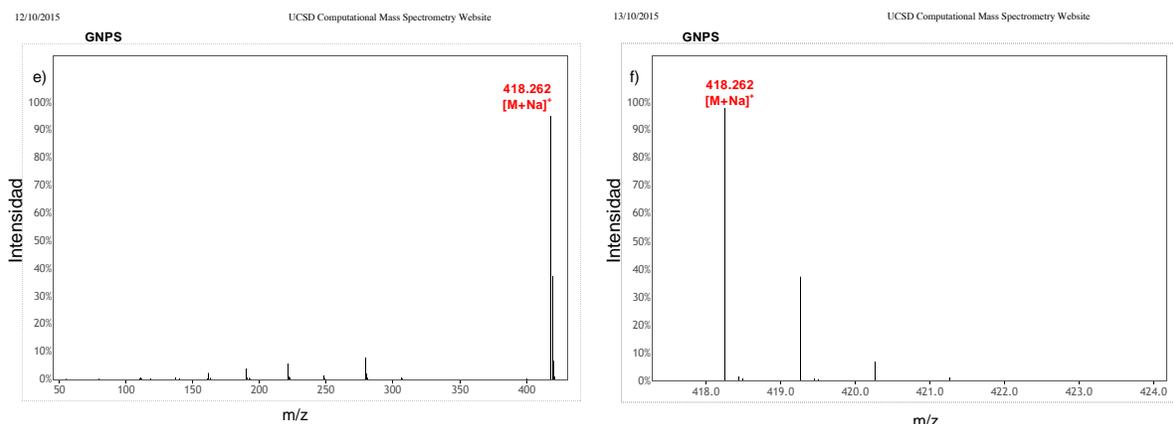


Figura 9 d. Ampliación del espectro de MS, cepa: S 680. Salinicetal A: Ión molecular m/z= 418.262 [M+Na]⁺. Identificado mediante la biblioteca GNPS, red molecular y espectro de MS.

Biogeografía de cepas de Salinispora arenicola evidenciada por el tipo de metabolitos secundarios que producen



Biogeografía de cepas de Salinispora arenicola evidenciada por el tipo de metabolitos secundarios que producen

11/10/2015

UCSD Computational Mass Spectrometry Website

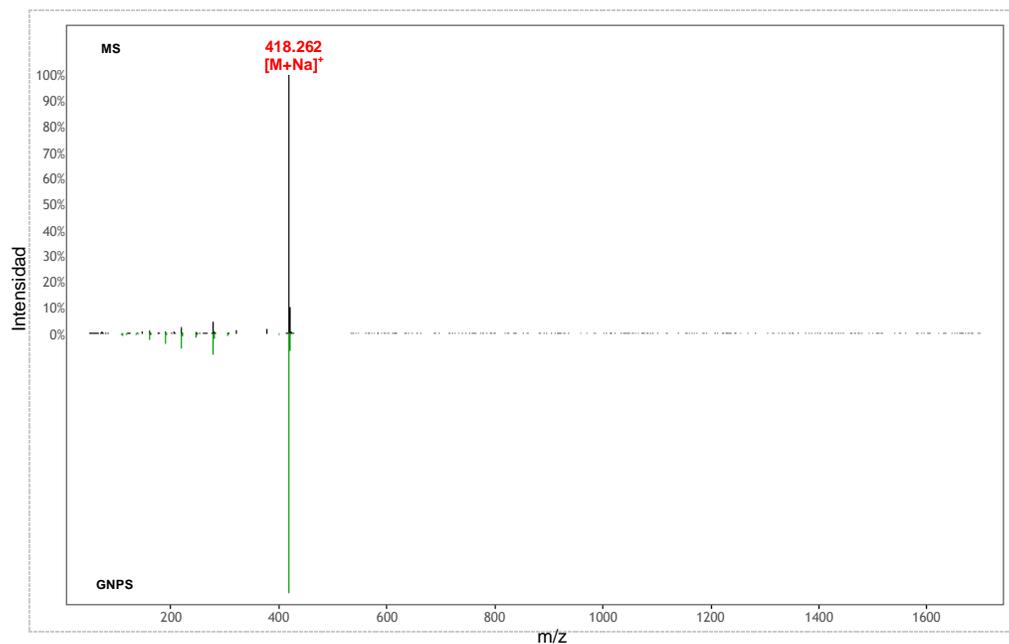


Figura 9 i. Comparación del patrón de fragmentación del espectro de MS (superior) con el de la biblioteca GNPS (inferior). Salinicetal A, cepa S 680.

UCSD Computational Mass Spectrometry Website

26/05/16 13:01

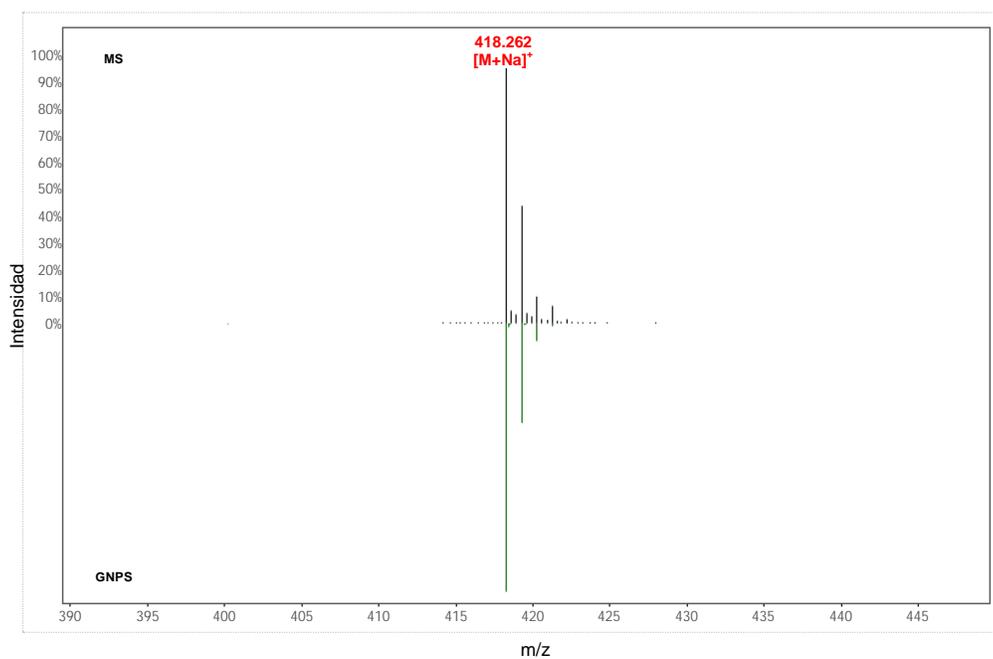


Figura 9 j. Ampliación de la comparación del espectro de MS (superior) con el de la biblioteca GNPS (inferior). Salinicetal A, cepa S 680.

- **3.4.3 Estaurosporina - Cepa S 680**

En estudios previos se ha descrito que **Estaurosporina** es un metabolito secundario producido por la especie *S. arenicola* (Tabla 1) (Jensen *et al.*, 2007b). Este compuesto pertenece a la clase de los compuestos orgánicos conocidos como los indolocarbazoles (ICZs) (Murakata *et al.*, 1990). Son compuestos aromáticos policíclicos que contienen un indol (compuesto orgánico heterocíclico, con estructura bicíclica que consiste en un anillo de seis miembros (benceno) unido a otro de cinco miembros (pirrol) fusionado a un carbazol (es un compuesto aromático heterocíclico que consiste en un anillo de pirrol con dos anillos de benceno fusionados. Presenta una amina secundaria (compuestos químicos orgánicos derivados del amoniacó y resultan de la sustitución de uno o varios hidrógenos de la molécula de amoniacó por otros sustituyentes o radicales, en el caso de las aminas secundarias se sustituyen dos radicales) unida a un hidrógeno y un ácido carboxílico. Una amida (nitrógeno unido a un carbonilo). Cuando el grupo amida va unido a un ciclo, se nombra el ciclo como cadena principal y se emplea la terminación -carboxamida- para nombrar la amida (Figura 10 d) (Murakata *et al.*, 1990). En el cromatograma LC-HRMS, el tiempo de retención para Estaurosporina fue de 7.86 a 9.23 minutos (Figura 10 a-b). El ión molecular reportado en la biblioteca GNPS y el nodo identificado en la red molecular indicó una masa de $m/z = 467.214 [M+H]^+$. Se presentó una diferencia de una unidad de m/z entre la masa exacta del compuesto con el ión molecular indicado la formación de un aducto protonado $[M+H]^+$. La diferencia de masa entre el ión molecular del espectro de MS con el de la biblioteca GNPS fue de 0.006 Da (Figura 10 c-d). Se realizó la comparación entre el patrón de fragmentación del espectro de MS con el espectro reportado en las bibliotecas GNPS para poder confirmar que se trataba de este compuesto, reflejando que el patrón de fragmentación era similar al patrón del compuesto previamente reportado (Figura 10 e-f).

Biogeografía de cepas de Salinispora arenicola evidenciada por el tipo de metabolitos secundarios que producen

- **Cromatograma LC-HRMS – Estaurosporina - Cepa: S 680**

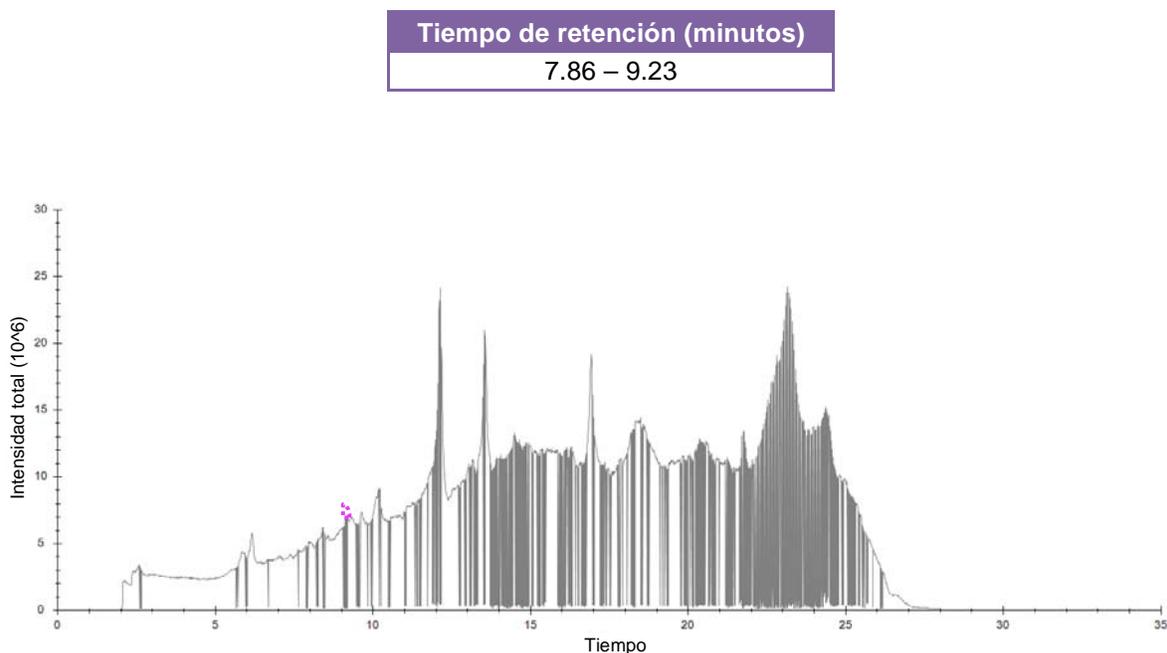


Figura 10 a. Cromatograma LC-HRMS correspondiente a la cepa S 680 del Golfo de California (línea punteada: fragmento del cromatograma en donde se encuentra el compuesto Estaurosporina).

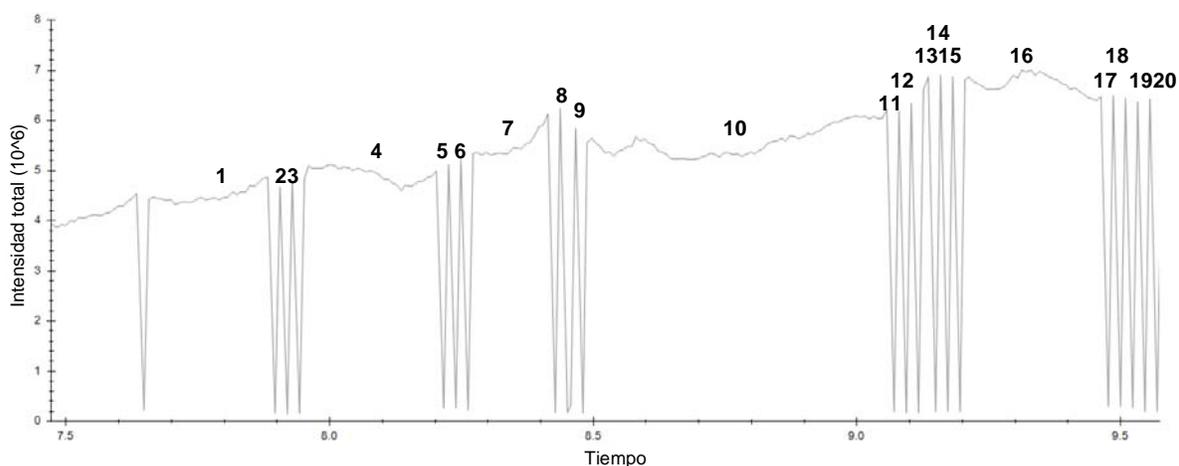


Figura 10 b. Perfil cromatográfico LC-HRMS correspondiente al metabolito secundario Estaurosporina, cepa S 680 (se indica el número de picos formados durante el análisis).

Biogeografía de cepas de Salinispora arenicola evidenciada por el tipo de metabolitos secundarios que producen

• **Espectro de MS - Estaurosporina - Cepa: S 680**

Fórmula molecular	Masa exacta	Ión molecular m/z	Biblioteca GNPS	Aducto	Dif. Masa m/z
C ₂₈ H ₂₆ N ₄ O ₃	466.5310	467.214	467.208	[M+H] ⁺	1

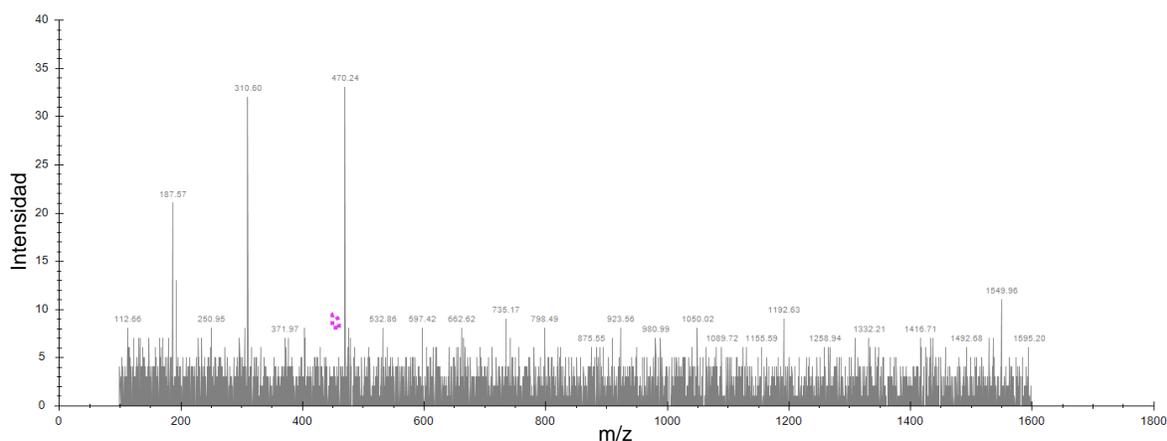


Figura 10 c. Espectro de MS correspondiente a la cepa S 680 del Golfo de California (línea punteada: fragmento del espectro en donde se encuentra el compuesto Estaurosporina).

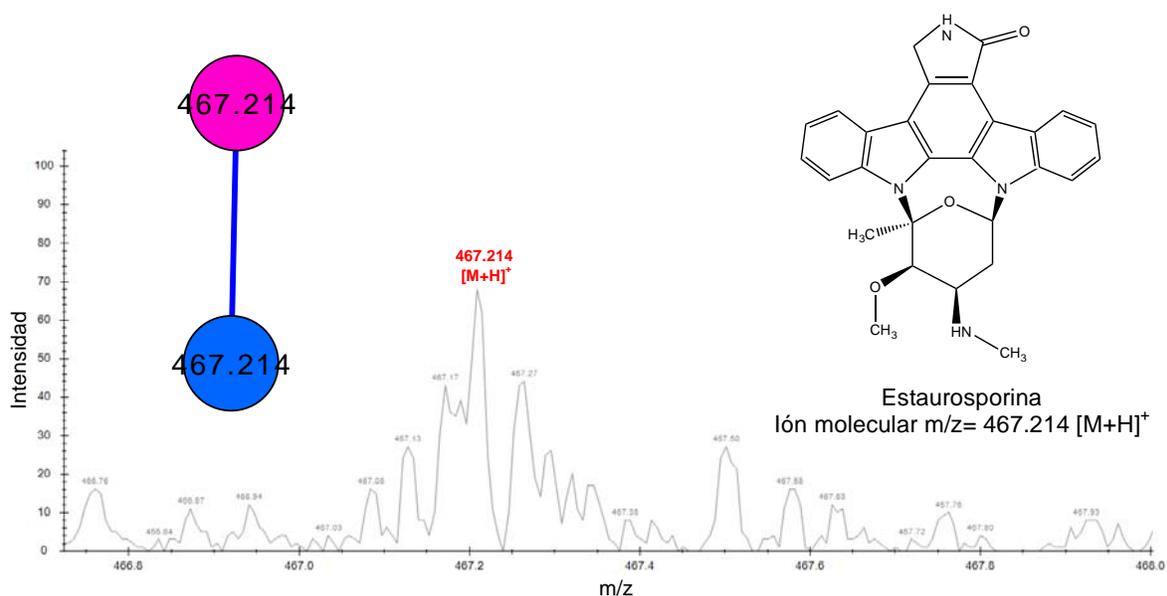


Figura 10 d. Ampliación del espectro de MS, cepa S 680. Estaurosporina. Ión molecular $m/z = 467.214 [M+H]^+$. Identificado mediante la biblioteca GNPS, red molecular y espectro de MS.

Biogeografía de cepas de Salinispora arenicola evidenciada por el tipo de metabolitos secundarios que producen

12/10/2015

UCSD Computational Mass Spectrometry Website

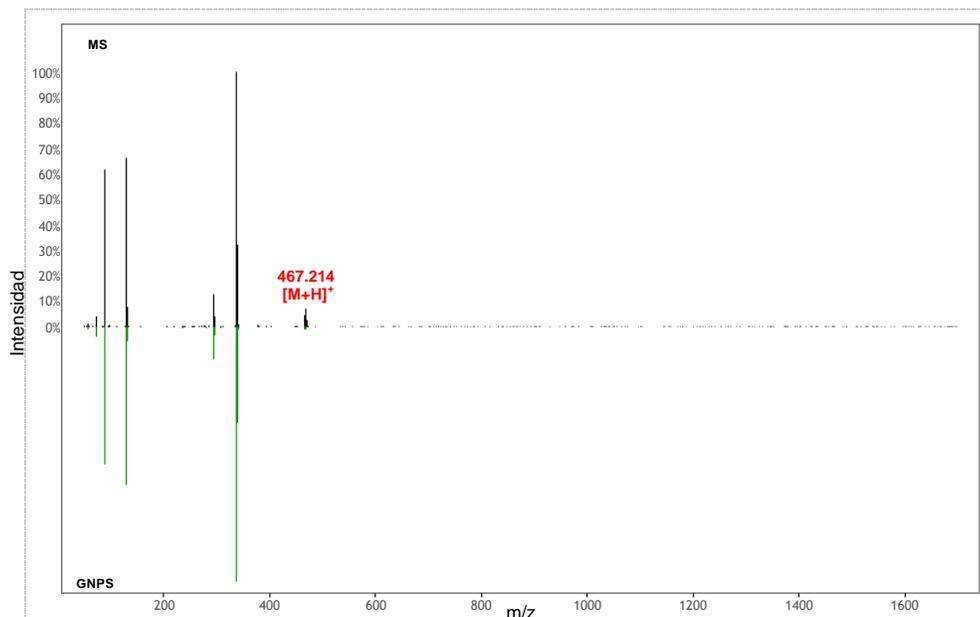


Figura 10 e. Comparación del patrón de fragmentación del espectro de MS (superior) con el de la biblioteca GNPS (inferior). Estaurosporina, cepa S 680.

UCSD Computational Mass Spectrometry Website

26/05/16 12:43

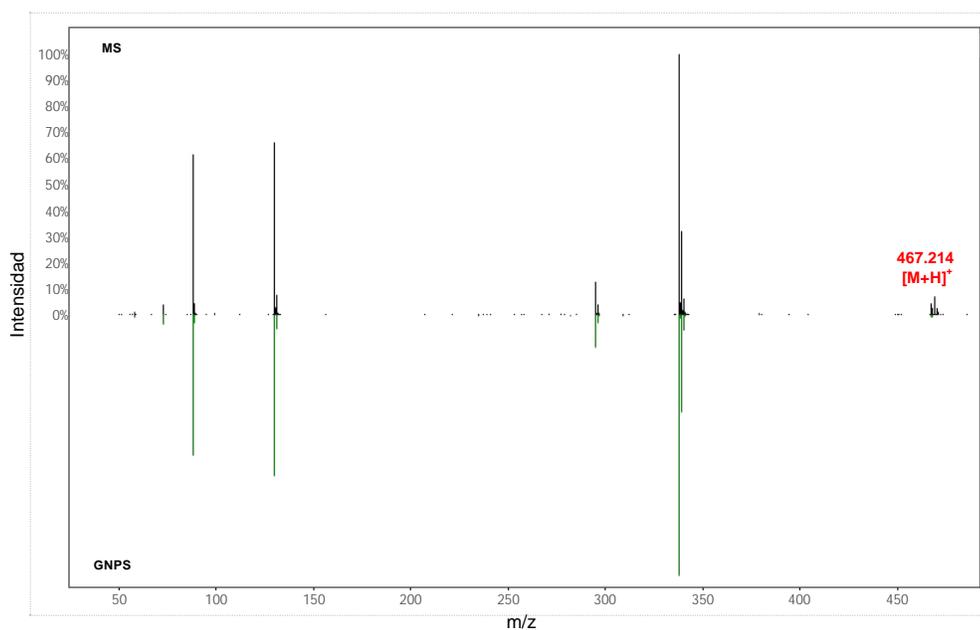


Figura 10 f. Ampliación de la comparación del espectro de MS (superior) con el de la biblioteca GNPS (inferior). Estaurosporina, cepa S 680.

- **Cromatogramas LC-HRMS y Espectros de MS - Mar Caribe**

- **3.4.4 Arenimicina B - Cepa NCA 087**

El compuesto **Arenimicina B** es un metabolito secundario previamente reportado y producido por *S. arenicola* (Tabla 1) (Kersten *et al.*, 2013). Este compuesto pertenece a los benzo[α]naftalenos, que son una clase de antibióticos con una unión *N*-vinculada 2-O-metil-L-ramnosa un desoxi-azúcar de origen natural (Jensen *et al.*, 2015). Se conforma por dos carbonos cuaternarios, tres carbonos de metino, 11 carbonos cuaternarios y cinco carbonos referentes a un grupo carbonilo (uno de ellos forma parte de un éster). También se observa una azúcar-N-glicosil y una unidad de etileno así como un anillo de hexo-piranosil y cuatro hidroxilos (CH-OH). El azúcar se identificó como un 2'-O-metil-ramnopiranosil (Figura 11 d) (Asolkar *et al.*, 2010).

En el cromatograma LC-HRMS, el tiempo de retención para Arenimicina B fue de 16.87 a 18.45 minutos (Figura 11 a-b). El ión molecular de la biblioteca GNPS así como el nodo identificado en la red molecular y su respectivo espectro de MS fue de $m/z=809.325 [M+H]^+$ (Figura 11 c-d). Se presentó una diferencia de una unidad de m/z entre la masa exacta del compuesto con el ión molecular, indicando la formación de un aducto protonado $[M+H]^+$. La diferencia de masa entre el ión molecular del espectro de MS con el de la biblioteca GNPS fue de 0.011 Da.

El patrón de fragmentación del compuesto Arenimicina B en la biblioteca GNPS con el patrón del espectro de MS, presentaron similitudes, por lo tanto, ambos compuestos comparados presentaron semejanzas estructurales las cuales indicaron que se trataba del mismo compuesto (Figuras 11 e-f).

Biogeografía de cepas de Salinispora arenicola evidenciada por el tipo de metabolitos secundarios que producen.

• **Cromatograma LC-HRMS – Arenimicina B – Cepa: NCA 087**

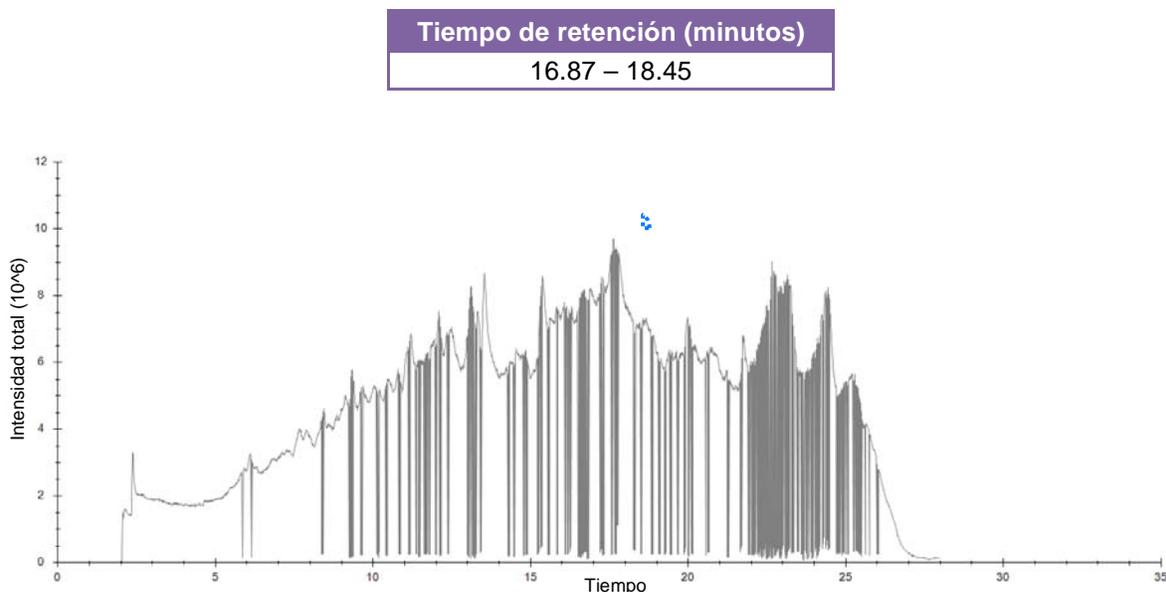


Figura 11 a. Cromatograma LC-HRMS correspondiente a la cepa NCA 087 del Mar Caribe (línea punteada: fragmento del cromatograma en donde se encuentra el compuesto Arenimicina B).

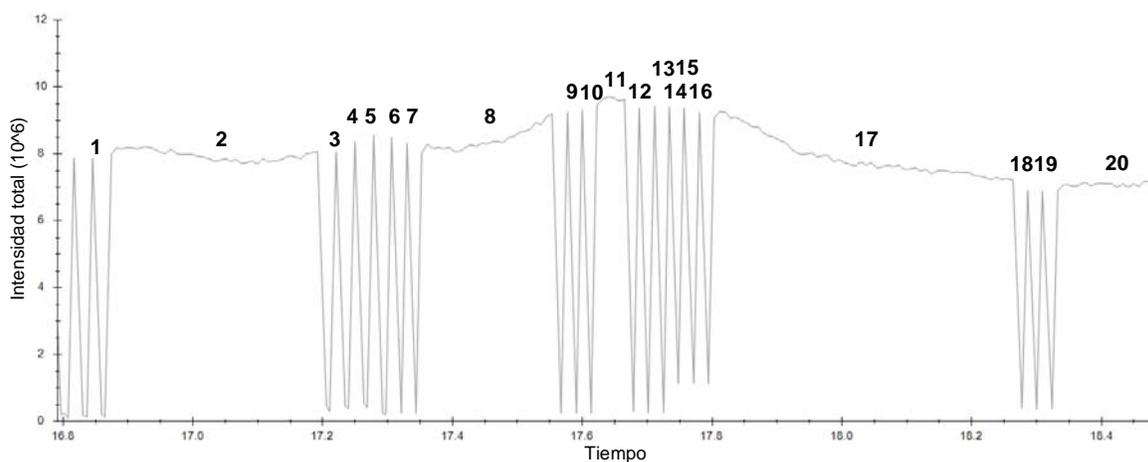


Figura 11 b. Perfil cromatográfico LC-HRMS correspondiente al metabolito secundario Arenimicina B, cepa NCA 087 (se indica el número de picos formados durante el análisis).

Biogeografía de cepas de Salinispora arenicola evidenciada por el tipo de metabolitos secundarios que producen

• **Espectro de MS - Arenimicina B - Cepa NCA 087**

Fórmula molecular	Masa exacta	Ión molecular m/z	Biblioteca GNPS	Aducto	Dif. Masa m/z
C₄₁H₄₉NO₁₄	808.305	809.325	809.314	[M+H] ⁺	1

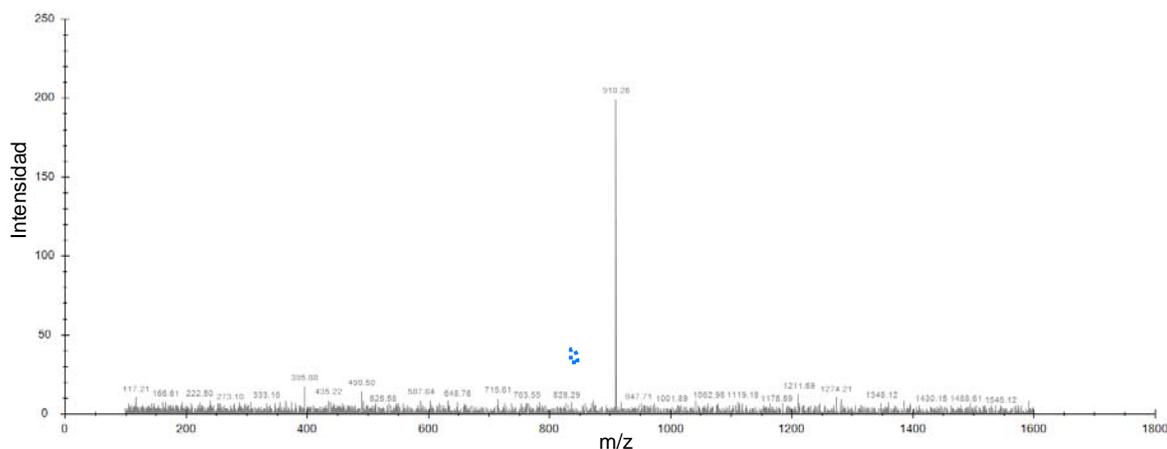


Figura 11 c. Espectro de MS correspondiente a la cepa NCA 087 del Mar Caribe (línea punteada: fragmento del espectro en donde se encuentra el compuesto Arenimicina B).

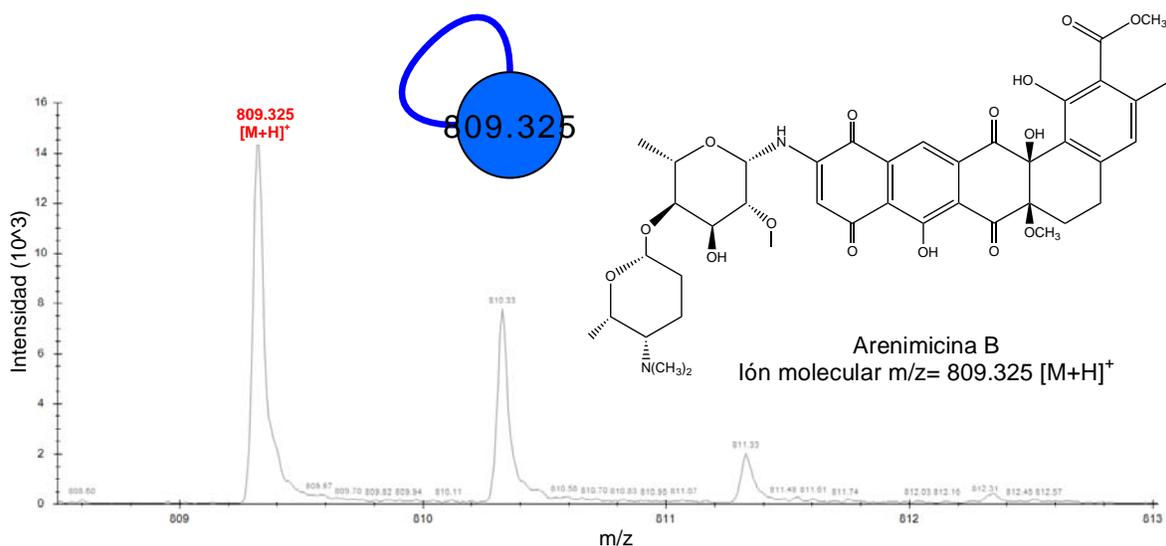


Figura 11 d. Ampliación del espectro de MS, cepa NCA 087. Arenimicina B. Ión molecular m/z=809.325 [M+H]⁺. Identificado mediante la biblioteca GNPS, red molecular y espectro de MS.

Biogeografía de cepas de Salinispora arenicola evidenciada por el tipo de metabolitos secundarios que producen

12/10/2015

UCSD Computational Mass Spectrometry Website

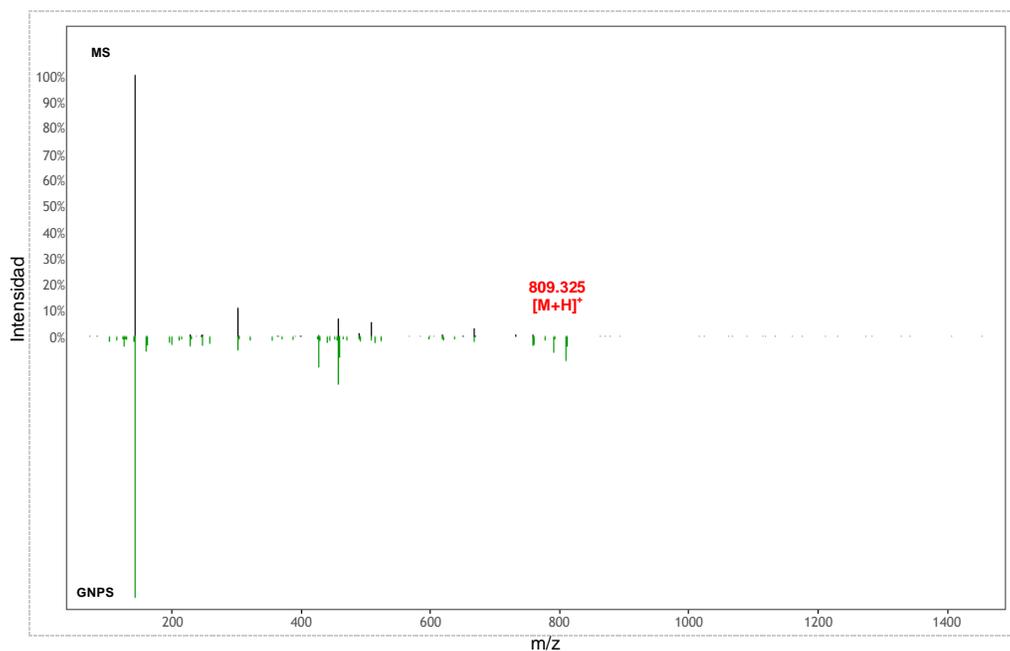


Figura 11 e. Comparación del patrón de fragmentación del espectro de MS (superior) con el de la biblioteca GNPS (inferior). Arenimicina B, cepa NCA 087.

12/10/2015

UCSD Computational Mass Spectrometry Website

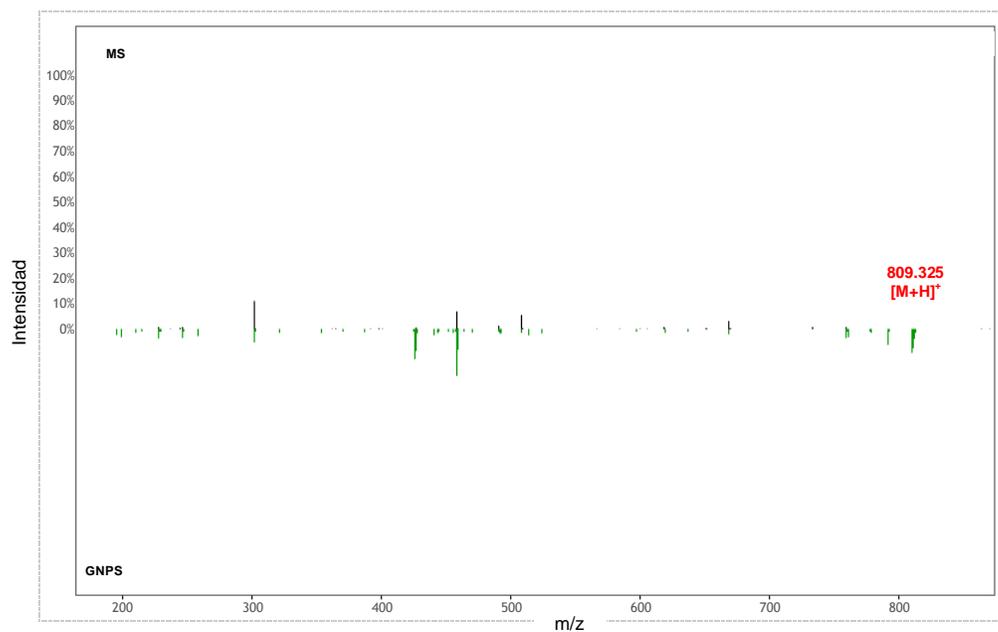


Figura 11 f. Ampliación de la comparación del espectro de MS (superior) con el de la biblioteca GNPS (inferior). Arenimicina B, cepa NCA 087.

CAPÍTULO IV. DISCUSIÓN

Los estudios sobre los patrones de distribución biogeográfica de las especies de *Salinispora* indican que cada una de ellas produce compuestos específicos (ver Tabla 1) (Jensen *et al.*, 2007b; 2015) y que las tres especies varían en su distribución biogeográfica (Jensen *et al.*, 2006). Fenical y Jensen (2006) mencionan que más del 80% de los extractos de las cepas de este género inhiben el crecimiento de células tumorales y el 35% de ellas presentan actividad antimicrobiana, independientemente de su origen biogeográfico. En el caso de *S. arenicola*, reconocida como una fuente de nuevos metabolitos con gran importancia biotecnológica y farmacéutica (Jensen *et al.*, 2015), su distribución es cosmopolita y no restringida (Freel *et al.*, 2012) y algunos estudios sugieren que todas las cepas de esta especie producen compuestos de la familia de las rifamicinas, Estaurosporinas y el Salinicetal (Udwary *et al.*, 2007). En contraste, los estudios de *S. tropica* muestran una distribución restringida de la especie y sugieren que la mayoría de las cepas producen compuestos como salinosoporamida A y esporolida A (Jensen *et al.*, 2007b). El presente estudio se realizó con la finalidad de investigar si las familias de compuestos asignadas a *S. arenicola* (Udwary *et al.*, 2007) son producidas por cepas obtenidas de dos localidades geográficas distintas. Es decir, si a pesar de estar expuesta a presiones ambientales distintas, la especie mantiene la misma producción de metabolitos secundarios. Los resultados de este trabajo muestran que, de las 18 cepas estudiadas, cuatro presentaron compuestos previamente reportados para la especie y que, a diferencia de lo observado por Udwary y colaboradores (2007), solamente dos cepas de la misma localidad produjeron el mismo compuesto. Debido a ello, uno de los aspectos más significativos de este estudio es la evidencia de que, independientemente del origen, es importante el estudio de cada cepa de *Salinispora arenicola* ya que su producción de metabolitos con importancia biotecnológica puede ser variable.

Biogeografía de cepas de Salinispora arenicola evidenciada por el tipo de metabolitos secundarios que producen

Las actinobacterias como *Salinispora* spp., han sido aisladas a partir de una gran variedad de muestras colectadas en diferentes partes del océano (Ward y Bora, 2006; Valverde *et al.*, 2012). Esto ha dirigido los estudios de los géneros hacia la biogeografía de sus especies con el objetivo de conocer su distribución en un determinado espacio y tiempo, considerando también los procesos biológicos, físicos y ambientales que dieron lugar a dicha distribución (Morrone *et al.*, 1996) y si éstos están relacionados con la diversidad de metabolitos que se producen. La capacidad de las especies de *Salinispora* para producir antibióticos y otros metabolitos secundarios, ha llevado a suponer una ventaja evolutiva en este género, facilitando su adaptación a las diferentes y variables situaciones de estrés (físico, químico y/o biológico) que tienen lugar en el ambiente marino (Morrone *et al.*, 1996). Challis y Hopwood (2003) mencionan, que estas ventajas selectivas permiten explicar los mecanismos de acción que presentan en su metabolismo y la amplia variedad de las estructuras químicas en que se verán reflejadas, así como el importante gasto energético que supone para el microorganismo que las produce.

Los estudios recientes de actinomicetos marinos describen el papel de los factores ambientales en este medio sobre su distribución geográfica, diversidad, supervivencia y producción de metabolitos secundarios (Mincer *et al.*, 2002; Nakamura *et al.*, 2009; Zhi *et al.*, 2013). Estos factores, también conocidos como estímulos ambientales, pueden generarse por una interacción de diversas condiciones fisiológicas y/o biológicas, tales como la composición de la comunidad microbiana, o factores ambientales tales como concentraciones de nutrientes, presión, salinidad, temperatura, estrés térmico, radiación solar, concentración de oxígeno extremas y la acidificación del medio (Bibb, 2005; Martín *et al.*, 2011). Todos ellos determinan el crecimiento de las especies microbianas y pueden activar o reprimir diferentes estímulos que controlan la producción de determinados metabolitos (Lian *et al.*, 2008). Se ha estudiado la existencia de

*Biogeografía de cepas de *Salinispora arenicola* evidenciada por el tipo de metabolitos secundarios que producen*

reguladores específicos con la fase fisiológica del organismo productor; esto es, genes con mecanismos reguladores que coordinan el nivel de expresión de otros genes que codifican enzimas para la síntesis de metabolitos secundarios según su etapa de crecimiento (Martín y Demain, 1980; Vining, 1992; Challis y Hopwood, 2003). Estos reguladores actúan en función de las diferentes condiciones ambientales y pueden influir sobre la síntesis de distintos metabolitos, tales como los antibióticos (Challis y Hopwood, 2003). Los resultados obtenidos en estos trabajos conducen al desarrollo de estudios de cultivo en cepas de *Salinispora* enfocados a dilucidar y determinar el impacto que distintos factores ambientales puedan tener sobre la producción de compuestos bioactivos en este género.

Los cambios en las condiciones de crecimiento de actinomicetos pueden influir en la síntesis de metabolitos secundarios (Bose *et al.*, 2015). Un factor ambiental determinante para el crecimiento y producción de metabolitos secundarios en el género *Salinispora*, es la salinidad, debido a su dependencia al sodio que lo convierte en el primer género estrictamente marino (Maldonado *et al.*, 2005a). Un ejemplo de esto, lo señalan Bose y colaboradores (2015) quienes lograron identificar la producción de rifamicinas y otros antibióticos en cepas de *S. arenicola* sometidas a dos concentraciones de salinidad y a más de tres períodos de incubación (Bose *et al.*, 2015). En el presente estudio las 18 cepas de *S. arenicola* provenían de dos localidades con condiciones ambientales distintas, entre ellas concentración de salinidad de 34 a 35.5 ppm en el Golfo de California (Roden y Groves, 1959; Stevenson, 1970) y 35 a 36 ppm en el Mar Caribe (CONANP, 2009); para asegurar que todas las cepas se encontraban en una misma fase de crecimiento, se establecieron condiciones estandarizadas. Para ello se utilizó el método descrito por Duncan y colaboradores (2014), en el cual se utiliza un indicador de cambio de pH (rojo fenol) para determinar que el cultivo se encuentra en la fase estacionaria (Duncan *et al.*, 2014). Esto debido a que se ha sugerido que la biosíntesis de ciertos metabolitos secundarios en medio líquido, incluidos

Biogeografía de cepas de Salinispora arenicola evidenciada por el tipo de metabolitos secundarios que producen

los antibióticos, se inicia una vez que ha finalizado el crecimiento celular (Bibb, 2005). Con este método fue posible identificar metabolitos previamente descritos (Salinicetal A, Estaurosporina y Arenimicina B) en sólo cuatro de las 18 cepas analizadas por el método de LC-HRMS y MS (ver Tabla 11, Figuras 7 a 11). Estos resultados no permitieron elaborar un perfil metabólico de metabolitos secundarios específico a *S. arenicola* de cada localidad estudiada ya que, de las cuatro cepas productoras, tres cepas fueron obtenidas del Golfo de California y una del Mar Caribe. El único indicio de un perfil de este tipo se presentó en dos cepas del Golfo de California las cuales mostraron producción de Salinicetal A.

Otro factor ambiental importante en el crecimiento de microorganismos marinos es la temperatura (Jensen y Mafnas, 2006). A pesar de que se sabe que el género *Salinispora* tiene crecimiento desde los 10 °C (Jensen y Mafnas, 2006; Maldonado *et al.*, 2005a), en el presente estudio, los cultivos de *S. arenicola* se mantuvieron entre 27 y 28 °C. La latitud, es también un factor ambiental que puede influir en el crecimiento de *Salinispora*, pero en el presente estudio no fue contemplada como un componente determinante para el desarrollo de las cepas analizadas, sin embargo, en otros trabajos se han logrado cultivar cepas de *S. arenicola* a partir de sedimentos del Océano Pacífico en latitudes de hasta 33 °N, la más alta registrada para este género (Mincer *et al.*, 2002; Zhi *et al.*, 2013).

Dada la importancia biológica y biotecnológica de los productos naturales de origen marino, a continuación se presenta una descripción detallada de los metabolitos secundarios identificados en el presente estudio que son compuestos previamente reportados en las bases de datos como la plataforma GNPS (Jensen *et al.*, 2007b; Williams *et al.*, 2007; Paterson *et al.*, 2008; Asolkar *et al.*, 2010; Kersten *et al.*, 2013). Es importante destacar que la presencia de las estructuras químicas reportadas a partir *S. arenicola* ha sido determinada usando los métodos de cromatografía líquida de alta resolución (LC-HRMS) y MS (Freel *et al.*, 2011),

*Biogeografía de cepas de *Salinispora arenicola* evidenciada por el tipo de metabolitos secundarios que producen*

mismos que fueron empleados en el presente trabajo. En primera instancia, los estudios en cepas de *S. arenicola* han permitido aislar diversos compuestos, tales como los policétidos bicíclicos **Salinicetal A** (Williams *et al.*, 2007) identificados en este estudio a partir de dos cepas del Golfo de California. Este compuesto presenta una actividad biológica de inhibición de la inducción de la ornitina descarboxilasa, siendo importante en la quimio-prevención del cáncer (Jensen *et al.*, 2015). Este compuesto es un metabolito secundario que posee características estructurales inusuales lo cual ha llevado a la descripción de tres estructuras con similitud entre los Salinicetales (Jensen *et al.*, 2015).

La **Estaurosporina**, identificado en la cepa S 680 del Golfo de California, es un compuesto orgánico conocido como indolocarbazol (ICZs) (Murakata *et al.*, 1990) y ha sido identificado constantemente en cepas de *S. arenicola* en otros estudios (Jensen *et al.*, 2015). Este metabolito secundario presenta una alta actividad citotóxica así como un gran potencial biotecnológico (Jensen *et al.*, 2015).

El compuesto **Arenimicina B**, identificado en la cepa NCA 087 del Mar Caribe, es un metabolito "accesorio" (Jensen *et al.*, 2007), producido a partir de las vías de reserva en *S. arenicola* y existe evidencia de que su producción está ligada a ubicaciones geográficas específicas (Edlund *et al.*, 2011).

Además de los tres metabolitos secundarios identificados en el presente estudio, existe un grupo de compuestos previamente reportados para *S. arenicola*. Entre ellos: 1) Arenamidas A y B (son ciclo-hexa-depsi-péptidos con respuesta celular frente a estímulos como estrés, radiación UV y antígenos bacterianos o virales así como actividad anti-inflamatoria), 2) Rifamicinas B, SV, O y W (inhibe cepas de *Mycobacterium* spp. y puede ser producida en todas las fases de crecimiento de *S. arenicola*), 3) Salinquinonas A-F (son antraquinonas- γ -pironas con gran potencial citotóxico y propiedades farmacológicas), 4) Ciclomarina D (potencial

Biogeografía de cepas de Salinispora arenicola evidenciada por el tipo de metabolitos secundarios que producen

citotóxico) y 5) Arenicolida A (potencial citotóxico) (Nicolaou y Dai, 1991; Robinson, 1991; Groll *et al.*, 2006; Udvary *et al.*, 2007; Williams *et al.*, 2007; Asolkar *et al.*, 2009; Bucarey *et al.*, 2012; Colis *et al.*, 2014; Goo *et al.*, 2014; Janso *et al.*, 2014; Jensen *et al.*, 2015).

La identificación de nuevos compuestos con potencial bioactivo provenientes de fuentes marinas ha significado un esfuerzo importante en muchos grupos de investigación. Para identificar y aislar estos compuestos se analizan extractos crudos (Feling *et al.*, 2003), tal como se llevó a cabo el presente estudio. La obtención de estos extractos crudos se realizó con acetato de etilo (AcOEt); este disolvente ha sido previamente empleado por Jensen y colaboradores (2007b) en cepas *Micromonospora* y *Salinispora* para obtener compuestos con actividad antimicrobiana y citotóxica (Mincer *et al.*, 2002, Jensen *et al.*, 2007b). Cabe aclarar que la obtención de compuestos bioactivos se encuentra definida en gran parte por el método de extracción que se utilice; por ejemplo, el metabolito salinosporamida A ha sido extraído con resina amberlita XAD-16 y eluido con acetona (Feling *et al.*, 2003), de ahí que se utilizaron las condiciones de extracción reportadas con anterioridad para esta especie.

En este trabajo fueron descartados más de la mitad de los compuestos observados por redes moleculares (MS). Después de realizar una minuciosa revisión de las masas (± 0.5 Da), la gran mayoría de los grupos formados en la red molecular estaban representados por compuestos “desconocidos” no asociados con las masas de los 13 metabolitos secundarios previamente reportados para *S. arenicola* y/o a los compuestos de las bibliotecas GNPS. Un compuesto se considera como “desconocido” cuando no ha sido previamente citado (Little *et al.*, 2011). Otro grupo de 28 compuestos fueron reconocidos como iones “fantasma” (Jensen *et al.*, 2015), los cuales se identificaron durante el análisis de dereplicación pero no fueron verdaderamente representativos de lo que estaban

*Biogeografía de cepas de *Salinispora arenicola* evidenciada por el tipo de metabolitos secundarios que producen*

produciendo las cepas de *S. arenicola* con base en los parámetros pre-establecidos y el análisis del patrón de fragmentación (ver Anexo). A pesar de que el reconocimiento e identificación de compuestos químicos utilizando sólo datos de espectrometría de masas se dificultó en las bases de datos, la información disponible en las bibliotecas GNPS, puede ayudar a encontrar nuevas moléculas en los grupos de compuestos “desconocidos” de la red molecular. Conociendo el patrón de fragmentación es posible predecir los componentes (estructurales) de la molécula y asociarlos a cepas de *S. arenicola*. Para otros trabajos, los análisis Q-TOF MS de alta resolución para identificar fragmentos se han llevado a cabo mediante el establecimiento de parámetros con precisión de ± 0.06 Da y ± 0.5 Da (Steen y Mann, 2002), mismos que fueron utilizados en el presente trabajo con el fin de garantizar el reconocimiento de fragmentos sin ambigüedades ya que existen compuestos que tienen una misma masa nominal pero difieren en las masas exactas (Steen y Mann, 2002). Dentro de los tres compuestos identificados en el presente estudio se presentaron diferencias entre la masa exacta reportada en la literatura (Royal Society of Chemistry, 2016) con el valor de masa del ión molecular $[M+H]^+$ detectado mediante MS y el ión molecular en las bibliotecas GNPS. Estas diferencias fueron: 1) **Salinictal A** con masa exacta de 395.5329, ión molecular 418.262 $[M+Na]^+$, 2) **Estaurosporina**, masa exacta: 466.5310, ión molecular 467.214 $[M+H]^+$ y 3) **Arenimicina B**, masa exacta: 808.305, ión molecular 809.325 $[M+H]^+$. En el estudio de Fenn (2002), se sugiere que la razón por la que pueden presentarse estas diferencias de masa en un mismo compuesto, como lo ocurrido en los resultados de este estudio, se debe al proceso de ionización positiva por ElectroSpray (MS), en el cual se transfiere energía a la molécula dando lugar a la adición de iones moleculares protonados $[M+H]^+$ como sales, trazas de iones doblemente cargados (a $1/2$ de m/z) o trazas de especies diméricas (a 2 m/z) (Fenn, 2002) que se vieron reflejados en la masa monoisotópica del ión molecular de los metabolitos identificados en el presente estudio. A esta adición de sales u otros iones durante el proceso de ionización de

Biogeografía de cepas de Salinispora arenicola evidenciada por el tipo de metabolitos secundarios que producen.

la muestra, se le conoce como formación de aductos o enlaces covalentes de naturaleza reversible entre dos moléculas (Medwave, 2003; Yurkanis, 2007). En el caso del compuesto Salinicetal A, se pudo observar la formación de un aducto de sodio $[M+Na]^+$, en los compuestos Estaurosporina y Arenimicina B se observó un aducto protonado $[M+H]^+$. Algunas herramientas que pueden apoyar los resultados obtenidos en el presente trabajo y que permiten la elucidación estructural del grupo de compuestos "desconocidos" son: 1) Cromatografía de gases (CG), 2) Resonancia Magnética Nuclear (RMN), 3) Espectrometría de masas (ES), 4) Cromatografía Líquida-Cuadruplo-Tiempo de vuelo acoplada a espectrometría de masas (LC-QTOF - MS), 5) Coherencia Heteronuclear Cuántica Simple (HSQC) y 6) Espectroscopía de correlaciones (COSY). Para incorporar los datos de espectrometría de masas (MS) del presente estudio con otras bases de datos, se emplean diversas fuentes de consulta, por ejemplo, el Chemical Abstracts Service o Servicio de Resúmenes Químicos (CAS), que contiene más de 54 millones de entradas en sus bases de datos (Little *et al.*, 2011). Otra fuente de información que permite la identificación de compuestos, son las bases de datos del Eastman Chemical Company (EMN) que es una compañía global de productos químicos que ha utilizado ampliamente las bases de datos "espectrales" (Little *et al.*, 2001;2004). Estas bases de datos incluyen el peso molecular, fórmulas moleculares, números CAS y los nombres químicos, por lo cual son una excelente alternativa en la búsqueda de compuestos asociados a los del presente estudio. Algunos autores han utilizado en sus trabajos las bases de datos "espectrales" para la identificación de "desconocidos" (García *et al.*, 2005; Ojanperä *et al.*, 2006; Richardson, 2008 y Liao *et al.*, 2008). Otras fuentes de consulta son: 1) ChemFinder, 2) Chemspide (para conocer las propiedades físicas de un compuesto, 3) Índice Merck, 4) Sigma-Aldrich (que es un catálogo de compuestos), 5) Farm Chemicals Handbook, 6) ChemIndex (bases de datos del Chemical Abstracts Service, Beilstein) y 7) KEGG (Kyoto Enciclopedia de genes y genomas) (Little *et al.*, 2011).

Biogeografía de cepas de Salinispora arenicola evidenciada por el tipo de metabolitos secundarios que producen.

La búsqueda de metabolitos secundarios en el presente estudio se limitó al grupo de compuestos disponibles en las bibliotecas GNPS y por esta razón no fue posible asociar los compuestos químicos “desconocidos” de la red molecular (MS) que se presentaron mayoritariamente. Para el reconocimiento de este grupo de compuestos se puede recurrir a herramientas como la genómica comparativa, que permita hacer una relación entre la estructura química de los compuestos en el espectro de MS con la función del genoma del actinomiceto *S. arenicola*, que se sabe, ha revelado un gran número de grupos de genes (16S rRNA, policétidos sintasas (PKS) y péptido sintetasas no ribosomales (NRPS), etc.) que se encuentran juntos en su genoma y se relacionan con la producción de metabolitos secundarios lo cual se vincula a una adaptación ecológica de la especie (Filipski y Kumar, 2005; Edlund *et al.*, 2011; Doroghazi y Metcalf, 2013). A este grupo de genes relacionados con el metabolismo secundario se les conoce como genes de biosíntesis (Doroghazi y Metcalf, 2013) que pueden ser transferidos horizontalmente entre actinomicetos, es decir, del genoma (o parte de éste) de un microorganismo a otro que no forma parte de su descendencia (Doroghazi y Metcalf, 2013). Si se aplica un enfoque genómico comparativo sobre los compuestos identificados y “desconocidos” en el presente estudio, será posible evidenciar los genes responsables de la biosíntesis de estos metabolitos y comparar la capacidad de producir un mismo compuesto entre cepas independientemente de la ubicación geográfica. Las condiciones de cultivo así como los factores ambientales pueden determinar esta producción de compuestos. Más aún, estos trabajos permiten una visión general sobre las implicaciones evolutivas de este grupo de genes en *S. arenicola* que, como lo sugieren Edlund y colaboradores (2011) pueden estar implicados en el éxito evolutivo de esta especie. La continuidad de este trabajo desde este enfoque puede apoyar los resultados obtenidos en *S. arenicola*, pero de ninguna manera está limitado al género *Salinispora* spp.

4.1 CONCLUSIONES

1. Bajo condiciones de crecimiento estandarizadas, sólo cuatro de las 18 cepas analizadas presentaron compuestos previamente reportados para la especie *S. arenicola*.
2. El patrón de fragmentación así como el ión molecular $[M+H]^+$ de cada compuesto fueron la base para la comparación e identificación de los metabolitos secundarios en *S. arenicola*. Mediante el análisis de extractos crudos de fermentación por LC-HRMS, MS y red molecular, se lograron caracterizar los metabolitos secundarios Salinicetal A, Estaurosporina y Arenimicina B.
3. Entre cepas del Golfo de California y el Mar Caribe no se logró identificar un mismo metabolito secundario.
4. En las cepas AMS 155 y S 680 del Golfo de California se logró identificar el mismo compuesto Salinicetal A.
5. Arenimicina B, sólo fue reconocido en la cepa NCA 087 del Mar Caribe.
6. El análisis basado en redes moleculares, representó una poderosa herramienta para el estudio de las 18 cepas, sin embargo, los resultados fueron interpretados con cautela debido a la alta sensibilidad del instrumento que permitió observar iones "fantasma".
7. Cada nodo y clúster de la red molecular, representa un compuesto, sin embargo, no fue posible asociar la masa de estos compuestos "desconocidos" con metabolitos secundarios previamente reportados. Por lo tanto, se sugiere la realización de estudios posteriores de determinación estructural para dichos compuestos.

Biogeografía de cepas de Salinispora arenicola evidenciada por el tipo de metabolitos secundarios que producen.

8. No se logró construir un perfil metabólico con los resultados obtenidos, por lo que sería importante llevar a cabo repeticiones independientes de cada condición de cultivo para evaluar el resultado de cualquiera de los compuestos identificados.
9. Es importante establecer la aplicación de diferentes estímulos ambientales con semejanza a las condiciones naturales de la localidad de cada cepa y analizar la producción de metabolitos secundarios individual para el posible descubrimiento de nuevos compuestos con potencial bioactivo.

4.2 PERSPECTIVAS

A partir de los estudios realizados en la presente tesis de maestría, las perspectivas de trabajos futuros se orientan a la realización de análisis alternos, tales como el uso de la genómica comparativa que permite el descubrimiento de grupos de genes asociados al metabolismo secundario de *S. arenicola* y al descubrimiento de nuevos compuestos con potencial bioactivo.

También sería interesante tomar datos *in situ* de las condiciones físico-químicas de la localidad en donde se colecten las cepas y relacionar estas condiciones con la producción de metabolitos secundarios y la biogeografía de la especie.

Actualmente, el género *Salinispora* se ha convertido en un modelo sólido para la investigación de productos naturales. La colecta y estudio de actinomicetos marinos como *Salinispora* spp., tanto en la Unidad Académica de Ciencias y Tecnología de la UNAM en Yucatán por la Dra. Alejandra Prieto Davó, así como en el Instituto Scripps de Oceanografía (California, USA) realizados por el Dr. Paul R. Jensen y en otras instituciones en distintas partes del mundo, ha creado un recurso que permite el conocimiento y comparación sobre la biosíntesis de productos naturales de interés biotecnológico y farmacéutico entre cepas que habitan ambientes con condiciones biogeográficas distintas.

CAPITULO V. REFERENCIAS

4. Ahmed, L., P.R. Jensen, K.C. Freel, R. Brown, A.L. Jones, B.Y. Kim y M. Goodfellow. 2013. *Salinispora pacífica* sp. nov., an actinomycete from marine sediments. *Antonie Van Leeuwenhoek International Journal of General and Molecular Microbiology* 103:1069-1078.
5. Asolkar, R.N., K.C. Freel, P.R. Jensen, W. Fenical, T.P. Kondratyuk, E.-J. Park and J. M. Pezzuto. 2009. *Journal Natural Products* 72: 396–402.
6. Asolkar, R.N., T.N. Kirkland, P.R. Jensen and W. Fenical. 2010. *Journal Antibiotic* 63: 37-39.
7. Azam, F., T. Fenchel, J.G. Field, J.S. Gray, L.A. Meyer-Reil and F. Thingstad. 1983. The Ecological Role of Water-Colum Microbes in the Sea. *Marine Ecology Progress series* 10: 257-263.
8. Barbier, G.D. y D. Prieur. 1991. Une Nouvelle filiare: Les microorganismes marins. *Biofutur* 106: 41-46.
9. Baas-Becking, L. 1934. Geobiologie of inleiding tot de milieukunde. Van Stockum & Zoon, The Hague, the Netherlands.
10. Bérdy, J. 2005. Bioactive microbial metabolites. *The Journal of Antibiotics* 58: 1-26.
11. Bérdy, J. 2012. Thoughts and facts about antibiotics: Where we are now and where we are heading. *Journal* 65:385–395.
12. Bredholdt, H., O. a Galatenko, K. Engelhardt, E. Fjaervik, L.P. Terekhova, and S.B. Zotchev. 2007. Rare actinomycete bacteria from the shallow water sediments of the Trondheim fjord, Norway: isolation, diversity and biological activity. *Environmental Microbiology* 9: 2756-64.

Biogeografía de cepas de Salinispora arenicola evidenciada por el tipo de metabolitos secundarios que producen

13. Briggs, J.C. 1994. Species diversity: land and sea. *Systematic Biology* 43: 130-135.
14. Bonet, B., R. Teufel, M. Crüsemann, N. Ziemertand, B. S. Moore. 2014. *Journal Natural Products*. 78: 539-542.
15. Bose, U. A.K. Hewavitharana, M.E. Vidgen, Y.K. Ng, P.N. Shaw, J.A. Fuerst and M. P. Hodson. 2014. Discovering the recondite secondary metabolome spectrum of *Salinispora* species: a study of inter-species diversity. 9:91-488
16. Bose, U., K. Amith, Y.K. Hewavitharana, S.N Paul, J.A. Fuerst and M. P. Hodson. 2015. LC-MS-Based Metabolomics Study of Marine Bacterial Secondary Metabolite and Antibiotic Production in *Salinispora arenicola*. *Marine Drugs*, 13: 249-266
17. Bucarey, S.A., K. Penn, L. Paul, W. Fenical and P.R. Jensen. 2012. *Applied Environmental Microbiology* 78: 4175–4182.
18. Buchanan, G.O., P.G. Williams, R.H. Feling, C.A. Kauffman, P.R. Jensen and W. Fenical. 2005. *Organic Letters* 7: 2731-2734.
19. Challis, G.L., D.A. Hopwood. 2003. Synergy and contingency as driving forces for the evolution of multiple secondary metabolite production by *Streptomyces* species. *Proceedings of the National Academy of Sciences, U.S.A.* 25: 555-61.
20. Cohan, F.M. 2002. What are bacterial species? *Annual Review Microbiology* 56: 457–487.
21. CONANP. 2009. Ecorregiones marinas de América del Norte: una herramienta para la conservación de los océanos.
22. Cho, J. C., and J. M. Tiedje. 2000. Biogeography and degree of endemism of fluorescent *Pseudomonas* strains in soil. *Appl. Environmental Microbiology* 66: 5448-5456.

Biogeografía de cepas de Salinispora arenicola evidenciada por el tipo de metabolitos secundarios que producen.

23. Crawford, R.L. y D.L. Crawford. 1978. Radioisotopic methods for the study of lignin biodegradation. *Developments in industrial microbiology* 19:35-49.
24. Colis, L.C., C. M. Woo, D. C. Hegan, Z. Li, P. M. Glazer and S. B. Herzon. 2014. *Natural Chemical* 6: 504–510.
25. Das, S., P. Lyla, and S. Khan. 2006. Marine microbial diversity and ecology: importance and future perspectives. *Current Science* 90: 1325-1335.
26. Bennett, D. 2005. Growing pains for metabolomics. *The Scientist* 19: 25–28.
27. Bibb, M. J. 2005. Regulation of secondary metabolism in streptomycetes. *Current Opinion in Microbiology* 8: 208-215.
28. Davies, J. 2006. Are antibiotics naturally antibiotics? *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 33: 496-499.
29. de Wit, R., and T. Bouvier. 2006. Everything is everywhere, but, the environment selects; what did Baas Becking and Beijerinck really say? *Environmental Microbiology* 8: 755-758.
30. Duncan, K.R., M. Crüsemann, A. Lechner, A. Sarkar, J. Li, N. Ziemert, M. Wang, N. Bandeira, B.S. Moore, P.C. Dorrestein and P.R. Jensen. 2015. Molecular Networking and Pattern-Based Genome Mining Improves Discovery of Biosynthetic Gene Clusters and their Products from Salinispora Species. *Chemistry & Biology* 22: 460–471.
31. Doroghazi, R.J. and W.W.. Metcalf. 2013. Comparative genomics of actinomycetes with a focus on natural product biosynthetic genes. *Doroghazi and Metcalf BMC Genomics* 14: 611.
32. Eje, N. C. Z. Soe, J. Gu and R. 2013. *Codd Metallomics* 5: 1519-1528.

Biogeografía de cepas de Salinispora arenicola evidenciada por el tipo de metabolitos secundarios que producen.

33. Edlund, A., S. Loesgen, W. Fenical and P.R. Jensen. 2011. Geographic distribution of secondary metabolite genes in the marine actinomycete *Salinispora arenicola*. *Applied Environmental Microbiology* 77: 5916-5925.
34. Endo, A. y S.J. Danishefsk. 2005. Total synthesis of Salinosporamide A. *Journal of the American Chemical Society* 127: 8298-9.
35. Finlay, B. J. 2002. Global dispersal of free-living microbial eukaryote species. *Science* 296:1061-1063
36. Fenchel, T. 2003. Biogeography for bacteria. *Science* 301: 925–926.
37. Feling, R.H., G.O. Buchanan, T.J. Mincer, C.A. Kauffman, P.R. Jensen, W. Fenical, and D. John. 2003. Salinosporamide A: A highly cytotoxic proteasome inhibitor from a novel microbial source, a marine bacterium of the new genus *Salinispora*. *Angewandte Chemie International Edition* 42: 355–357.
38. Fenical, W, P.R. Jensen. 1993. Marine Microorganisms: A New Biomedical Resource. Marine Biotechnology. New York; London: Plenum Press. *Pharmaceutical and Bioactive Natural Products*. In: (Attaway DH, Zaborsky OR, Eds.) 1: 419-459.
39. Fenical, W. and P.R. Jensen. 2006. Developing a new resource for drug discovery: marine actinomycete bacteria. *Nature chemical biology* 12: 666–73.
40. Fenical, W., P.R. Jensen, M.A. Palladino, K.S. Lam, G.K. Lloyd y B.C. Potts. 2009. Discovery and development of the anticancer agent Salinosporamide A (NPI-0052). *Bioorganic and Medicinal Chemistry* 17: 2175-2180.
41. Filipinski, A y S. Kumar. 2005. Comparative genomics in eukaryotes. In The Evolution of the Genome. Elsevier, San Diego (ed. T.R. Gregory). Pp. 521-583.

Biogeografía de cepas de Salinispora arenicola evidenciada por el tipo de metabolitos secundarios que producen

42. Fox, G.E., J.D. Wisotzkey and P. Jurtshuk. 1992. How close is close: 16S rRNA sequence identity may not be sufficient to guarantee species identity. *International Journal Systematic Bacteriology* 42: 166–170.
43. Freel, K.C. S.J. Nam, W. Fenical and P.R. Jensen. 2011. Secondary metabolite gene evolution in three closely related marine actinomycete species. *Applied and Environmental Microbiology*. doi:10.1128/AEM.05943-11.
44. Freel, K.C., A. Edlund, P.R. Jensen. 2012. Microdiversity and evidence for high dispersal rates in the marine actinomycete *Salinispora pacifica*. *Environmental Microbiology* 14:480-493.
45. Freel, K.C., N. Millan-Aguinaga, y P.R. Jensen. 2013. Multilocus sequence typing reveals evidence of homologous recombination linked to antibiotic resistance in the genus *Salinispora*. *Applied and Environmental Microbiology* 79:5997-6005.
46. Garcia-Reyes, J.F., I. Ferrer, E.M. Thurman, A. Molina- Diaz, A.R. Fernandez-Alba. 2005. Searching for Non-Target Chlorinated Pesticides in Food by Liquid Chromatography/Time-of-Flight Mass Spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom* 19: 2780-2788.
47. Gevers, D., F.M. Cohan, J.G. Lawrence, B.G. Spratt, T. Coenye, E.J. Feil. 2005. Re-evaluating prokaryotic species. *Natural Review Microbiology* 3: 733–739.
48. Goo, K.S., M. Tsuda and D. Ulanova. 2014. *Antonie Van Leeuwenhoek* 105: 207–219.
49. Goodfellow, M. and S.T. Williams. 1983. Ecology of actinomycetes. *Annual Review of Microbiology* 37: 189-216.
50. Groll, M., R. Huber and B. C. M. Potts. 2006 *Journal of the American Chemical Society* 128: 5136–5141.

Biogeografía de cepas de Salinispora arenicola evidenciada por el tipo de metabolitos secundarios que producen

51. He, H. W.D. Ding, V.S. Bernan, A.D. Richardson, C.M. Ireland, M. Greenstein, G.A. Ellestad and G.T. Carter. 2001. *Journal of the American Chemical Society* 123: 5362–5363.
52. Hedlund, B.P., and J.T. Staley. 2004. Microbial endemism and biogeography. *In: (Microbial Diversity and Bioprospecting*. Bull, A.T. Ed.). Washington, DC, USA: *American Society for Microbiology Press*. Pp. 225–231.
53. Helmke, E. and H. Weylan. 1984. *Rhodococcus marinonascens* sp. nov., an actinomycete from the sea. *International Journal of Systematic Bacteriology* 34: 127-138.
54. Janso, E., B.A. Haltli, A.S. Eustáquio, K. Kulowski, A.J. Waldman, L. Zha, H. Nakamura, V.S. Bernan, H. He, G. T. Carter, F. E. Koehn and E. P. Balskus. 2014. *Tetrahedron* 70: 4156–4164.
55. Jensen, P.R., R. Dwight and Fenical, W. Distribution of actinomycetes in near-shore tropical marine sediments. 1991. *Applied and Environmental Microbiology*. 57: 1102-1108.
56. Jensen, P.R. and W. Fenical. 1996. Marine bacterial diversity as a resource for novel microbial products. *Journal of Industrial Microbiology* 17: 346-351.
57. Jensen, P.R., E. Gontang, C. Mafnas, T.J. Mincer, and W. Fenical. 2005. Culturable marine actinomycete diversity from tropical Pacific Ocean sediments. *Environmental Microbiology* 7:1039-48.
58. Jensen, P.R., T.J. Mincer, P.G. Williams and W. Fenical. 2005. Marine actinomycete diversity and natural product discovery. *Antonie van Leeuwenhoek* 87: 43-8.
59. Jensen, P.R. and C. Mafnas. 2006. Biogeography of the marine actinomycete. *Environmental Microbiology* 8:1881–1888.

Biogeografía de cepas de Salinispora arenicola evidenciada por el tipo de metabolitos secundarios que producen

60. Jensen, P.R., P.G. Williams, D.C. Oh, L. Zeigler and W. Fenical. 2007a. *Applied and Environmental Microbiology* 73: 1146-1152.
61. Jensen, P.R., P.G. Williams, D.C. Oh, L. Zeiger y W. Fenical. 2007b. Species specific secondary metabolite production in marine actinomycetes of the genus *Salinispora*. *Applied and Environmental Microbiology* 73:1146-1152.
62. Jensen, PR. 2010. Linking species concepts to natural product discovery in the post-genomic era. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. 37:219-224.
63. Jensen, P.R., S.B. Moore and W. Fenical. 2015. The marine actinomycete genus *Salinispora*: a model organism for secondary metabolite discovery. *Natural Products Reports* 32: 738.
64. Fenn, J.B. 2002. Electrospray ionization for biomolecules and the Nobel Laureate in Chemistry. *Bioengineering and Biotechnology* 3: 22-26.
65. Kempf, B and E. Bremer. 1998. Uptake and synthesis of compatible solutes as microbial stress responses to high-osmolality environments. *Arch Microbiology* 170: 319-330.
66. Kersten, R.D., A.L. Lane, M. Nett, T.K.S. Richter, B.M. Duggan, P.C. Dorrestein and B.S. Moore. 2013. *ChemBioChem* 14: 955–962.
67. Kim, T.K., A.K. Hewavitharana, P.N. Shaw and J.A. Fuerst. 2006. *Applied and Environmental Microbiology* 72: 2118-2125.
68. Lam, K.S. 2006. Discovery of novel metabolites from marine actinomycetes. *Current Opinion in Microbiology* 9: 245–51.
69. Lavín, M. F., E. Beier y A. Badan. 1997. Estructura hidrográfica y circulación del Golfo de California: Escalas estacional e interanual. En: (Lavín MF, Ed.). *Contribuciones a*

Biogeografía de cepas de Salinispora arenicola evidenciada por el tipo de metabolitos secundarios que producen.

la Oceanografía Física en México Monografía No. 3. Unión Geofísica Mexicana, Ensenada, Baja California. pp. 41–171.

70. Lian, W., K.P. Jayapal, S. Charaniya, S. Mehra, F. Glod, Y.S. Kyung. 2008. Genome-wide transcriptome analysis reveals that a pleiotropic antibiotic regulator, AfsS, modulates nutritional stress response in *Streptomyces coelicolor* *BMC Genomics* 9: 56.
71. Liao, W., W.M. Draper and S.K. Perera. 2008. Identification of Unknowns in Atmospheric Pressure Ionization Mass Spectrometry Using a Mass to Structure Search Engine. *Analytical Chemistry* 80:7765-7777.
72. Ling, T., V.R. Macherla, R.R. Manam, K.A. McArthur y B.C. Potts. 2007. Enantioselective Total Synthesis of (-)-Salinosporamide A (NPI- 0052). *Organic Letters* 9: 2289-92.
73. Little, J.L. 2001. Identification of Unknowns with LC/MS/MS Data Using TSCA, Chemical Inventory, or SciFinder. Proceedings of the ASMS, Chicago, IL.
74. Little, J.L. 2004. Identification of Surfactants by Electrospray Liquid Chromatography-Mass Spectrometry. Proceedings of the ASMS, Nashville, TN.
75. Little, L.L., D.C. Cleven and D.S. Brown. 2011. Identification of "Known Unknowns" Utilizing Accurate Mass Data and Chemical Abstracts Service Databases. *Journal American Society for Mass Spectrometry*. DOI: 10.1007/s13361-010-0034-3.
76. Ma, G., H. Nguyen y D. Romo. 2007. Concise Total Synthesis of (±)-Salinosporamide A, (±)-Cinnabaramide A, and Derivatives via a Bis-Cyclization Process: Implications for a Biosynthetic Pathway". *Organic Letters* 9: 2143-6.
77. Madigan, M.T., J.M. Martinko y J. Parker. 2004. Brock, *Biología de los Microorganismos*, 10ª edición, Pearson – Prentice Hall, Madrid (España).

Biogeografía de cepas de Salinispora arenicola evidenciada por el tipo de metabolitos secundarios que producen.

78. Maier, R. M., I. L. Pepper y C.P. Gerba. 2000. Environmental Microbiology. *Academic Press*, San Diego, CA. pp. 319-346.
79. Machado, D.L.C. 2013. Estudo da biodiversidade em actinobacterias marinhas, provenientes de sedimentos oceânicos colhidos no Arquipélago da Madeira. Tesis de licenciatura. (Biotecnología). Faculdade de Ciências e Tecnologia e a Universidade Nova de Lisboa. pp. 76.
80. Maldonado, L., W. Fenical, P.R. Jensen, C. a Kauffman, T.J. Mincer, A.C. Ward, A.T. Bull and M. Goodfellow. 2005a. *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: 1759-66.
81. Maldonado, L.A., J.E.M. Stach, W. Pathom-aree, A.C. Ward, A.T. Bull and M. Goodfellow. 2005. Diversity of cultivable actinobacteria in geographically widespread marine sediments. *Antonie van Leeuwenhoek* 8: 11–8.
82. Malin, G. and A. Lapidot. 1996. Induction of synthesis of tetrahydropyrimidine derivatives in *Streptomyces* strains and their effect on *Escherichia coli* response to osmotic and heat stress. *Journal Bacteriology* 178: 385-395.
83. Magarvey, N.A., J.M. Keller, V. Bernan, M. Dworkin and D.H. Sherman. 2004. Isolation and characterization of novel marine-derived Actinomycetes taxa rich in bioactive metabolites. *Applied and Environmental Microbiology* 70:7520-7529.
84. Manam, R.R. V.R. Macherla, G. Tsueng, C.W. Dring, J. Weiss, S.T.C. Neuteboom, K. S. Lam and B.C. Potts. 2009. *Journal of Natural Products* 72: 295–297.
85. Martiny, J.B.H., B.J.M. Bohannan, J.H. Brown, R.K. Colwell, J.A. Fuhrman and J.L. Green. 2006. Microbial biogeography: putting microorganisms on the map. *Natural Reviews Microbiology* 4: 102–112.

Biogeografía de cepas de Salinispora arenicola evidenciada por el tipo de metabolitos secundarios que producen

86. Martiny, J.B.H., B. Bohannan, J. Brown, R. Colwell, J. Fuhrman, J. Green, M.C. Horner-Devine, M. Kane, J. Krumins, C. Kuske, P. Morin, S. Naeem, L. Ovreas, A.-L. Reysenbach, V. Smith, J. Staley. 2006. Microbial biogeography: Putting microorganisms on the map. *Nature Reviews Microbiology* 4: 102-112.
87. Martin, J.F, A.L. Demain. 1980. Control of antibiotic biosynthesis. *Microbiological Reviews* 44:230-51.
88. Martín, J. F., A. Sola-Landa, F. Santos-Beneit, L.T. Fernández-Martínez, C. Prieto y A. Rodríguez-García. 2011. Cross-talk of global nutritional regulators in the control of primary and secondary metabolism in *Streptomyces*. *Microbial Biotechnology* 4: 165-174.
89. Medwave. 2003. Adducts: pathogenic mechanisms. *Revista Biomédica Revisada Por Pares* 3: 31-98.
90. Mincer, T.J., P.R. Jensen, C.A. Kauffman and W. Fenical. 2002. Widespread and persistent populations of a major new marine actinomycete taxon in ocean sediments. *Applied and Environmental Microbiology* 68: 5005–5011.
91. Mincer, T.J., W. Fenical and P.R. Jensen. 2005. Culture-dependent and culture-independent diversity within the obligate marine actinomycete genus *Salinispora*. *Applied and Environmental Microbiology* 71: 7019-7028.
92. Miyanaga, A. J.E. Janso, L. McDonald, M. He, H. Liu, L. Barbieri, A.S. Eustaquio, E. N. Fielding, G.T. Carter, P.R. Jensen, X. Feng, M. Leighton, F.E. Koehn and B.S. Moore,. 2011. *Journal of the American Chemical Society* 133: 13311-13313.
93. Morrone, J.J. y M. Del C. Coscarón. 1996. Distributional patterns of the American Peiratinae (Heteroptera: Reduviidae). *Zoologische Medelingen Leiden* 70: 1-15.

Biogeografía de cepas de Salinispora arenicola evidenciada por el tipo de metabolitos secundarios que producen.

94. Mullis, K., F. Faloona, S. Scharf, R. Saiki, G. Horn and H. Erlich. 1896. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology* 51:263-73.
95. Murphy B.T., T. Narender, C.A. Kauffman, M. Woolery, P.R. Jensen and W. Fenical. 2010. *Australian Journal of Chemistry* 63: 929–934.
96. Nakamura, T., H. Takagi, J. Shima. 2009. Effects of ice-seeding temperature and intracellular trehalose contents on survival of frozen *Saccharomyces cerevisiae* Cells. *Cryobiology* 58:170-4.
97. Nemergut, D.R., E.K. Costello, M. Hamady, C. Lozupone, L. Jiang, S.K. Schmidt y N. Fierer. 2011. Global patterns in the biogeography of bacterial taxa. *Environmental Microbiology* 13:135-144.
98. Nicolaou K. and W. M Dai. 1991. *Angewandte Chemie International Edition* 30: 1387–1416.
99. Ojanperä, S. A. Pelander, M. Peizing, I. Krebs, E. Vuori, I. Ojanperä. 2006. Isotopic Pattern and Accurate Mass Determination in Urine Drug Screening by Liquid Chromatography/Time-of-Flight Mass Spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom* 20:1161-1167.
100. Oh, D.C. P.G. Williams, C.A. Kauffman, P.R. Jensen and W. Fenical. 2006. *Organic Letters* 8: 1021–1024.
101. Oh, D.C., E.A. Gontang, C.A. Kauffman, P.R. Jensen and W. Fenical. 2008. *Journal of Natural Products* 71: 570–575.
102. Ortiz, E., I. Coya, L. González, L. Graña, G. Pérez y S. Sánchez. 2004. Detección de actividades biológicas en microorganismos marinos de la plataforma cubana.

Biogeografía de cepas de Salinispora arenicola evidenciada por el tipo de metabolitos secundarios que producen

Instituto de Oceanología. CITMA, Ciudad de la Habana, Cuba. Centro de Química Farmacéutica. *Avicennia* 17: 123-130.

103. Papke R.T., N.B. Ramsing, M.M. Bateson, D.M. Ward. 2003. Geographical isolation in hot spring cyanobacteria. *Environmental Microbiology* 5: 650–659.
104. Papke, R. T., and D. M. Ward. 2004. The importance of physical isolation to microbial diversification. *FEMS Microbial Ecology* 48: 293-303.
105. Palys, T., L.K. Nakamura and F.M. Cohan. 1997. Discovery and classification of ecological diversity in the bacterial world: the role of DNA sequence data. *International Journal Systematic Bacteriology* 47: 1145–1156.
106. Palys, T., E. Berger, I. Mitrica, L.K. Nakamura and F.M. Cohan. 2000. Protein-coding genes as molecular markers for ecologically distinct populations: the case of two *Bacillus* species. *International Journal Systematic Evolucion Microbiology* 50: 1021–1028.
107. Paterson I., R. Mina and E. A. Anderson. 2008. Total Synthesis of (-)-Salinicetals A and B. 2008. *Organic Letters* 10:3295-3298.
108. Prieto-Davó, A., W. Fenical y P. Jensen. 2008. Comparative actinomycete diversity in marine sediments. *Aquarium microbial ecology* 52:1-11.
109. Prieto-Davó, A. L.J. Villarreal-Gomez, S. Forscher-Dancause, A.T. Bull, J.E.M. Stach, D.C. Smith, D.C. Rowley & P.R. Jensen. 2013. Targeted search for actinomycetes from nearshore and deep-sea marine sediments. *FEMS Microbiology Ecology* 84: 510-518.
110. Renner, M.K., Y.-C. Shen, X.-C. Cheng, P.R. Jensen, W. Frankmoelle, C.A. Kauffman, W. Fenical, E. Lobkovsky and J. Clardy. 1999. *Journal of the American Chemical Society* 121: 11273–11276.

Biogeografía de cepas de Salinispora arenicola evidenciada por el tipo de metabolitos secundarios que producen

111. Reddy, L.R. P. Saravanan, E.J. Corey. 2004. A simple stereocontrolled synthesis of Salinosporamide A. *Journal of the American Chemical Society* 126: 6230.
112. Richardson, S.D. 2008. Environmental Mass Spectrometry: Emerging Contaminants and Current Issues. *Analytical Chemistry* 80: 4373-4402.
113. Richter, T. K. S., C.C. Hughes and B.S. Moore. 2014. *Environmental Microbiology*. DOI: 10.1111/1462-2920.12669.
114. Roca, W., C. Espinoza, A. Panta, G. Trujillo, D. Andrade. 2003. Estudio de las capacidades biotecnológicas e institucionales para el aprovechamiento de la biodiversidad en los países de la Comunidad Andina . Informe preparado para la Comisión Económica para América Latina y el Caribe (CEPAL) y la Corporación Andina de Fomento (CAF).
115. Roberts, M.W. and F.M. Cohan. 1995. Recombination and migration rates in natural populations of *Bacillus subtilis* and *Bacillus mojavensis*. *Evolution* 49: 1081–1094.
116. Robinson, J.A. 1991. Polyketide synthase complexes: their structure and function in antibiotic biosynthesis. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological* 332: 107–114
117. Roden, G., I. y G. W. Groves. 1959. Recent oceanographic in the Gulf of California. *Journal Marine Research* 18: 10-35
118. Roden, G., I. e I. Emilson. 1979. Physical oceanography of the Gulf of California. En: (Ayala-Castañares, A., Phleger, F., B., y Schwartzlose R., A., Laguarda, eds.). *El Golfo de California*. Universidad Nacional Autónoma de México. pp. 1-46.
119. Rojas-Herrera, R., J. Narváez-Zapata, M. Zamudio-Maya y M.E. Mena- Martínez. 2008. A simple silica-based method for metagenomic DNA extraction from soil and sediments. *Molecular Biotechnology* 40:13-17.

Biogeografía de cepas de Salinispora arenicola evidenciada por el tipo de metabolitos secundarios que producen

120. Rothschild, L.J. y R.L. Manicinelli. 2001. Life in extreme environments. *Nature* 409: 1092-1101.
121. Royal Society of Chemistry 2016. Registered charity number 207890 (Disponible en línea: <http://www.rsc.org>).
122. Russell, N.J. 1993. Lipids of halophilic and halotolerant microorganisms. *En:* (R.H. Vreeland y L.I. Hochstein. Eds). *The Biology of Halophilic Bacteria*. Boca Raton: CRC Press. USA, pp. 163-210.
123. Schultz, W., D.C. Oh, J.R. Carney, R.T. Williamson, D.W. Udvary, P.R. Jensen, S.J. Gould, W. Fenical and B.S. Moore. 2008. *Journal of the American Chemical Society* 130: 4507-4516.
124. Smith, R. L. y T.M. Smith (2006) *Ecología*, 6ª ed. Pearson Educación, Madrid.
125. Staley, J.T., and J.J. Gosink. 1999. Poles apart: biodiversity and biogeography of sea ice bacteria. *Annual Review Microbiology* 53: 189–215.
126. Stenn, H. and Mann M. 2002. Analysis of Bromotryptophan and Hydroxyproline Modifications by High-Resolution, High-Accuracy Precursor Ion Scanning Utilizing Fragment Ions with Mass-Deficient Mass Tags. Center for Experimental Bioinformatics, Department of Biochemistry and Molecular Biology, University of Southern Denmark, Campusve. *Analytical Chemistry* 74: 6230-6236
127. Stevenson, M., R. 1970. On the physical and biological oceanography near the entrance to the Gulf of California, October 1966-August 1967. *Inter-Americana Tropical Tuna Community, Bulletin* 4: 389-504.
128. Subramani, R. and W. Aalbersberg. 2012. Marine actinomycetes: an ongoing source of novel bioactive metabolites. *Microbiological Research* 167: 571–80.

Biogeografía de cepas de Salinispora arenícola evidenciada por el tipo de metabolitos secundarios que producen.

129. Surajit-Das, P., S. Lyla y S. Ajmal-Khan. 2006. Marine microbial diversity and ecology: Importance and future perspectives. *Current Science* 98: 1325-1335.
130. Tsueng, G., S. Teisan and K.S. Lam. 2008. Defined salt formulations for the growth of *Salinispora tropica* strain NPS21184 and the production of salinosporamide A (NPI-0052) and related analogs. *Appl. Microbial Biotechnology* 78: 827-832.
131. Tsueng, G. and K.S. Lam. 2010. A preliminary investigation on the growth requirement for monovalent cations, divalent cations and medium ionic strength of marine actinomycete *Salinispora*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 86:1525-1534.
132. Udvary, D. W., L. Zeigler, R.N. Asolkar, V. Singan, A. Lapidus, W. Fenical, P.R. Jensen and B. S. Moore. 2007. *Proceedings of the National Academy of Sciences. U. S. A.* 104: 10376-10381.
133. Valero, P. y F. Martín. 1984. *Nocardia* in soil of southeasterns Spain: abundance, distribution, and chemical characterization. *Canadian Journal of Microbiology* 30: 1088-1092.
134. Valverde, A., M. Tuffin, and D.A. Cowan. 2012. Biogeography of bacterial communities in hot springs: a focus on the actinobacteria. *Extrem. Life Extreme Cond.* 16: 669–679.
135. Vernam A y M. Evans. 2000. Environmental Microbiology. *American Society for Microbiology Press*, Washington D.C. pp. 160.
136. Vining, L. C. 1992. Secondary metabolism, inventive evolution and biochemical diversity a review. *Gene* 115: 135-140.
137. Ward, A. C, N. Bora. 2006. Diversity and biogeography of marine actinobacteria. *Current Opinion in Microbiology* 279-86.

Biogeografía de cepas de Salinispora arenicola evidenciada por el tipo de metabolitos secundarios que producen.

138. Weyland, H. 1969. Actinomycetes in North Sea and Atlantic Ocean sediments. *Nature* pp. 223-858.
139. Whitaker, R. J., D. W. Grogan and J. W. Taylor. 2003. Geographic barriers isolate endemic populations of hyperthermophilic archaea. *Science* 301:976-978.
140. Whitfield, J. 2005. Biogeography: is everything everywhere? *Science* 310: 960–961.
141. Williams, P.G., R.N. Asolkar, T. Kondratyuk, J.M. Pezzuto, P.R. Jensen and W. Fenical. 2007. Saliniketals A and B, Bicyclic Polyketides from the Marine Actinomycete *Salinispora arenicola*. *Journal Natural Products* 83: 88-83.
142. Williams, P.G., E.D. Miller, R.N. Asolkar, P.R. Jensen and W. Fenical. 2007a. *The Journal of Organic Chemistry* 72: 5025–5034.
143. Williams, P.G., R.N. Asolkar, T. Kondratyuk, J.M. Pezzuto, P.R. Jensen and W. Fenical. 2007b. *Journal Natural Products* 70: 83–88.
144. Wilkinson T., E. Wiken, J. Bezaury Creel, T. Hourigan, T. Agardy, H. Herrmann, L. Janishevski, C. Madden, L. Morgan y M. Padilla. 2009. Ecorregiones marinas de América del Norte. *Comisión para la Cooperación Ambiental*, Montreal. Pp. 200.
145. Xu, M., M.L. Hillwig, A.L. Lane, M.S. Tiernan, B.S. Moore and R.J. Peters. 2014. *Journal Natural Products* 77: 2144-2147.
146. Yashayaev, I.M. y I.I. Zveryaev. 2001. Climate of the seasonal cycle in the North Pacific and the North Atlantic oceans. *International journal of climatology* 21: 401-417.
147. Yurkanis, P. 2007. Química orgánica (5ª ed.). México: Pearson Educación. (EAN: 9789702607915 ISBN: 9702607914).

Biogeografía de cepas de Salinispora arenicola evidenciada por el tipo de metabolitos secundarios que producen

148. Zhi, Q.X., W. Jian-Feng, H. Yu-You and Yong Wang. 2013. Recent Advances in the Discovery and Development of Marine Microbial Natural Products. *Marine Drugs* 11: 700-717.
149. Ziemert, N., A. Lechner, M. Wietz, N. Millan-Aguinaga, K.L. Chavarria and P.R. Jensen. 2014. *Proceedings of the National Academy of Sciences. U.S.A.* 111: E1130–E1139.

CAPÍTULO VI. ANEXO.

6.1 Análisis de dereplicación en la plataforma: The Global Natural Products Social Molecular Networking (GNPS) para los iones con parentescos esperados

En el análisis de **dereplicación**, en donde dos compuestos que tienen patrones de fragmentación idénticos o similares se asocian, el programa utiliza algoritmos con los que se procesaron los espectros de MS de las 18 cepas de *S. arenicola*. Este análisis indicó un total de 31 compuestos que presentaron semejanza estructural con los compuestos previamente reportados en las bibliotecas GNPS. En las tablas 12 y 13 a-b se presenta en qué cepa se encontró cada compuesto. Las diferencias de masas entre el ión molecular $[M+H]^+$ de los espectros de MS con los compuestos de las bibliotecas GNPS asociadas estuvieron en un intervalo de 0.01 ± 25.04 Da.

De los 31 compuestos asociados a los espectros de MS, sólo tres corresponden a metabolitos secundarios previamente reportados para cepas de *S. arenicola*, como son: **Salinicetal A** ($m/z= 418.26 [M+Na]^+$, cepas: AMS 155 y S 680), **Estaurosporina** ($m/z= 467.214 [M+H]^+$, cepa: S 680) y **Arenimicina B** ($m/z= 809.325 [M+H]^+$, cepa: NCA 087) y se encontraron dentro del intervalo de diferencia de masa de 0.5 Da. Los otros 28 compuestos fueron reconocidos como iones “fantasma” (Jensen *et al.*, 2015) ya que aparecieron durante el análisis de dereplicación pero no fueron verdaderamente representativos de lo que estaban produciendo las cepas de *S. arenicola* con base en los parámetros pre-establecidos (± 0.5 Da) y el análisis del patrón de fragmentación en sus espectros de masas (Tablas 12 y 13a-b).

Biogeografía de cepas de Salinispora arenicola evidenciada por el tipo de metabolitos secundarios que producen

Tabla 12. Compuestos asociados a los espectros de MS de las cepas de *S. arenicola* a partir del análisis de dereplicación. Se indica el ión molecular $[M+H]^+$ a mediante el cual se realizó la comparación.

	COMPUESTO	Ión molecular	
		MS	GNPS
1	"N,N'-DIACETIL-1,6-DIAMINOHEXANO"	202.09	201.16
2	"NCGC00160316-01 6,7-didehidro-26,28didemetil-16,28- secosolanidan-3,16-diol"	401.29	402.34
3	(6aR,9R,10aR)-9-(metilsulfanilmetil)-7-propil-6,6a,8,9,10,10a-hexahidro-4H-indolo[4,3-fg]quinoline]	316.10	315.19
4	1-metoxifenazina	211.13	210.23
5	2-heptil-3-hidroxi 4-quinolona	246.10	260.00
6	2,3,5,7,15-pentaacetoxi-8-benzoil-9,14-dioxojatrofa-6(17),11E-dien	734.29	735.26
7	3,5,7,15-tetraacetoxi-8-benzoiloxi-2-hidroxi-9,14-dioxojatrofa-6(17),11E- diene	718.29	693.25
8	5,7-diacetoxi-3-benzoiloxi-14,15-dihidroxi-8-isobutiriloxi-9-oxojatrofa-6(17),11E-diene (9)	683.44	665.29
9	Arenimicina B	809.325	809.31
10	Cloruro de Benzalconio (C12)	305.161	304.29
11	Dehidrohalicloclina F	273.10	272.24
12	Desferrioxamina B	639.42	623.34
13	Diazaquinomicina C	383.17	383.17
14	Diclofenaco	317.14	318.01
15	Dutasterida	551.363	553.37
16	Fisherellin A	429.32	431.27
17	Irbesartan	874.88	857.47
18	Mirapex (Pramipexole)	397.42	423.16
19	MLS000697600-01	327.26	353.18
20	MLS001074187-01 57-83-0	317.14	315.24
21	Diazaquinomicina C	383.17	383.17
22	MLS002153960-01Acacetin480-44-4	283.18	285.08
23	Moguisteína	361.24	362.10
24	N-feniltridecanamida	317.14	318.28
25	Ácido carboxílico-1-Fenazina	233.13	225.00
26	Pimibendan	305.16	305.16
27	Propranolol HCl	261.03	260.17
28	Salinictal A	418.262	418.26
29	Estaurosporina	467.21	467.21
30	Citrato de Tamixifeno (Nolvadex)	371.23	372.23
31	Tazarotena	305.16	305.16

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO (UNAM)
 Posgrado en Ciencias del Mar y Limnología (ICMyL)

Biogeografía de cepas de Salinispora arenicola evidenciada por el tipo de metabolitos secundarios que producen

Tabla 13a. Diferencia de masa (Da) entre las moléculas identificadas en la biblioteca GNPS con respecto a los espectros de MS de *S. arenicola*.

GOLFO DE CALIFORNIA											
COMPUESTO	AMS 155	S 680	CNY 686	CNY 687	CNY 688	CNY 689	CNY 690	CNY 691	CNY 692	CNY 695	CNY 696
1					0.93	0.93			0.93		
2											
3		0.912									
4				0.126							
5											
6		0.97					1.96				
7					25.04	25.04	25.04		25.04		
8				18.15							
9											
10											
11	0.857			0.857							
12	16.08										
13				18.15							
14	0.865										
15		2.01									
16		1.95									
17	17.406										
18			25.74					25.74			25.74
19		1.077									
20											1.905
21						0.001					
22											
23											
24	1.139										
25	8.129										
26			0.005		0.005	0.004					
27	0.861		0.969	0.86							
28	0.01	2.01									
29											
30											
31											

Tabla 13b.

MAR CARIBE							
COMPUESTO	NCA-041	NCA-038	NCA-080	NCA-083	NCA-081	NCA-087	NCA-088
1							
2						1.043	
3							
4	0.126						
5	13.902						
6	0.974	1.96				0.974	0.974
7		25.04	24.04		25.04	25.04	
8							
9							0.01
10		0.87					
11	0.86						0.86
12							
13							
14							
15							
16							
17							
18							
19							
20							
21							
22	1.9						
23	0.862						
24							
25							
26						0.005	
27							0.861
28							0.01
29		0.004					
30	0.999						
31		0.87					

Biogeografía de cepas de Salinispora arenícola evidenciada por el tipo de metabolitos secundarios que producen _