



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE
*STREPTOMYCES MOBARAENSIS***

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGA

P R E S E N T A:

SOFÍA NATALÍ MENDOZA CABRERA



**DIRECTOR DE TESIS:
DOCTOR LORENZO PATRICK SEGOVIA
FORCELLA**

Ciudad Universitaria, Ciudad de México, 2017



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.

CONTENIDO

| | |
|--|-----------|
| PORTADA..... | 1 |
| CONTENIDO..... | 2 |
| AGRADECIMIENTOS..... | 4 |
| RESUMEN..... | 5 |
| ABSTRACT..... | 6 |
| INTRODUCCIÓN..... | 7 |
| 16SrRNA: una herramienta muy útil para la clasificación bacteriana..... | 7 |
| <i>Streptomyces</i> : bacterias de complejidad morfológica con gran potencial de producción de antibióticos | 9 |
| <i>Streptomyces mobaraensis</i> y la producción del péptido antibiótico ciclotiazomicina..... | 10 |
| Genes bld y whi: implicaciones en el desarrollo de <i>Streptomyces</i> | 13 |
| Pregunta de Investigación..... | 15 |
| Hipótesis..... | 15 |
| Objetivo general..... | 16 |
| Objetivos particulares..... | 16 |
| MÉTODO..... | 16 |
| Cultivo de <i>S.mobaraensis</i> ATCC29032 y <i>B.cereus</i> ATCC14579..... | 16 |
| Extracción de ADN genómico de <i>S. mobaraensis</i> y <i>Bacillus cereus</i> | 16 |
| Amplificación del gen 16S rRNA..... | 17 |
| Diseño de oligonucleótidos para amplificar los genes marcadores: ciclotiazomicina, bldA, whig y whib..... | 18 |
| Purificación y electroforesis de los productos de PCR..... | 19 |
| Secuenciación de los amplicones y análisis de las secuencias mediante BLAST: Basic Local Alignment Search Tool | 20 |
| RESULTADOS..... | 22 |
| Extracción de ADN genómico de <i>S.mobaraensis</i> y de <i>B.cereus</i> ATCC1457..... | 22 |
| Coincidencias al buscar los genes marcadores en la base de datos de NCBI..... | 23 |
| Amplificación del gen 16S rRNA..... | 25 |
| Amplificación del gen ciclotiazomicina..... | 27 |
| Amplificación del gen bldA..... | 28 |
| Amplificación de los genes whig y whib..... | 28 |
| Secuenciación de los genes marcadores..... | 30 |
| Análisis de las secuencias mediante BLAST..... | 32 |

| | |
|--------------------------|-----------|
| Discusión..... | 33 |
| Conclusiones..... | 35 |
| BIBLIOGRAFÍA..... | 36 |
| ANEXOS..... | 38 |

AGRADECIMIENTOS

Le agradezco muchísimo al Doctor Lorenzo Segovia por haberme permitido ser parte de su laboratorio, por sus consejos, su contribución a mi aprendizaje, su paciencia y el gran apoyo que siempre me dio.

A mis sinodales Rodrigo, Saúl, César y Vanessa les agradezco muchísimo toda su ayuda, su tiempo y sus correcciones en el escrito de la tesis.

A la Doctora Claudia Martínez por sus opiniones en las exposiciones del proyecto y por sus consultas sobre la realización de los experimentos.

Al Doctor José Luis Puente por su apoyo en todos los trámites necesarios para la titulación y por sus enseñanzas.

A la Maestra en Ciencias Blanca Ramos le doy las gracias por sus consejos, por su conocimiento que me transmitió y por su gran ayuda en la realización de los experimentos de ésta tesis. A la M.C. Iris Bravo le agradezco sus enseñanzas y sus correcciones en la elaboración de ésta tesis. A ambas les agradezco el intercambio de ideas y sus discusiones enriquecedoras.

A Karel Estrada Guerra le agradezco su apoyo en la parte de bioinformática y a la Dra. Mabel Rodríguez por sus consejos en la planeación de los experimentos.

A todos los miembros del laboratorio gracias por su amistad, su ayuda y por tantos momentos cómicos que vivimos.

A Grillo por su gran amistad, siempre estarás en mi corazón.

A mi familia por su apoyo incondicional.

Gracias a mis amigos de la Facultad de Ciencias, sobre todo a Esmeralda, Ángel y Edson que siempre han estado conmigo en las buenas y en las malas, en las locuras y en las prácticas de campo que eran toda un aventura. Y a Aarón, quien me abandonó en Ciencias para seguir otro destino pero al que también aprecio mucho y lo considero un gran amigo. Valoro mucho su amistad, le han dado a mi vida grandes momentos de felicidad, son personas increíbles.

Y sobre todo quiero darle las gracias a mi mamá que siempre me ha apoyado en todas mis locuras y me ha dado la fortaleza para seguir adelante, te quiero mucho.

RESUMEN

La secuenciación del gen 16S rRNA bacteriano resulta muy útil para llevar a cabo clasificaciones taxonómicas, debido a su naturaleza conservativa y a su distribución universal. En este proyecto se realizó la identificación de la bacteria *Streptomyces mobaraensis* mediante el análisis de la secuencia del gen ribosomal 16S.

S. mobaraensis pertenece al filo de las Actinobacterias. Se trata de una bacteria gram positiva miceliar aeróbica que habita en ambientes terrestres mesófilos. La importancia de ésta bacteria radica en su potencial de producción de un antibiótico llamado ciclotiazomicina, el cual se ubica dentro de la familia de los péptidos antibióticos denominados tiopéptidos, una clase emergente de antibióticos que surgen a partir de cascadas de modificaciones postraduccionales en péptidos sintetizados ribosomalmente. La ciclotiazomicina podría tener aplicaciones prometedoras al poseer actividad antifúngica e inhibitoria de la enzima renina que se encuentra asociada con hipertensión. Sin embargo, aún no ha sido llevado a pruebas clínicas debido a su baja solubilidad como es el caso de la mayoría de los tiopéptidos.

El cultivo de *S. mobaraensis* resulta fundamental para el estudio de este péptido antibiótico. Sin embargo, se ha visto interferido por la contaminación con otras especies bacterianas en el laboratorio. En el presente trabajo se hizo uso de la secuenciación del gen 16S rRNA, del gen ciclotiazomicina y de una serie de genes marcadores de Actinobacterias (*bldA*, *whig* y *whib*), con el objetivo de desarrollar un método rápido de identificación de ésta especie en caso de contaminación.

La secuenciación del gen 16S rRNA permitió llevar a cabo una eficaz identificación de *S. mobaraensis*. Sin embargo, no logró discernir a la cepa bacteriana que se utilizó en este proyecto, la cual resulta esencial identificar puesto que se trata de la cepa productora del antibiótico ciclotiazomicina.

El gen ciclotiazomicina, constituye el único gen utilizado en este proyecto que nos permite identificar la cepa al ser un gen verdaderamente exclusivo de *S. mobaraensis* ATCC29032. La amplificación de este gen abre paso a la realización de numerosas investigaciones en el laboratorio sobre este péptido antibiótico, en su mayoría estudios sobre relaciones estructura-función.

Asimismo, se vio que los genes característicos de Actinobacterias: *bldA*, *whig*, y *whib* podrían fungir como marcadores de *S. mobaraensis*, ya que aunque se encuentran am-

pliamente distribuidos en varias especies de *Streptomyces*, la amplificación, secuenciación y posterior análisis en la base de datos de BLAST de estos genes nos mostró que los alineamientos más significativos eran con *S.mobaraensis* y no con las otras especies, lo cual nos demuestra su utilidad para llevar a cabo la identificación de ésta bacteria en particular.

ABSTRACT

The sequencing of the bacterial 16S rRNA gene is very useful to carry out taxonomic classifications, due to its conservative nature and its universal distribution. In this project, the identification of the *Streptomyces mobaraensis* bacteria was carried out by analyzing the 16S ribosomal gene sequence.

S. mobaraensis belongs to the phylum Actinobacteria. It is an aerobic mycelial gram positive bacterium that lives in mesophilic terrestrial environments. The importance of this bacterium lies in its production potential of an antibiotic called cyclothiazomycin, which is located within the family of antibiotic peptides called thiopeptides, an emerging class of antibiotics that arise from cascades of post-translational modifications in peptides synthesized ribosomally. Cyclothiazomycin could have promising applications by having antifungal and inhibitory activity of the renin enzyme that is associated with hypertension. However, it has not yet been taken to clinical trials due to its low solubility as is the case with most of the thiopeptides.

The culture of *S.mobaraensis* is fundamental for the study of this antibiotic peptide. However, it has been interfered by contamination with other bacterial species in the laboratory. Therefore, in the present work, sequencing of the 16S rRNA gene, the cyclothiazomycin gene and a series of Actinobacteria marker genes (*bldA*, *whig* and *whib*) was used, with the aim of developing a rapid identification method of this species in case of contamination.

Sequencing of the 16S rRNA gene allowed to carry out an efficient identification of *S.mobaraensis*. However, it failed to discern the bacterial strain used in this project, which is essential to identify since it is the production strain of the antibiotic cyclothiazomycin.

The cyclothiazomycin gene is the only gene used in this project that allows us to identify the strain since it is a truly exclusive gene of *S.mobaraensis* ATCC29032. The amplification of this gene opens the way for numerous laboratory investigations on this antibiotic peptide, mostly studies on structure-function relationships.

Likewise, it was found that the characteristic genes of Actinobacteria: *bldA*, *whig*, and *whib* could act as markers of *S.mobaraensis*, since although they are widely distributed in

several *Streptomyces* species, the amplification, sequencing and subsequent analysis in the BLAST database of these genes showed us that the most significant alignments were with *S.mobaraensis* and not with the other species, which shows its usefulness to carry out the identification of this particular bacterium.

INTRODUCCIÓN

Secuenciación del gen 16S rRNA: una herramienta muy útil para la clasificación bacteriana

En un principio, las clasificaciones bacterianas se realizaban basándose en similitudes morfológicas y en aspectos nutricionales. Sin embargo, la secuenciación del gen 16S rRNA, que proporciona análisis filogenéticos y taxonómicos detallados ha tenido un gran auge debido a su naturaleza conservativa y a su distribución universal (Lane et al.1985). La secuencia del gen 16S rRNA ribosomal tiene alrededor de 1,550 pares de bases y se compone de regiones variables y conservadas en todas las bacterias (Clarridge, 2004). Las regiones conservadas han sido alineadas y usadas para buscar oligonucleótidos universales 16S, los cuales sirven para amplificar el gen ribosomal 16S de todas las especies bacterianas (Baker et al., 2003; McCabe et al., 1999). En la **Tabla 1** se muestran los oligonucleótidos universales más empleados para amplificar el gen 16S rRNA.

Tabla 1. Secuencias (5´-3´) de los oligonucleótidos universales forward y reverse más utilizados para amplificar el gen 16S rRNA.

| OLIGONUCLEÓTIDO | SECUENCIA 5´-3´ | REFERENCIA |
|--------------------|----------------------|--------------------|
| 8Forward | AGAGTTTGATCCTGGCTCAG | Turner et al. 1999 |
| 27Forward | AGAGTTTGATCMTGGCTCAG | Lane et al. 1991 |
| 1391Reverse | GACGGGCGGTGTGTRCA | Turner et al. 1999 |
| 1492Reverse | GGTACCTTCTTACGACTT | Turner et al. 1999 |

Las regiones hipervariables del gen 16S rRNA son las que nos permiten clasificar a las bacterias. Se han descrito 9 regiones hipervariables (V1-V9) que demuestran una considerable diversidad en la secuencia entre diferentes bacterias (Chakravorty, et al. 2007). Las nueve regiones hipervariables abarcan los nucleótidos 69-99 (V1), 137-242 (V2), 433-497 (V3), 576-682 (V4), 822-879 (V5), 986-1043 (V6), 1117-1173 (V7), 1243-1294 (V8) y

1435-1465 (V9) (numeración basada en el sistema de nomenclatura de *E.coli*) (Brosius et al., 1978) (**Tabla 2**).

Tabla 2: Regiones hipervariables (V1-V9) del gen 16S rRNA de *E.coli* con su respectiva posición nucleotídica y el número de pares de bases que abarca cada región hipervariable (Brosius et al., 1978).

| REGIÓN | POSICIÓN | # DE PARES DE BASES |
|--------|-----------|---------------------|
| V1 | 69-99 | 30 |
| V2 | 137-242 | 105 |
| V3 | 338-533 | 195 |
| V4 | 576-682 | 106 |
| V5 | 822-879 | 57 |
| V6 | 967-1046 | 79 |
| V7 | 1117-1173 | 56 |
| V8 | 1243-1294 | 51 |
| V9 | 1435-1465 | 30 |

El primer reporte sobre el uso potencial de la secuenciación del gen 16S rRNA en clasificaciones taxonómicas y filogenéticas se remonta a las investigaciones llevadas a cabo por Dubnau et al. en 1965 sobre las relaciones de conservación de la secuencia del gen 16S rRNA en diferentes especies de *Bacillus*. Sin embargo, el uso generalizado de este gen fue impulsado gracias a la labor pionera de Woese, quien hizo notar el papel de ésta secuencia génica como un cronómetro molecular (Clarridge, J. et al. 2004, Woese, 1987). La secuencia del gen 16S rRNA ha sido determinada para un largo número de cepas bacterianas y las secuencias nucleotídicas se encuentran anotadas en numerosas bases de datos como GenBank. Esto nos ha permitido tener a la disposición numerosas secuencias bacterianas del gen 16S rRNA contra las cuales se puede comparar la secuencia de una cepa desconocida para llevar a cabo identificaciones bacterianas (Clarridge, J. et al. 2004).

Streptomyces: bacterias de complejidad morfológica con gran potencial de producción de antibióticos

Los *Streptomyces* son parte de las Actinobacterias, una clase de bacterias Gram positivas con gran diversidad morfológica. Comparaciones de la secuencia del gen 16S rRNA muestran que el último ancestro en común de las Actinobacterias vivió hace 1.5-2 billones de años y se piensa que los *Streptomyces* se originaron hace 440 millones de años, después de la invasión de la tierra por las plantas y el rápido incremento de oxígeno en la atmósfera (Embley & Stackebrandt, 1994).

Los *Streptomyces* se encuentran entre las bacterias más complejas morfológicamente hablando puesto que forman un micelio vegetativo y mediante el uso de varias enzimas hidrolíticas extracelulares extraen los nutrientes del suelo. Para la dispersión de *Streptomyces*, las esporas son formadas en estructuras reproductivas especializadas llamadas hifas aéreas, las cuales emergen desde la superficie de la colonia (Chater & Losick, 1997), formando compartimientos de 100 mm de largo que contienen varias copias del genoma. Cuando esos compartimientos detienen su crecimiento, son sometidos a septaciones múltiples para dar lugar a una cadena de compartimientos unigenómicos que acumulan un pigmento conforme se van convirtiendo en cadenas de esporas maduras (Chandra y Chater, 2014).

Los *Streptomyces* son conocidos por su habilidad de producir antibióticos clínicamente importantes y su complejidad morfológica está ligada a su extraordinaria habilidad para producir diversos metabolitos secundarios (Chater, 2011; Liu et al., 2013).

Dentro de los *Streptomyces* se encuentra una bacteria llamada *Streptomyces mobaraensis*. *S. mobaraensis* ATCC29032 es una bacteria Gram positiva miceliar aeróbica que habita en ambientes terrestres mesófilos cuyo genoma tiene una longitud total de 7.47 Mb y un alto contenido de GC: 73.3% (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>). La importancia del estudio de ésta bacteria radica en la capacidad de ésta cepa bacteriana de producir un péptido antibiótico denominado ciclotiazomicina, el cual constituye un gen marcador clave de *S.mobaraensis*. Con gen marcador me refiero a una secuencia de ADN específico cuya localización exacta ha sido identificada en el cromosoma y cuya herencia puede ser rastreada para separar células, individuos, poblaciones o especies (National Human Genome Research Institute: <https://www.genome.gov>).

***Streptomyces mobaraensis* y la producción del péptido antibiótico ciclotiazomicina**

La ciclotiazomicina se agrupa dentro de la familia de péptidos antibióticos denominados tiopéptidos. Los tiopéptidos son una clase de antibióticos que surgen a partir de modificaciones postraduccionales en péptidos sintetizados ribosomalmente (Walsh, et al. 2010). Se trata de antibióticos ricos en sulfuro altamente modificados que tienen arquitecturas muy particulares y modos de acción inusuales, cuya principal característica es un anillo central de piridina, tetrapiridina o dehidropiperidina que posee hasta 3 sustituyentes tiazoles (Wang et al. 2010; Barnizo et al. 2014).

Son producidos por muchas bacterias Gram-positivas que habitan en el suelo, aunque recientemente en Japón se aisló un tiopéptido de una muestra de esponja marina producido por *B.cereus* QN03323 con potente actividad antibacteriana contra *Staphylococcus aureus*, bacteria patógena causante de infecciones cutáneas y de las mucosas (Baringo et al.2014; Nagai et al. 2003).

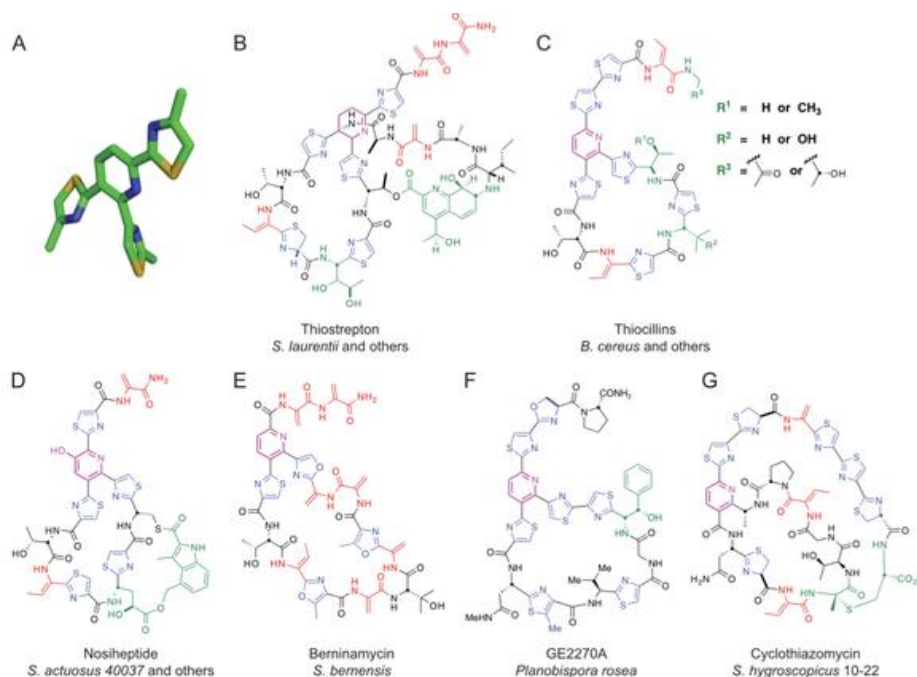
Se ha visto que los tiopéptidos poseen una gran actividad contra varios patógenos resistentes como son *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (MRSA), *Streptococcus pneumoniae* resistente a penicilina (PRSP) y *Enterococcus* resistente a vancomicina (VRE) (Bagley et al., 2005). Representan una clase emergente de compuestos antimicrobianos prometedores. Sin embargo, debido a su baja solubilidad aún no han tenido la aplicación clínica deseada y hasta la fecha existen solamente 2 tiopéptidos que se encuentran en el mercado: tiostreptón y nosihéptido, los cuales se encuentran restringidos para uso veterinario como pomada para infecciones de la piel de perros y gatos y únicamente existe un tiopéptido llamado GE2270 que se encuentra en pruebas clínicas para tratar el acné (Baringo et al., 2014).

El modo de acción de los tiopéptidos radica en su unión a la subunidad 50S ribosomal que corresponde a la región de unión del factor de elongación Ef-G, lo cual no permite que ocurra la translocación del tRNA en el ribosoma. También se ha visto que se pueden unir directamente al factor de elongación Ef-Tu bloqueando su capacidad de chaperona de llevar los tRNAs al ribosoma (Walsh et al. 2010).

Recientemente se ha encontrado que algunos tiopéptidos tienen actividad antiproliferativa en células cancerígenas humanas, como son tiostreptón y siomicina A ,los cuales tienen una actividad inhibitoria del proteosoma y del factor de transcripción FoxM1 (forkhead box M1), un activador transcripcional involucrado en la proliferación celular (Bhat et al. 2009).

Existen alrededor de 100 miembros de la familia de péptidos antibióticos tiazolil que se han aislado hasta la fecha (Bagley, 2005), siendo el primero de ellos la micrococcina, descubierta en 1948. De entre los antibióticos tiopéptidos más comunes se encuentran tiostrepton aislado de *Streptomyces laurentii*, tiocilina aislado de *Bacillus cereus*, nosihéptido aislado de *S. actuosus*, berninamicina aislado de *S.bernensis*, ciclotiazomicina aislado de *S.hygroscopicus* y GE2270A obtenido a partir de *Planobispora rosea* (Walsh, et al. 2010) (**Figura 1**).

Figura 1. Estructuras moleculares de antibióticos tiopéptidos: A. tiocilina B. tiostrepton C. tiocilina D. nosihéptido E. berninamicina F. GE2270A G.ciclotiazomicina (Walsh, et al. 2010).



El tiopéptido ciclotiazomicina producido por *S.mobaraensis* posee una estructura macrocíclica única derivada de un péptido estructural de 18 aminoácidos (Young et al. 2011; Zhang et al. 2014).

El cluster de genes de 22.7 kb que codifica para la ciclotiazomicina ha sido ampliamente estudiado en *S. Hygroscopicus*. Se ha visto que existen 15 ORFs que cubren todos los genes funcionales requeridos para la producción del antibiótico. De entre ellos, existen 6 genes: cltBCDEFG, que flanquean el gen estructural cltA y que codifican para las enzimas

requeridas para la modificación postraduccional del pre péptido y para la formación del antibiótico maduro (Wang et al. 2010).

La estructura de este péptido antibiótico fue dilucidada mediante experimentos de degradación y análisis espectroscópicos (Wang et al. 2010). Contiene una dehidroserina, 2 residuos dehidrotreonina, tres tiazolinos, tres tiazoles y una piridina. Al compararla a la ciclotiazomicina con los tiopéptidos comunes, ésta posee características únicas ya que carece del característico sustituyente azol en el dominio central de piridina y en su lugar posee un residuo en el heterociclo derivado de alanina y 2 loops macrocíclicos (Figura 2) (Wang et al. 2010).

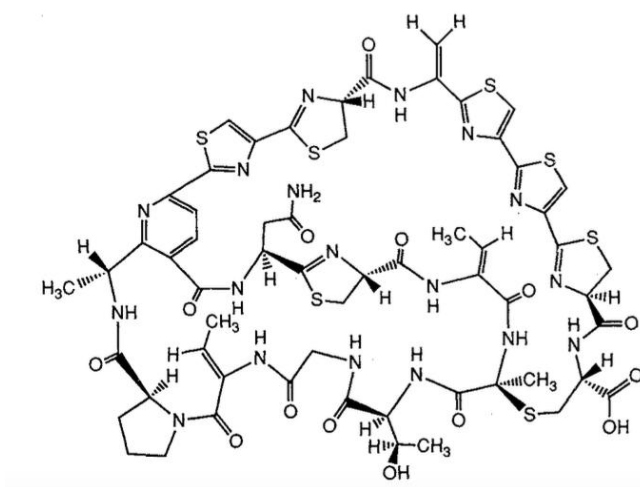
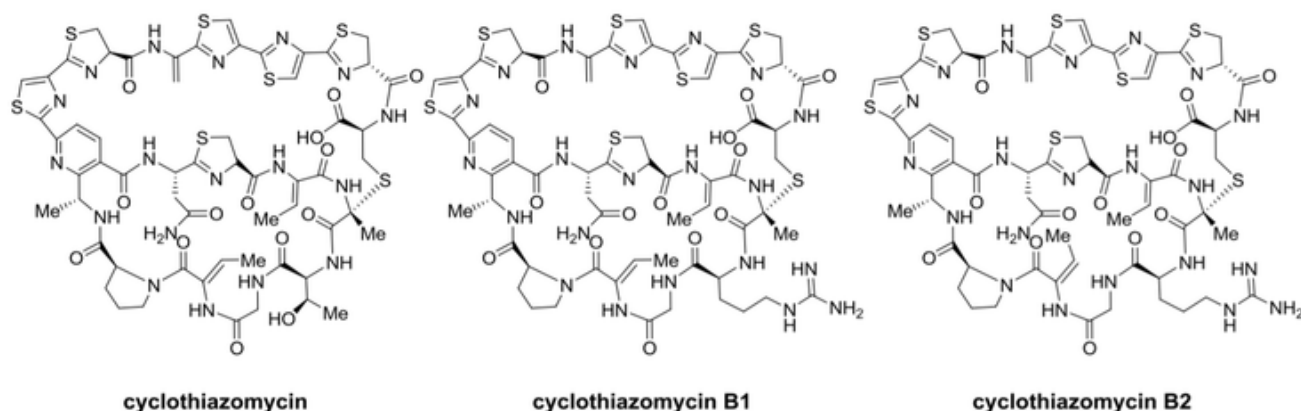


Figura 2. Estructura de ciclotiazomicina (Aoki et al. 1999)

La importancia del antibiótico ciclotiazomicina radica en su función inhibitoria de la renina, la cual es una enzima asociada con la hipertensión, diabetes y alzheimer (Baringo et al.2014). Se trata de una enzima limitante en la cascada que comienza con el corte de la angiotensina y que termina con la formación de angiotensina II, siendo la angiotensina una hormona peptídica que causa vasoconstricción y un aumento en la presión arterial, por lo que la enzima renina es considerada uno de los blancos más efectivos para tratar la hipertensión (Baringo et al.2014).

Hasta la fecha, se han aislado 2 análogos de la ciclotiazomicina: B1 y B2 (**Figura 3**). La ciclotiazomicina B1 es la que ha sido estudiada y se ha visto que posee actividad antifúngica al unirse a la quitina causando la fragilidad de la pared celular (Baringo et al.2014).

Figura 3. Ciclotiazomicina y sus análogos: B1 y B2 (Baringo et al.2014).



La producción de antibióticos como la ciclotiazomicina coincide con la formación de hifas aéreas de esporulación en *Streptomyces* debido a que estos antibióticos protegen a las hifas aéreas emergentes de otros microorganismos (Elliot et al., 2008). Se han identificado una serie de genes denominados *bld* y *whi* que son esenciales para la formación de éstas hifas aéreas y para la esporulación, respectivamente (Hopwood et al.1976; Merrick, 1976) Estos podrían servir como genes marcadores de *S.mobaraensis*, al igual que la ciclotiazomicina.

Genes *bld* y *whi*: implicaciones en el desarrollo de *Streptomyces*

Un gen relevante en el desarrollo de los *Streptomyces* es *bldA*, el cual a diferencia de otros genes regulatorios en *Streptomyces* no codifica para un factor de transcripción, sino que codifica para el único tRNA que puede traducir eficientemente el codón de leucina UUA, un codón raramente usado en los genomas de los *Streptomyces* debido a que estos poseen un alto contenido de GC en su DNA y usan preferencialmente los codones ricos en GC (Chater y Chandra, 2008).

Se ha estudiado que la abundancia del tRNA que produce *bldA* determina si un gen llamado *AdpA* llega a niveles suficientes para activar el desarrollo de las hifas aéreas. El gen *adpA* actúa como un regulador maestro de 37 unidades transcripcionales en la vía de señalización de formación de éstas hifas, afectando cascadas de proteasas, péptidos morfogénicos extracelulares y el metabolismo secundario (Hengst et al. 2010; Lawlor et

al. 1987; Leskiw et al. 1993; Takano et al., 2003). La presencia del codón TTA en el gen de desarrollo *adpA* de *Streptomyces*, hace que el tRNA de BldA sea esencial para la formación del micelio aéreo y que las mutantes estén bloqueadas en la diferenciación fológica (Chater y Chandra, 2008).

Los genes *bld* se activan en respuesta a un estrés nutricional y a diversas señales ambientales para formar éstas hifas aéreas con el objetivo de desarrollar largas cadenas de esporas que sean resistentes a condiciones adversas y que le permitan dispersarse a la bacteria (McCormick et al. 2012; Chater y Chandra, 2006). Una vez que son activados los genes *bld*, se activan otra serie de genes denominados *whi*, los cuales son fundamentales para formar las cadenas maduras de esporas y en su ausencia las hifas aparecen de color blanco cuando se crecen en medio sólido debido a que fallan en producir el pigmento policétido gris asociado con las esporas maduras, de ahí el término *whi* (white) (Flärdh y Buttner, 2009).

Mediante estudios de la esporulación de *S.coelicolor* se han identificado 7 de los locus de *whi* (*whiA,B,D,E,G,H,I*) (Chater, 1972). Dentro de estos genes, *WhiG* es el que da inicio a toda la cascada de señalización para la formación de las esporas. Este gen codifica para un factor sigma involucrado en la decisión de esporulación de las hifas aéreas y en su ausencia las colonias desarrollan largas y delgadas hifas que fallan completamente al esporular (Chater, 1972).

La RNA polimerasa que contiene este factor sigma *Whig* activa directamente 2 genes regulatorios involucrados en etapas tardías de esporulación: *whiH*, el cual induce a un promotor necesario para que se lleve a cabo la septación de las hifas aéreas (Ryding et al., 1998); y *whiI*, el cual es un regulador de respuesta necesario para la septación (Ainsa et al., 1999). Ortólogos de *whig* están presentes en *B.subtilis* y en diversas Actinobacterias, aunque se encuentran ausentes en Actinomicetes cuya esporulación no involucra la formación de cadenas de esporas de largas hifas aéreas (Chandra y Chater, 2013).

Otro gen *whi* importante es *whib*, el cual codifica para un factor de transcripción fundamental para la esporulación y constituye una de las proteínas características de Actinobacterias que forman hifas aéreas de esporulación. Se trata de un gen que se agrupa dentro de la familia de pequeñas proteínas *Wbl*, las cuales se caracterizan por poseer un cluster sensitivo a oxígeno, capaz de sensor cambios REDOX (Chandra y Chater, 2013, Molle et al. 2000). *Whib* es necesaria para detener la extensión de las hifas aéreas y comenzar así la septación, se ha visto que su blanco es la proteína *dpsA*, la cual está

asociada al nucleóide formando largo complejos cristalinos nucleoproteicos con el ADN, protegiéndolo en situaciones de estrés para preservar así el genoma (Molle et al. 2000).

Con base en estos antecedentes de genes característicos de *Streptomyces*, me propuse desarrollar un método rápido de identificación de *S.mobaraensis* que consiste principalmente en la amplificación y secuenciación de los genes whig, whib, bldA, ciclotiazomicina y 16S rRNA. Este proyecto de identificación surge a partir del hecho de que han habido varios casos de contaminación con otras especies bacterianas en el laboratorio. Esto ha impedido que se lleve a cabo el cultivo de *S.mobaraensis* ATCC29032, el cual es fundamental para estudiar la producción del péptido antibiótico ciclotiazomicina.

El emplear la secuencia del gen 16S rRNA sobre los otros genes es de gran relevancia puesto que los genes marcadores whig, whib y bldA utilizados no son especie específicos y se encuentran ampliamente distribuidos en los *Streptomyces*. De manera que el gen 16S rRNA es aquel con mayor poder discriminatorio para llevar a cabo la identificación de *S.mobaraensis*. Asimismo, la secuenciación del gen que codifica para el antibiótico ciclotiazomicina es de gran relevancia al ser el único gen que nos permitiría identificar la cepa bacteriana de *S.mobaraensis*.

PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿Cómo identificar a *S.mobaraensis* de otras especies bacterianas en el laboratorio en caso de contaminación?

HIPÓTESIS

Si se amplifican, secuencian y analizan en la bases de datos de BLAST los genes: 16S rRNA, whib, whig, bldA y ciclotiazomicina, entonces se podrá llevar a cabo una rápida y correcta identificación de ésta bacteria, caracterizándola molecularmente con base en estos genes.

OBJETIVO GENERAL

- * Desarrollar un método de identificación de *S.mobaraensis* mediante la amplificación y secuenciación del gen 16S rRNA y de los genes marcadores: whig, whib, bldA y ciclitolizomicina.

OBJETIVOS PARTICULARES

- * Amplificar mediante PCR el gen ribosomal 16S de 2 especies bacterianas: *B.cereus* y *S.mobaraensis*.
- * Amplificar mediante PCR los genes marcadores de *Streptomyces*: whig, whib y bldA, utilizando a *B.cereus* ATCC14579 como control negativo.
- * Secuenciar los amplicones y llevar a cabo un alineamiento de las secuencias mediante los programas FinchTv y Seaview.
- * Realizar un BLAST de las secuencias de los genes marcadores y de los genes ribosomales 16S de *B.cereus* ATCC14579 y *S.mobaraensis*.

MÉTODO

Cultivo de *S.mobaraensis* ATCC29032 y *B.cereus* ATCC14579

Se inocularon 50 µl de un glicerol de esporas de *S.mobaraensis* en un matraz bafleado de 250 ml con 50 ml de medio SFM (20 g/L D-mannitol, 20 g/L de harina de soya marca Bob's Red Mill). Se incubó el matraz a 30°C, a 200 rpm, durante 36 horas de acuerdo al procedimiento descrito por Kiefer y colaboradores en el 2000.

Para el cultivo de *B.cereus*, se emplearon 5 ml de medio LB líquido (10 g /L Bacto Triptona, 5g/L extracto de levadura , 10g/L NaCl). Se dejó incubando a 30°C, a 200 rpm, durante 6 horas de acuerdo al procedimiento descrito por Moore y colaboradores en 2004.

Extracción de ADN genómico de *S.mobaraensis* y *Bacillus cereus*

Para extraer el ADN genómico de *S.mobaraensis* se realizó el procedimiento descrito por Kiefer y colaboradores en el 2000. Para consultar el protocolo revisar el **ANEXO 1**.

Para extraer el ADN genómico de *B.cereus* ATCC14579 se empleó el protocolo descrito por Moore y colaboradores en 2004. Para la descripción del protocolo consultar **ANEXO 2**.

Amplificación del gen 16S rRNA

Para la amplificación del gen 16S rRNA se utilizaron oligonucleótidos universales 16S previamente reportados en la literatura. El oligonucleótido forward denominado 27F se deriva de Lane et al. 1991 y corresponde a la secuencia nucleotídica: 5'AGAGTTTGATCATGGCTCA3'. Por otro lado, el oligonucleótido reverse denominado 1492 Rv se deriva de Turner et al. 1999 y corresponde a la secuencia: 5'GGTTACCTTGTTACGACTT3'.

El amplicón resultante fue de aproximadamente 1500 pb. y el programa de PCR para la amplificación del gen 16S rRNA se muestra en la **Tabla 3**.

Tabla 3. Programa de PCR para la amplificación del gen 16s rRNA de *S.mobaraensis* y *B.cereus* ATCC14579. Para determinar la temperatura óptima de alineamiento, se realizó el siguiente gradiente de temperaturas: 50, 51 y 52 °C.

| PROGRAMA PCR | TEMPERATURA (°C) | TIEMPO | # DE CICLOS |
|-------------------|------------------|-------------|-------------|
| desnaturalización | 95 | 10 minutos | 1X |
| | 95 | 30 segundos | 25X |
| alineamiento | 50, 51, 52 | 45 segundos | 25X |
| extensión | 72 | 2 minutos | 25X |
| | 72 | 5 minutos | 1X |

Para la reacción de PCR se utilizaron las siguientes concentraciones finales de los reactivos en un volumen final de 50 µl: 20 ng de ADN genómico de *S.mobaraensis* o de *B.cereus* ATCC14579, 2.5 mM de MgCl₂ (Thermo Scientific, E.U.A, 25 mM LOT. 00097122), Taq Buffer con KCl 1X (Thermo Scientific, E.U.A, 10X), 2 mM de dNTPs (Thermo Scientific, E.U.A, 20 mM #R1121), 1U de Taq DNA polimerasa recombinante (Thermo Scientific, E.U.A .1 U/µl, 500 U, #EP0404) y 20 pm de cada oligonucleótido forward y reverse cuyo proveedor fue la Unidad de Secuenciación del Instituto de Biotecnología de la UNAM, Cuernavaca Morelos, México.

Para estimar el número de copias del gen 16S rRNA que poseen *S.mobaraensis* y *B.cereus*, se usó el programa rrnDB del Centro para Sistemas Microbianos de la Universidad de Michigan que se encuentra disponible en la página web: https://rrndb.umms.med.umich.edu/estimate/run_classifier.

Diseño de oligonucleótidos para amplificar los genes marcadores: ciclotiazomicina, bldA, whig y whib.

Para obtener las secuencias nucleotídicas de los genes marcadores bldA, whib y whig de *S.mobaraensis*, se buscaron las proteínas WhiB y WhiG en la base de datos de NCBI para verificar que éstas estuvieran anotadas en el genoma de la bacteria.

WhiB se localizó como una familia de factores transcripcionales (#Acceso: WP_004955645.1, GI: 491094038) y WhiG como un factor sigma de la RNA polimerasa (# Acceso: WP_004944820.1 GI: 491083206).

Habiendo identificado las secuencias de aminoácidos de estos genes se descargó el genoma completo de *S.mobaraensis* de la página de NCBI en formato GenBank (RefSeq: NZ_AORZ000000000.1) y mediante el uso del software readseq versión 2.1.30 de la Universidad de Indiana, E.U.A, que se puede descargar en la página web: <http://www.mybiosoftware.com/readseq-2-1-30-read-reformat-biosequences.html>, se obtuvieron las secuencias nucleotídicas de los dos genes whi, poniendo como formato de salida FASTA para que el programa nos diera la secuencia de los genes en este formato. Las secuencias aminoacídicas y nucleotídicas que se obtuvieron de whig y whib se pueden ver en el **ANEXO 3**.

El gen bldA en *S.mobaraensis* no se había reportado, por lo que se buscó un ortólogo en otra especie de *Streptomyces* llamada *S. fulvissimus*.

Se descargó la secuencia proteica del ortólogo Blda de *S. fulvissimus* y se buscó esa proteína en el genoma de *S. mobaraensis* mediante el programa exonerate 2.2.0 con el fin de alinear la secuencia proteica del ortólogo en el genoma completo de *S.mobaraensis* y obtener su secuencia nucleotídica. Este programa fue creado por el Instituto de Bioinformática Europea (EMBL-EBI) y se puede descargar en la página web: <https://www.ebi.ac.uk/about/vertebrate-genomics/software/>.

Una vez obtenidas las secuencias de los tres genes marcadores se prosiguió a diseñar los oligonucleótidos que amplificaran estos genes mediante el uso del programa Primer3 versión 0.4.0 del Instituto Médico Howard Hughes, E.U.A. (<http://bioinfo.ut.ee/primer3->

0.4.0/primer3/). Se utilizó también el programa Oligo Analyzer de la compañía estadounidense Integrated DNA Technologies (<https://www.idtdna.com/calc/analyzer>) para verificar que los oligonucleótidos elegidos no formaran dímeros y horquillas. Los amplicones resultantes son los siguientes: whig (955 pb), whib (182 pb) y bldA (806 pb).

Las secuencias nucleotídicas de los genes marcadores whig, whib y bldA que se utilizaron para el diseño de los oligonucleótidos se muestran en el **ANEXO 6** y los oligonucleótidos usados se encuentran en la **Tabla 4**.

Tabla 4. Oligonucleótidos forward (Fw) y reverse (Rv) usados para amplificar los genes marcadores: bldA, whig y whib con su respectiva secuencia nucleotídica, Tm, longitud, porcentaje de G-C y probabilidad de formación de dímeros y horquillas.

| | SECUENCIA 5'-3' | Tm | Longitud | % GC | Formación de dímeros, horquillas |
|---------|--------------------------|------|----------|--------|-------------------------------------|
| whig-Fw | ACATCCGACAA GGAGTGAGC | 60°C | 20 nt | 55% | poco probable |
| whig-Rv | TCAGTAGCCAC CGACCTGAT | 60°C | 20 nt | 55% | poco probable |
| whib-Fw | TCAGTAGCCAC CGACCTGAT | 60°C | 20 nt | 55% | poco probable |
| whib-Rv | GACTCGGCGAA GAAGACCTC | 60°C | 20 nt | 60% | poco probable |
| bldA-Fw | AGACCAACTACG GCACCTTC | 60°C | 20 nt | 55% | poco probable |
| bldA-Rv | ACGGTGACATGA AGGACCA | 60°C | 19 nt | 52.63% | poco probable |

El programa de PCR fue el mismo que se utilizó para amplificar el gen 16S rRNA, aunque el gradiente de temperaturas empleado para hallar la temperatura óptima de alineamiento fue de: 59, 60, 61 y 62 °C.

Para obtener la secuencia nucleotídica del gen que codifica para el prepéptido ciclotiazomicina se utilizó el programa antiSMASH (antibiotics & Secondary Metabolite Analysis Shell) que se encuentra disponible en la página web <http://antismash.secondarymetabolites.org/> y que proporciona un análisis detallado de los

antibióticos y metabolitos secundarios que produce *S. mobaraensis* ATCC29032. Se descargó la secuencia del genoma completo de *S. mobaraensis* en formato FASTA a partir de la página de NCBI (RefSeq: NZ_AORZ00000000.1) y ésta secuencia se introdujo en el programa antiSMASH, encontrándose que el cluster 20 correspondía al gen de la ciclotiazomicina. Habiendo obtenido la secuencia nucleotídica mediante antiSMASH, se diseñaron los oligonucleótidos con los programas Primer3 versión 0.4.0 del Instituto Médico Howard Hughes, E.U.A. (<http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/primer3/>) y Oligo Analyzer de la compañía estadounidense Integrated DNA Technologies (<https://www.idtdna.com/calc/analyzer>). Los oligonucleótidos usados para amplificar el gen ciclotiazomicina se encuentran en la **Tabla 5**. El amplicón resultante fue de 320 pb.

Tabla 5. Oligonucleótidos forward (Fw) y reverse (Rv) usados para amplificar el gen ciclotiazomicina con su respectiva secuencia, Tm, longitud y porcentaje de GC.

| Oligonucleótido | Secuencia | Tm | Longitud | % GC |
|---------------------|------------------------|----------------|----------|--------|
| ciclotiazomicina Fw | * CACCGAACGAGAG-GAGGAC | * 59,60 y 61°C | 19 nt | 63.16% |
| ciclotiazomicina Rv | * CTCGCTGGTGGTCC TTCC | * 59,60 y 61°C | 18 nt | 66.67% |

Las concentraciones finales de los reactivos de PCR y el programa para la amplificación del gen que codifica para el péptido ciclotiazomicina fue el mismo que se utilizó para amplificar los genes: *bldA*, *whig*, *whib* y 16S rRNA, aunque en este caso se realizó otro gradiente de temperaturas para el alineamiento, el cual fue de de 59, 60 y 61 °C .

Purificación y electroforesis de los productos de PCR

Se utilizó el kit comercial: High Pure PCR Product Purification, (Roche®, Amsterdam) para la purificación por banda de los productos de PCR de los genes 16S rRNA, *whib*, *whig*, *bldA* y ciclotiazomicina. Se llevaron a cabo electroforesis en geles de agarosa al 1% teñidos con bromuro de etidio y los geles fueron visualizados mediante el uso del equipo: GEL Doc EZ Imager, marca BIORAD. Se puede consultar el protocolo para la purificación de los amplicones en la página web:

https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigmaaldrich/docs/Roche/General_Information/1/high-pure-pcr-product-purification-kit.pdf.

Secuenciación de los amplicones y análisis de las secuencias mediante BLAST: Basic Local Alignment Search Tool

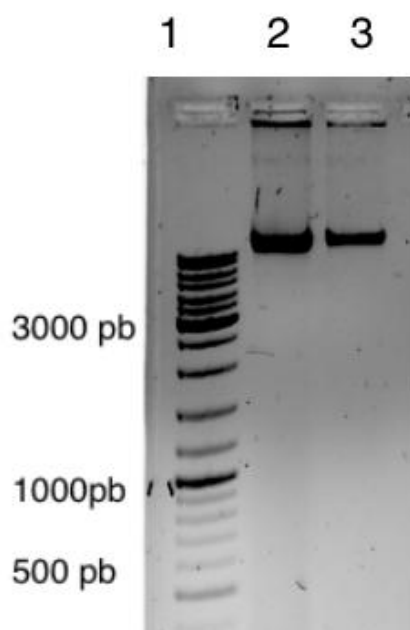
La secuenciación se realizó en la Unidad de Síntesis y Secuenciación (USSDNA) del Instituto de Biotecnología de la UNAM, Cuernavaca Morelos, México y el análisis de las secuencias se llevó a cabo mediante los programas Finch Tv desarrollado por Geospiza, Inc, Seattle E.U.A, que se puede descargar en la página web <https://digitalworldbiology.com/FinchTV>, el programa Seaview desarrollado por Gouy y colaboradores en 2010, el cual se puede descargar en la página: <http://doua.prabi.fr/software/seaview> y el programa BLAST de NCBI (Altschul et al. 1997), el cual usa un rápido algoritmo de búsqueda para identificar regiones nucleotídicas de alta similitud con una secuencia blanco. Se utilizó la versión de BLAST del Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI) que se encuentra en la página web (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>). Se realizó un BLAST de las secuencias de los genes 16S rRNA de *B.cereus* y *S.mobaraensis* para lograr discernir entre éstas dos especies bacterianas y también de cada una de las secuencias nucleotídicas de los genes marcadores (ciclotiazomicina, bldA, whig y whib) para ver si estos genes podían servir como marcadores de *S.mobaraensis* utilizando la base de datos de NCBI: refseq_genomic.

RESULTADOS

Extracción de ADN genómico de *S.mobaraensis* y *B.cereus*

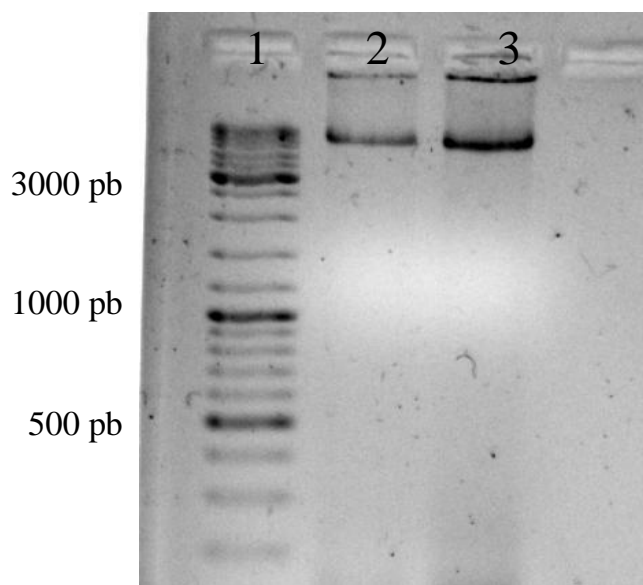
Se extrajo exitosamente el ADN genómico de *S.mobaraensis*, obteniéndose 60 ng/ μ l de ADN (Figura 4).

Figura 4. Electroforesis en gel de agarosa al 1% y tinción con bromuro de etidio del ADN genómico de *S.mobaraensis*. Carril 1: marcador de peso molecular Gene Ruler DNA Ladder Mix Thermo Scientific, E.U.A. Carril 2: 5 μ l de ADN genómico de *S.mobaraensis*. Carril 3: 3 μ l de ADN genómico de *S.mobaraensis*.



El ADN genómico de *B.cereus* ATCC14579 que sirvió como control negativo para la amplificación de los genes marcadores en este proyecto y para lograr discernir entre *S.mobaraensis* y *B.cereus* al utilizar el gen 16S rRNA, también fue extraído exitosamente (Figura 5).

Figura 5. Electroforesis en gel de agarosa al 1% y tinción con bromuro de etidio del ADN genómico de *B.cereus* ATCC14579. El carril 1 corresponde al marcador de peso molecular Gene Ruler DNA Ladder Mix Thermo Scientific, E.U.A. Carril 2: 1 μ l de ADN genómico de *B. cereus* ATCC14579. Carril 3: 2 μ l de ADN genómico de *B.cereus* ATCC14579.



Coincidencias al buscar en la base de datos de NCBI los genes marcadores

Al buscar en la base de datos de proteínas de NCBI a WhiG y WhiB, se encontró que éstas ya estaban anotadas en el genoma de *S. mobaraensis*.

Hubo 13 coincidencias al buscar en NCBI a WhiB de *S.mobaraensis*, identificándolo como una familia de factores transcripcionales, función que ya se había reportado previamente en la literatura (Chandra y Chater, 2008). Se puede acceder a la secuencia mediante la página web de NCBI: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov>, usando como referencia el siguiente número de acceso: WP_004955645.1.

En el caso de WhiG hubo 2 coincidencias al buscar en NCBI. Se identificó como un factor sigma de RNA polimerasa, tal y como se esperaba debido a que en la literatura ya estaba reportada su función (Chandra y Chater, 2008). Para mayor información, el número de acceso de NCBI de la secuencia es el siguiente: WP_004944820.1.

La búsqueda en NCBI del gen *bldA* de *S.mobaraensis* no dio resultados puesto que este gen no se encontraba anotado en el genoma. Sin embargo, al buscar en NCBI el gen

bldA, este se encontró en otra especie de *Streptomyces* llamada *S. fulvissimus* (**Figura 6**) y debido a que se trataba del mismo género: *Streptomyces* y a que era un RNA de transferencia al igual que el bldA que se buscaba en *Streptomyces mobaraensis*, se prosiguió a descargar la secuencia proteica del ortólogo *S. fulvissimus* (WP_015608996) y a buscar esa proteína en el genoma de *S. mobaraensis*.

Figura 6. Coincidencia en NCBI al buscar el gen bldA. Corresponde a un RNA de transferencia en *S. fulvissimus* (# de referencia de la secuencia de NCBI: WP_015608996).

transfer RNA-Leu (bldA) [*Streptomyces fulvissimus*]

NCBI Reference Sequence: WP_015608996.1

[Identical Proteins](#) [FASTA](#) [Graphics](#)

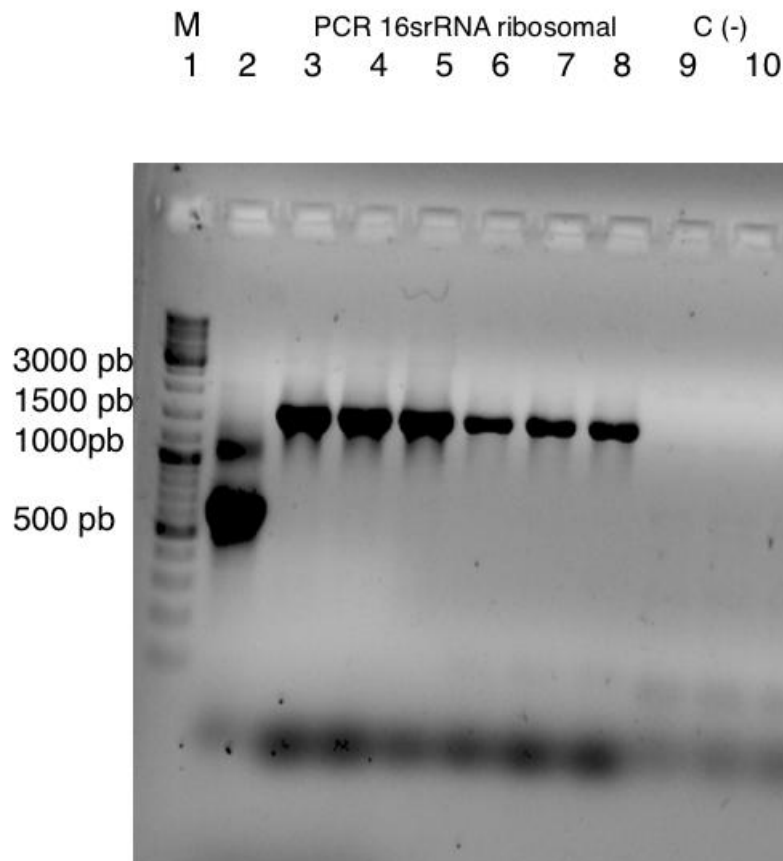
Go to:

| | | | | |
|------------|---|--------|--------|----------|
| LOCUS | WP_015608996 | 294 aa | linear | BCT 05-J |
| DEFINITION | transfer RNA-Leu (bldA) [<i>Streptomyces fulvissimus</i>]. | | | |
| ACCESSION | WP_015608996 | | | |
| VERSION | WP_015608996.1 GI:505421894 | | | |
| KEYWORDS | RefSeq. | | | |
| SOURCE | <i>Streptomyces fulvissimus</i> | | | |
| ORGANISM | Streptomyces fulvissimus Bacteria; Actinobacteria; Streptomycetales; Streptomycetacea Streptomyces. | | | |

Al introducir en el programa la secuencia aminoacídica de bldA del ortólogo *S. fulvissimus* y la secuencia del genoma completo de *S. mobaraensis*, el programa exonerate encontró una coincidencia para bldA en el genoma de *S. mobaraensis*, originando un alineamiento que se encuentra en el **ANEXO 4**

Habiendo realizado el alineamiento se obtuvo la secuencia nucleotídica del gen bldA mediante el programa exonerate-protein2genome y finalmente la secuencia nucleotídica obtenida a partir de protein2genome se convirtió a secuencia de aminoácidos, a la cual se le realizó un BLAST para corroborar que se produjera un alineamiento con la secuencia proteica de BldA de *S. mobaraensis*. Las secuencias aminoacídicas y nucleotídicas de bldA obtenidas a partir del programa exonerate se muestran en el **ANEXO 5**.

Al realizar el BLAST de la secuencia proteica de BldA obtenida mediante el software protein2genome, hubo 100 secuencias que produjeron alineamientos significativos. La secuencia de *S. mobaraensis* fue la que tuvo el mayor puntaje de alineamiento en la base de datos, lo cual fue satisfactorio debido a que este alineamiento nos corroboró que efectivamente se trataba de la secuencia del gen bldA de *S. mobaraensis*, la cual aparecía co-



La amplificación del gen 16S rRNA tanto en *B.cereus* como en *S.mobaraensis* fue exitosa bajo las condiciones mencionadas anteriormente con los oligonucleótidos universales 27F y 1492 R. Sin embargo se puede observar una mayor amplificación del gen ribosomal 16S de *B.cereus* que de *S.mobaraensis*. Farrelly Vincent et al. en 1995 reportan radios de productos de PCR del gen 16s rRNA de varias especies bacterianas que correlacionan con el número de copias del gen ribosomal 16S, el cual puede variar de 1 a 15 en las bacterias. Asimismo, May Ping Lee et al. en 2008 reporta la existencia de una base de datos llamada Ribosomal RNA Database (rrnDB), la cual contiene información del número de copias del gen 16S rRNA que poseen las bacterias. Al buscar en este programa el número de copias del gen 16S rRNA de las bacterias empleadas en este proyecto, se encontró que *B.cereus* posee 14 copias mientras que *S.mobarensis* posee aproximadamente 6 copias, lo cual nos sugiere que posiblemente hubo una mayor amplificación del gen 16S rRNA en *B.cereus* debido a que ésta posee un mayor número de copias.

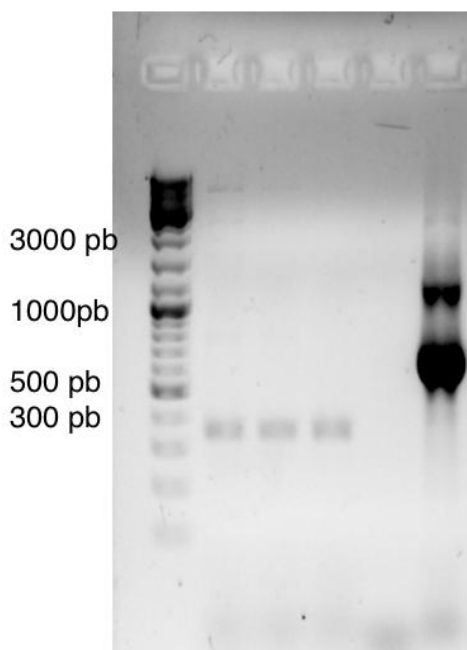
Amplificación del gen ciclotiazomicina

El programa antiSMASH (<http://antismash.secondarymetabolites.org>) permitió obtener la secuencia nucleotídica del gen marcador ciclotiazomicina.

Para su amplificación se realizó un gradiente de 3 temperaturas (59, 60, 61°C). El gen era amplificado exitosamente en las 3 temperaturas anteriores y el amplicón resultante fue de 320 pb. (**Figura 9**). Como se esperaba no hubo amplificación en *B.cereus* ATCC14579 debido a que ésta bacteria no produce el péptido antibiótico ciclotiazomicina, sino que produce otro tiopéptido llamado tiocilina.

Figura 9. Electroforesis en gel de agarosa 1% y tinción con bromuro de etidio: PCR ciclotiazomicina (320 pb). Carriles: 1-M= marcador de peso molecular Gene Ruler DNA Ladder Mix Thermo Scientific, E.U.A, 2- PCR ciclotiazomicina, Tm: 59°C, 3- PCR ciclotiazomicina, Tm: 60°C, 4-PCR ciclotiazomicina, Tm: 61°C, 5- control (-) *B.cereus* ATCC14579, 6- control (+) PCR: 700 pb.

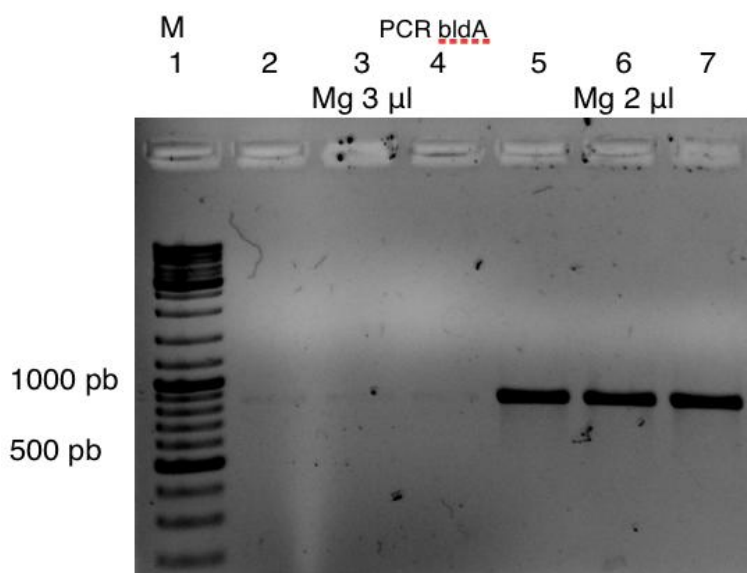
| M | PCR ciclotiazomicina - | | | + | |
|---|------------------------|-----|-----|---|---|
| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 |
| | 59° | 60° | 61° | - | + |



Amplificación del gen *bldA*

Para la amplificación del gen *bldA* se realizó un gradiente de 3 temperaturas (59, 60, 61°C). El amplicón resultante fue de 806 pb. y el gen *bldA* era amplificado exitosamente en las tres temperaturas (59, 60, 61°C) (**Figura 10**) Cabe destacar que la concentración de MgCl₂ en la reacción de PCR fue determinante para la amplificación, siendo la concentración final óptima de MgCl₂ de 2.5 mM.

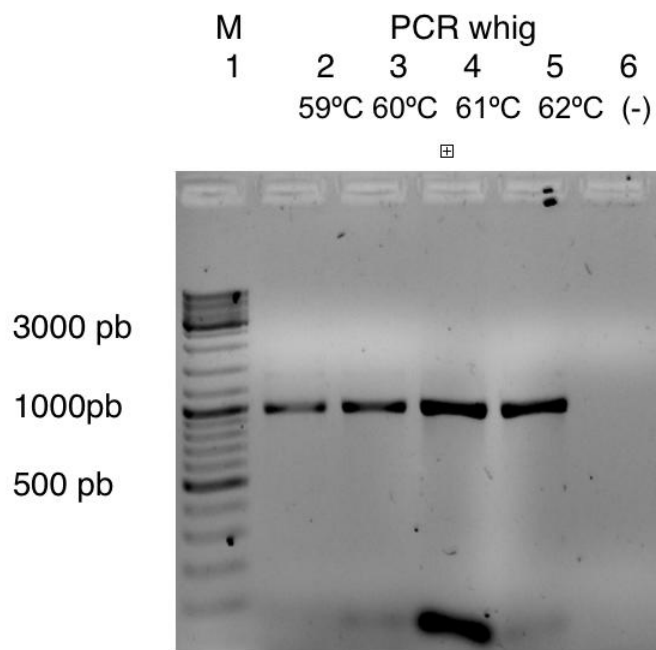
Figura 10. Electroforesis en gel de agarosa 1% y tinción con bromuro de etidio: PCR *bldA* (806 pb). Carriles: 1- M= marcador de peso molecular, 2- PCR *bldA* 7.5 mM MgCl₂ Tm: 59°C, 3- PCR *bldA* 7.5 mM MgCl₂ Tm: 60°C, 4-PCR *bldA* 7.5mM MgCl₂ Tm: 61°C, 5-PCR *bldA* 2.5 mM MgCl₂ Tm: 59°C, 6-PCR *bldA* 2.5 mM MgCl₂ Tm: 60°C, 7-PCR *bldA* 2.5 mM MgCl₂ Tm: 61°C.



Amplificación de los genes *whig* y *whib*

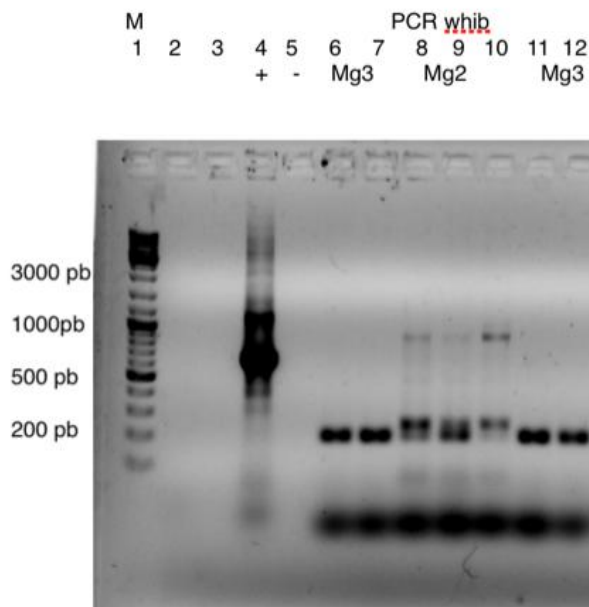
Para la amplificación de *whig* se realizó un gradiente de 4 temperaturas (59, 60, 61, 62 °C). El gen era amplificado a éstas cuatro temperaturas de alineamiento y el total de la región amplificada corresponde a 955 pb. Como se esperaba, no hubo amplificación de *whig* en *B.cereus* ATCC14579 debido a que el gen es característico de Actinobacterias que forman hifas aéreas de esporulación (**Figura 11**).

Figura 11. Electroforesis en gel de agarosa al 1% y tinción con bromuro de etidio. Amplificación del gen whig (955 pb). El carril 1 corresponde al marcador de peso molecular, los carriles 2,3,4 y 5 corresponden a 5 µl del PCR de whig a 4 temperaturas diferentes de alineamiento: 59, 60, 61 y 62 °C respectivamente. El carril 6 es el PCR de whig en *B.cereus* ATCC14579 (control negativo).



Para la amplificación de whib se realizó un gradiente de 3 temperaturas (59, 60, 61°C). El gen whib era amplificado exitosamente en éstas temperaturas a una concentración final de magnesio de 7.5 mM. El amplicón resultante corresponde a 182 pb y tampoco hubo amplificación de whib en *B.cereus* ATCC14579, corroborando que es un gen exclusivo de Actinobacterias. **(Figura 12).**

Figura 12. Electroforesis en gel de agarosa 1% y tinción con bromuro de etidio: PCR whib (182 pb). Carriles: 1- marcador de peso molecular, 2 y 3- carriles vacíos, 4- control (+) reacción PCR: 700 pb, 5- control (-) *B.cereus* ATCC14579, 6- PCR whib (182 pb) Tm: 59°C, 7.5 mM MgCl₂, 20 ng ADN, 7- PCR whib (182 pb) Tm: 60°C, 7.5 mM MgCl₂, 20 ng ADN, 8-PCR whib (182 pb) Tm: 59°C, 2.5 mM MgCl₂, 20 ng ADN, 9-PCR whib (182 pb) Tm: 60°C, 2.5 mM MgCl₂, 20 ng ADN, 10-PCR whib (201 pb) Tm: 61°C, 2.5 mM MgCl₂, 20 ng ADN, 11-PCR whib (201 pb) Tm: 59°C, 7.5 mM MgCl₂ (25mM), 50 ng ADN, 12-PCR whib (201 pb) Tm: 60°C, 7.5 mM MgCl₂, 50 ng DNA.



De ésta manera, para realizar la amplificación del gen whib (182 pb) se realizaron gradientes de temperatura (59, 60, 61°C), gradientes de MgCl₂ (2.5 y 7.5 mM) y se probaron también 2 concentraciones diferentes de DNA genómico: 20 y 50 ng. El gen whib era amplificado tanto a 59 como a 60°C utilizando una concentración de ADN genómico tanto de 20 como de 50 ng a una concentración final de MgCl₂ de 7.5 mM.

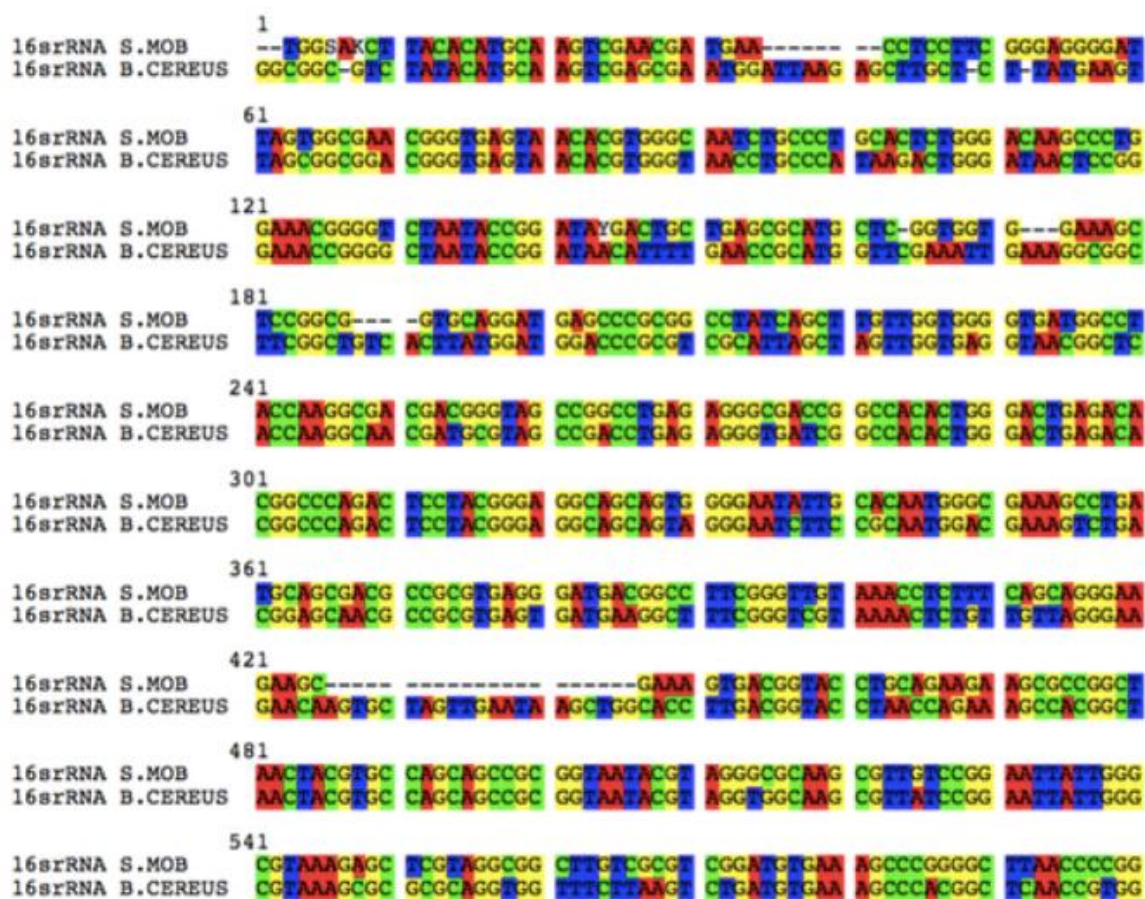
Secuenciación de los genes marcadores

La secuenciación de los amplicones del gen 16S rRNA y de los genes marcadores permitió llevar a cabo los alineamientos de las secuencias producto de la secuenciación con las secuencias de los genes que se encuentran anotadas en las bases de datos. En todos los casos hubo un alineamiento perfecto, lo cual nos corroboró a nivel de secuencia nucleotídica que efectivamente se trataba de los genes: 16S rRNA, ciclotiazomicina, bldA, whig y whib. Los cromatogramas correspondientes muestran picos claros de cada una de las bases nucleotídicas, lo cual demuestra que la secuenciación fue exitosa. En el **ANEXO 7** se encuentran los alineamientos y cromatogramas correspondientes del gen 16S rRNA y de cada uno de los genes marcadores, en donde cada base nucleotídica está representada con un código de color: citosina-verde, guanina-amarillo, adenina-rojo y timina-azul .

Las secuencias obtenidas a partir de la secuenciación del gen 16S rRNA de las dos especies bacterianas: *S.mobaraensis* y *B.cereus* ATCC14579 fueron comparadas mediante el programa Seaview. En el alineamiento que se muestra a continuación (**Figura 13**) se puede observar que las secuencias del gen 16S rRNA son muy diferentes en ciertas regiones. Sin embargo, se puede ver que existe un alineamiento perfecto entre ambas secuencias en otras regiones que corresponden a las regiones conservadas del gen ribo-

somal 16S. Las variaciones en las secuencias nucleotídicas de los genes ribosomales 16S de las 2 especies bacterianas corresponden a las regiones hipervariables, las cuales nos permitieron distinguir entre *Bacillus cereus* y *Streptomyce mobaraensis*.

Figura 13: Alineamiento comparado de las secuencias obtenidas a partir de la secuenciación del gen 16S rRNA de *B.cereus* ATCC14579 y *S.mobaraensis* con los oligonucleótidos universales 27F y 1492 R. Se pueden visualizar regiones conservadas e hipervariables del gen ribosomal 16S.



| | | |
|------------------|-------------|-------------|
| | 601 | |
| 16srRNA S.MOB | GTCGCAATTC | GATACGGGCA |
| 16srRNA B.CEREUS | AGGGCAATTC | GAAACGGGA |
| | 661 | |
| 16srRNA S.MOB | CGGTGAAATG | CGCAGATAAC |
| 16srRNA B.CEREUS | CGGTGAAATG | CGTAGAGATA |
| | 721 | |
| 16srRNA S.MOB | ACTGACGCTG | AGGAGCGAAA |
| 16srRNA B.CEREUS | ACTGACGCTG | AGGCGCGAAA |
| | 781 | |
| 16srRNA S.MOB | GCCGTAAACG | TGGGAACATA |
| 16srRNA B.CEREUS | GCCGTAAACG | ATGAGTACTA |
| | 841 | |
| 16srRNA S.MOB | GCAATTAAGT | CCCCGCCCTGG |
| 16srRNA B.CEREUS | GCAATTAAGCA | CCCCGCCCTGG |
| | 901 | |
| 16srRNA S.MOB | GGGCCCGCAC | AAGCAGCGGA |
| 16srRNA B.CEREUS | GGGCCCGCAC | AAGCGGTGGA |
| | 961 | |
| 16srRNA S.MOB | AGGCTTGACA | TACACCGGAA |
| 16srRNA B.CEREUS | GGTCTTGACA | TCCCTTGAAA |
| | 1021 | |
| 16srRNA S.MOB | GTTGGTGCATG | GCTGTCGTCA |
| 16srRNA B.CEREUS | GTTGGTGCATG | G-TGTGTGCA |

Análisis de las secuencias mediante BLAST

La secuenciación de los genes marcadores permitió realizar un análisis en la base de datos de BLAST. Esto con la finalidad de ver si estos genes realmente podrían servir como marcadores de *S.mobaraensis*.

BLAST encontró regiones de similitud al comparar las secuencias nucleotídicas de los genes marcadores con las bases de datos. El programa nos proporcionó tablas de descripciones que muestran las secuencias de la base de datos identificadas por BLAST que fueron similares a la secuencia blanco (query) y nos otorgó una serie de puntajes para evaluar el alineamiento:

* el porcentaje que se cubrió de la secuencia blanco (query) por el alineamiento con la secuencia de la base de datos (Query cover).

* el mejor valor esperado de todos los alineamientos de la base de datos (E value), el cual es un parámetro que describe el número de resultados que uno puede esperar al buscar en una base de datos de un tamaño particular. Entre más bajo o más cercano a 0 es el valor e, más significativo es el alineamiento.

* el mayor porcentaje de identidad de todos los alineamientos con la secuencia blanco (Max ident).

* el número de acceso de la secuencia (Accesion).

En la **Tabla 3** se muestran las secuencias que obtuvieron los mejores porcentajes de alineamiento de BLAST.

Tabla 3. Secuencias identificadas por BLAST que tuvieron el mayor porcentaje de similitud a las secuencias blanco (query) de los genes marcadores: 16S rRNA, ciclotiazomicina, bldA, whig y whib. Se muestra el organismo, el número de acceso, el porcentaje de identidad, el porcentaje de cubrimiento de la secuencia blanco y el valor e esperado.

| GEN | Organismo | # ACCESO | % IDENTIDAD | %CUBRIMIENTO DE SECUENCIA | VALOR e ESPERADO |
|-------------------------|--|-----------------------|-------------|---------------------------|------------------|
| 16S rRNA | <i>Bacillus cereus</i> CC2H2L | KP940382.1 | 99 | 97 | 0 |
| | <i>Streptomyces mobaraensis</i> NRRL B-3729 | NRL_043830 .1 | 99 | 98 | 0 |
| Ciclotiazomicina | <i>S.hygroscopicus</i> cepa 10-22 | FJ472825.1 | 90 | 88 | 8E-53 |
| bldA | <i>Streptomyces mobaraensis</i> NBRC-13829 | NZ_AORZ01 000104 | 99 | 98 | 0 |
| whig | <i>S.mobaraensis</i> DSM40487 | NZ_AORZ01 000033.1 | 99 | 98 | 0 |
| whib | <i>S.mobaraensis</i> DSM40487 | NZ_AORZ01 000033.1 | 98 | 96 | 3E-52 |

El análisis del gen 16S rRNA en la bases de datos de BLAST produjo los alineamientos más significativos con las secuencias de los genes 16S rRNA de *Bacillus cereus* y de *S.mobaraensis*, lo cual nos corrobora la gran utilidad de este marcador molecular para llevar a cabo identificaciones bacterianas.

La ciclotiazomicina obtuvo el mayor porcentaje de alineamiento con *S.hygroscopicus* y no con *S.mobaraensis* debido a que este gen no se encuentra anotado aún en el genoma de

S.mobaraensis. El análisis de las secuencias de los genes *bldA*, *whig* y *whib* en BLAST, nos mostró que los alineamientos más significativos eran con *S.mobaraensis* y no con otras especies de *Streptomyces*.

DISCUSIÓN

El uso del gen ribosomal 16S ha revolucionado nuestra clasificación del mundo bacteriano, permitiéndonos llevar a cabo identificaciones bacterianas precisas (Clarridge, J. et al. 2004; Woese, 1987). Una rápida y confiable identificación permanece como una de las tareas más importantes en la taxonomía y en cualquier laboratorio. El que haya habido en el laboratorio casos de contaminación con otras especies bacterianas, nos abrió paso a desarrollar un método rápido y eficaz para identificar a *S.mobaraensis*.

En este proyecto se hizo uso de la secuencia del gen 16S rRNA para diferenciar entre dos especies bacterianas: *Streptomyces mobaraensis* y *Bacillus cereus* ATCC14579. Ambas son muy parecidas debido a que se trata de bacterias Gram positivas, aerobias, formadoras de esporas y grandes productoras de péptidos antibióticos (ciclotiazomicina en el caso de *S.mobaraensis* y tiocilina en el caso de *B.cereus*) (Chandra y Chater, 2013; Walsh, 2010).

Aunque son muy similares, la secuenciación del gen 16S rRNA nos permitió discernir entre éstas dos especies bacterianas gracias a su amplificación con oligonucleótidos universales, su posterior secuenciación y análisis en las bases de datos, lo cual nos permitió distinguir a nivel de especie y de género. Se encontró que aunque el gen es muy útil para llevar a cabo identificaciones bacterianas, no logra diferenciar a nivel de cepa.

El identificar que se trata de la cepa ATCC29032 de *S.mobaraensis* resulta de gran importancia puesto que ésta cepa es la productora del péptido antibiótico ciclotiazomicina (<https://antismash.secondarymetabolites.org>). En el laboratorio solamente se han dado casos de contaminación con otras especies bacterianas, sin embargo en un escenario de contaminación con cepas de su misma especie, la secuenciación del gen ciclotiazomicina es la única que tendría suficiente poder discriminatorio para discernir entre la cepa bacteriana con la que se está trabajando, al ser un gen marcador exclusivo de *S.mobaraensis* ATCC29032.

La ciclotiazomicina es un antibiótico que podría tener aplicaciones prometedoras al poseer actividad antifúngica e inhibitoria de la enzima renina que causa hipertensión (Baringo

et al.2014). En este proyecto, la amplificación del gen que codifica para la ciclotiazomicina abre paso a futuras investigaciones en el laboratorio sobre relaciones estructura-función para lograr una mejor comprensión de este antibiótico, el cual no ha ido a pruebas clínicas debido a su baja solubilidad como es el caso de la mayoría de los tiopéptidos (Walsh et al. 2010).

Por otro lado, se encontró que los genes que se han reportado como marcadores de Actinobacterias: los genes whig, whib y bldA (Flärdh and Buttner, 2009, Hopwood, 1967; Merrick, 1976; Chandra y Chater, 2008) podrían fungir como marcadores útiles de *S.mobaraensis*, puesto que aunque se encuentran ampliamente distribuidos en las Actinobacterias, los alineamientos más significativos de BLAST se produjeron con ésta especie bacteriana y no con las otras especies de *Streptomyces*.

De ésta manera, el uso del gen 16S rRNA, de genes marcadores del phylum Actinobacteria al cual pertenece *S.mobaraensis*: whig, whib y bldA y de un gen exclusivo de ésta especie bacteriana: la ciclotiazomicina, nos permitieron llevar a cabo la identificación de *S.mobaraensis* y caracterizarla por la presencia de estos genes marcadores. El uso de las bases de datos fue fundamental y quisiera destacar su utilidad en almacenar todo el conocimiento científico emergente. Estamos ante una era que ha tenido un desarrollo explosivo en la aplicación de técnicas moleculares y en el uso de las bases de datos. El que una cantidad inmensa de organismos se encuentren secuenciados como fue el caso de *S.mobaraensis*, ha permitido el desarrollo de numerosas investigaciones y en este caso la secuenciación de los genes marcadores nos permitió identificar de manera precisa a una bacteria en particular.

CONCLUSIONES

La secuenciación del gen ribosomal 16S nos permitió distinguir a nivel de especie y género entre *Bacillus cereus* y *S.mobaraensis*. Se encontró que no puede diferenciar mas allá de este nivel, puesto que no se logró distinguir la cepa bacteriana con la cual se trabajó en este proyecto. Para ello, el uso del gen que codifica para el péptido antibiótico complementa el análisis al ser este un gen verdaderamente exclusivo de la cepa bacteriana utilizada en este proyecto: *S.mobaraensis* ATCC29032.

Asimismo, se vio que los genes *whig*, *whib* y *bldA* podrían fungir como marcadores de *S. mobaraensis* puesto que los alineamientos más significativos se dieron con ésta especie y no con los otros *Streptomyces*. La amplificación de estos genes en *Bacillus cereus* ATCC14579 sirvió como control negativo y nos demostró que estos eran característicos de *Streptomyces* puesto que no había amplificación en *B.cereus*.

La metodología empleada nos permite identificar rápida y eficazmente a *S.mobaraensis*, mediante el uso de marcadores moleculares, en donde el uso de bases de datos y de programas bioinformáticos resulta fundamental.

BIBLIOGRAFIA

- * Ainsa et al. (1999) A response regulator-like protein that functions at an intermediate stage of sporulation in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Mol Microbiol* 34: 607–619.
- * Altschul, S.F. et al. (1990) Basic local alignment search tool *J. Mol. Biol.* 215:403-410.
- * Aoki M. et al. (1991). Cyclothiazomycin: a novel polythiazole containing peptide with renin inhibitory activity. *The Journal of Antibiotics*. pp. 582-588.
- * Bagley et al. (2005) Thiipeptide Antibiotics. *Chemical Reviews*. pp. 685–714
- * Baker, G.C et al. (2003) Review and re-analysis of domain-specific 16S primers. *Journal of Microbiological Methods*. Volume 55, Issue 3 , pp. 541-555.
- * Bhat, U.G. et al. (2009) Thiazole antibiotics target FoxM1 and induce apoptosis in human cancer cells. *PLoS One*.
- * Barnizo J. et al. (2014) Thiopeptide antibiotics: Retrospective and recent advances. *Journal of Marine Drugs*. 317-351.
- * Brosius, J et al. (1978) Complete nucleotide sequence of a 16S ribosomal RNA gene from *Escherichia coli*. *Biochemistry*, Vol. 75, No. 10, pp 4801-4805.
- * Chakravorty et al. (2007). A detailed analysis of 16S ribosomal RNA gene segments for the diagnosis of pathogenic bacteria. *J Microbiol Methods*. 330-339.
- * Chandra y Chater (2014). Developmental biology of *Streptomyces* from the perspective of 100 actinobacterial genome sequences. *FEMS Microbiology Reviews*. 345-379.
- * Chater y Chandra (2006) *Streptomyces* inside-out: a new perspective on the bacteria that provide us with antibiotics. *Philosophical Transactions of the Royal Society B*. 761-8.

- * Chater y Chandra (2006). The evolution of development in *Streptomyces* analysed by genome comparisons. *FEMS Microbiology Reviews*. 651-672.
- * Chater & Losick, (1996). The mycelial life-style of *Streptomyces coelicolor* A3(2) and its relatives. In *Bacteria as Multicellular Organisms*. Oxford University Press (in press).
- * Clarridge J. et al. (2004). Impact of 16S rRNA gene sequence analysis for identification of bacteria on clinical microbiology and infectious diseases. *Clin. Microbiol. Rev.* 840-862.
- * Dubnau et al. (1965) Gene conservation in *Bacillus* species. I. Conserved genetic and nucleic acid base sequence homologies. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 54:491–498.
- * Elliot et al. (2001) BldD is a direct regulator of key developmental genes in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Molecular Microbiology*. 257-269.
- * Elliot et al. (2008) Multicellular Development in *Streptomyces*. *American Society for Microbiology*. 419-439.
- * Embley & Stackebrandt (1994). The molecular phylogeny and systematics of the actinomycetes. *Annual Review Microbiology*. Vol. 48, pp. 257-289.
- * Flärd y Buttner (2009) *Streptomyces* morphogenetics: dissecting differentiation in a filamentous bacterium. *Nature Review Microbiology*. pp.36-49.
- * Gouy M. et al. (2010) SeaView version 4 : a multiplatform graphical user interface for sequence alignment and phylogenetic tree building. *Molecular Biology and Evolution* 27(2):221-224.
- * Hengst et al. (2010) Genes essential for morphological development and antibiotic production in *Streptomyces coelicolor* are targets of BldD during vegetative growth. *Molecular Microbiology*. 361-379.
- * Hopwood, David, Chater, Keith et al. (1973) *Advances in Streptomyces coelicolor* Genetics. *Bacteriological Reviews*.371-405.
- * Kieser et al. (2000) *Practical Streptomyces Genetics*. John Innes Foundation. 613 págs.
- * Lane J. et al. (1985) Rapid determination of 16S ribosomal RNA sequences for phylogenetic analyses. *Proc Natl Acad Sci USA*. 6955–6959.
- * Lawlor et al. (1987) Pleiotropic morphological and antibiotic deficiencies result from mutations in a gene encoding a tRNA-like product in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Genes & development*. 1305-1310.
- * Leskiw et al. (1993) Accumulation of bldA-specified tRNA is temporally regulated in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Journal of Bacteriology*. 1995-2005
- * McCabe, K.M et al.(1999) Bacterial species identification after DNA amplification with a universal primer pair. *Molecular Genetics and metabolism*. Volume 66, Issue 3, pp. 205–211.
- * McCormick et al. (2012) Signals and regulators that govern *Streptomyces* development. *FEMS Microbiology Reviews*. 206-231.
- * Merrick M. (1976). A morphological and genetic mapping study of bald colony mutants of *Streptomyces coelicolor*. *Journal of General Microbiology*. 299-315.
- * Molle et al. (2000). WhiD and WhiB , Homologous Proteins Required for Different Stages of Sporulation in *Streptomyces coelicolor* A3 (2) WhiD and WhiB , Homologous Proteins Required for Different Stages of Sporulation in *Streptomyces coelicolor* A3 (2). *Journal of Bacteriology*. 1286-1295.
- * Nagai K., et al. (2003) Kamigiri K., Arao N., Suzumura K.-I., Kawano Y., Yamaoka M., Zhang H., Watanabe M., Suzuki K. YM-266183 and YM-266184, novel thiopeptide antibiotics produced by *Bacillus cereus* isolated from a marine sponge. I. Taxonomy, fermentation, isolation, physico-chemical properties and biological properties. *J. Antibiot.*; pp. 123–128.
- * Ryding NJ et al. (1998) A developmentally regulated gene encoding a repressor-like protein is essential for sporulation in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Mol Microbiol* 29: 343–357.

- * Takano et al. (2003). A rare leucine codon in *adpA* is implicated in the morphological defect of *bldA* mutants of *Streptomyces coelicolor*. *Molecular Microbiology*. 475-486.
- * Turner, S., Pryer, K.M., Miao, V.P.W., and Palmer, J.D. (1999). Investigating deep phylogenetic relationships among cyanobacteria and plastids by small subunit rRNA sequence analysis. *Journal of Eukaryotic Microbiology* 46: 327–338.
- * Walsh C., Acker M., Bowers A, et al. (2010) Thiazolyl peptide antibiotic biosynthesis: A cascade of post-translational modifications on ribosomal nascent proteins. *Journal of Biological Chemistry*. 27525-27531.
- * Wang et al. (2010) Identification and analysis of the biosynthetic gene cluster encoding the thiopeptide antibiotic cyclothiazomycin in *Streptomyces hygroscopicus* 10-22. *Applied and environmental microbiology*. 2335-2344.
- * Woese, C. R. 1987. Bacterial evolution. *Microbiol. Rev.* 51:221–271.
- * Young T. et al. (2011). Identification of the thiazolyl peptide GE37468 gene cluster from *Streptomyces* ATCC 55365 and heterologous expression in *Streptomyces lividans*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 13053-13058.
- * Zhang P. et al. (2014) Regulation of the biosynthesis of thiopeptide antibiotic cyclothiazomycin by the transcriptional regulator SHJG8833 in *Streptomyces hygroscopicus* 5008. *Journal of Microbiology*. 1379-1392.

ANEXOS

ANEXO 1: PROTOCOLO DE EXTRACCIÓN DE ADN GENÓMICO DE *S.mobaraensis*

- 1- Inocular con 50 µl de un glicerol de esporas un matraz bafleado de 250 ml con 50 ml de medio SFM (20 g/L D-mannitol, 20 g/L de harina de soya marca Bob's Red Mill). Incubar el matraz 30°C, 200 rpm, durante 36 horas.
- 2- Centrifugar el cultivo a 3000 rpm por 10 minutos. Lavar el pellet 2 veces con PBS y volver a centrifugar a 4000 rpm por 10 minutos.
- 3- Resuspender el pellet en 5 ml de buffer SET (75 mM NaCl, 25 mM EDTA pH.8, 20 mM Tris HCl pH.7.5). Adicionar 100 µl de solución de lisozima (50 mg/ml) y 50 U de Rnasa T1, incubar durante 60 minutos a 37°C.
- 4- Añadir 140 µl de solución de proteinasa K (20 mg/ml en agua), 600 µl de SDS al 10%, mezclar por inversión, incubar 2 horas a 55°C e invertir ocasionalmente.

5- Adicionar 2 ml de NaCl 5M, mezclar por inversión, dejar enfriar a 37°C y añadir 5 ml de cloroformo. Mezclar por inversión 30 minutos a 20°C. Centrifugar 20 minutos a 11000 g.

4- Transferir sobrenadante a un tubo fresco y añadir 0.6 volúmenes de isopropanol, mezclar por inversión. Centrifugar a 13000 rpm por 3 minutos, descartar isopropanol y añadir 5 ml de etanol al 70%, mezclar por inversión. Centrifugar a máxima velocidad por 1 minuto. Secar al vacío por 10 minutos para remover todo el etanol.

5- Disolver el ADN en 2 ml de buffer TE (10 mM Tris-Cl, pH 7.5, 1 mM EDTA pH. 8) previamente calentado a 55°C.

ANEXO 2: PROTOCOLO DE EXTRACCIÓN DE ADN GENÓMICO DE *B.cereus* ATCC14579

1. Crecer un cultivo de *B.cereus* en 5 ml de medio LB líquido (10 g /L Bacto Triptona, 5g/L extracto de levadura , 10g/L NaCl) sin antibiótico durante 6 horas. Eliminar el medio por centrifugación a velocidad máxima (13000 rpm) durante 10 minutos hasta tener un pellet de aproximadamente 0.1 g. (40-200 mg de DNA).

2. Resuspender el pellet en 564 µl de buffer TE (10 mM Tris-Cl, pH 7.5, 1 mM EDTA pH. 8). Añadir 10 µg de lisozima (cristalina). Mezclar por inversión e incubar 60 minutos a 37 °C.

3. Añadir 6 µl de proteinasa K (10 mg / ml) y 30 µl de SDS (20%). Mezclar por inversión e incubar a 37 °C hasta que la solución se vuelva clara y viscosa.

4. Añadir 100 µl de NaCl (5 M) y mezclar por inversión. Incubar a 65°C durante 2 minutos.

5. Añadir 80 µl de una solución CTAB/ NaCl (precalentada a 65°C) y mezclar por inversión. Incubar a 65°C durante 10 minutos. Para preparar solución CTAB/NaCl: disolver 4.1 g de NaCl en 80 ml de agua y agregar lentamente 10 g de CTAB (bromuro de hexadeciltrimetilamonio) mientras se calienta a 65°C en constante agitación. Ajustar el volumen a 100 ml con agua.

6. Extraer el ADN con 800 µl de una solución cloroformo / alcohol isoamílico (24: 1). Centrifugar a velocidad máxima 5 minutos. Pasar la fase superior (acuosa) que contiene el ADN a un tubo Eppendorf estéril.

7. Extraer nuevamente con 800 µl de una solución de fenol / cloroformo / alcohol isoamílico (25: 24: 1). Centrifugar 5 minutos a velocidad máxima (13000 rpm). Pasar la fase superior (acuosa) a un tubo Eppendorf estéril.

8. Extraer de nuevo con 800 µl de una solución cloroformo: alcohol isoamílico (24: 1). Centrifugar a velocidad máxima (13000 rpm) durante 5 minutos. Pasar la fase acuosa a un tubo Eppendorf limpio.
7. Añadir 7 volúmenes de isopropanol para precipitar los ácidos nucleicos. Mezclar por inversión hasta que el ADN aparezca como un precipitado blanco, viscoso. Dejar reposar a temperatura ambiente de 5 minutos a 1 hora hasta que vaya al fondo del tubo. Centrifugar (13000 rpm. durante 30 minutos a temperatura ambiente) y remover el isopropanol cuidadosamente.
8. Lavar el ADN con 500 µl de etanol al 70%. Mezclar por inversión y centrifugar a 13000 rpm por 30 minutos. Eliminar el sobrenadante.
9. Secar el pellet al vacío durante 5 minutos y resuspenderlo en 50 µl de buffer TE (10 mM Tris-Cl, pH 7.5, 1 mM EDTA pH. 8).

ANEXO 3: Secuencias nucleotídicas y aminoacídicas de whiG y whiB obtenidas a partir del software readseq:

whib_CDS (secuencia nucleotídica)

>NZ_AORZ01000001_38

```
gtgcacatcaaggcacacaccccgtagtagccaccgacctgatcccccgcccgtccccacggaggactccttgaccccc  
ctcgtccgctcaccgcgctcaccgacctcgacgacgcatcgagaacctcggcacccccgtgccgtgccgcacctacgac  
cccagggtcttctcgccgagtcggcgccgacgtagtagccaagtcgctctgccagacctgccgctgctgaggcctg  
cctcgccgcgcaaggaccgcccgcgagccctggggcgctctggggcggagagctcttcgtccagggcgctgctggtggcc  
gcaagcgtccccgtggtcgcccgcgaagaacccggtcgccgcatga
```

whib_aa (secuencia en aminoácidos)

>NZ_AORZ01000001_38 0

VHIKAHTPSVATDLIPPPVPTEDSLTPLAPLTALDLDLDAIENLGTPVPCRTYDPEVFFAES
PADVEYAKSLCQTCPLREACLAGAKDRREPWGWGGELFVQGVVARKRPRGRPRKN
PVAA*

whig_CDS (secuencia nucleotídica)

>NZ_AORZ01000033_2592

atgctcagcgcgcacggtgtgacacatccgacaaggagtgagcaacatatggtgcgtatgacgcgaagacggttcacggc
ggtcggggcgggcggtgacggccctggcctgtcccggggcggggacggggcgggacgccgggactcccacgga
gttccggggcggtatgggcccaccgctcgccaacatcgactggccgtcccggggctcggccgggaccggcagcgc
gaggaactcctcgccctcctggactccgccgtgaagcggcggctcaacgtcgtcctcctccagatccggccgaccgccgac
gcgttctggccgtcgcggtacgaaccgtggtccgagttcctgaccggcacgcaggggaaggacccgggctgggacccgct
ggacttcgccgtccgcgagggcgaccggcgagcctgcaactgcacggctggttaaccgctaccgcatcgccaaccaca
ccgacccccgggctcgtgccgtcccacccggcgcggaagcaccgggctgggagggtgccctacggcggggaagctcta
ctacaaccctggcctgcccagctccggcggttcgtccaggacgccatgctcgacgcggtgttccgctacgacctgacggg
gtgcacttcgacgactacttaccgctaccgggtggcggggcaggagttcgacgacgcggcggcctaccggcggtacggc
gggaagttctccgaccggggcgccctggcggcgggacaacatcgaccggctggtgcgcgagacggggcgagcgcataag
cggcgcaagaaacacgtgcggttcggggtgagcccgttcgccgtgtggcgcaataaggcgacggactcccgggggtcggg
caccggggccggcggtgcagacgtacgacgacctgtacgcggacacccggaagtgggtgcgcgagggatggatcgactac
atcgtccccaggttactggcacatcggaacgccggcggcactacgcgacgctcgtaccgtggtgggcccggaccgtg
cgcgacacccgcgtcggcctgtacatcggcgagggcgtctaccggcagggcgacccgtcacagcccggccctggcagg
accggccgaacttcccggcacctcacgcttgcggcgccatcgcgaggtgggcgggaaactctacttctccggcgga
ggtgcgcgacgaccgatcggggcgatggcgcgctggtcggggaccactacccccggcgcgcgccccggcgcgctg
a

whig_aa (secuencia en aminoácidos)

>NZ_AORZ01000033_2592 0

MLSAHGVTHPTRSEQHMVRMTRRRFTAVGAGAVTALGLFPGAGRAADAGTPTEFRGV
WAATVANIDWPSRPLGRDRQREELLALLDSAVKRRLNVLLQIRPTADAFWPSRYEPW
SEFLTGTQKDPGWDPLDFAVREAHRRSLQLHGWFNPYRIANHTDPGRLVPSHPARKH
PGWAVPYGGKLYYNPGLPDVRRFVQDAMLDVFRYDLDGVHFDDYFYPYPVAGQEFDD
AAAYRRYGGKFSDRGAWRRDNIDRLVRETGERIKRRKKHVRFGVSPFAVWRNKATDSR

GSDTRAGVQTYDDLADTRKVVREGWIDYIVPQVYWHIGNAAADYATLVPWWARTVRG
 TRVGLYIGEALYRQGDPSQPAPWQDPAELSRHLTLCRRHREVGGNVYFSARQVRDDPIG
 AMARVVGDDHYPRRARPPR*

ANEXO 4: ALINEAMIENTO DEL GEN bldA OBTENIDO A PARTIR DE PROGRAMA EXONERATE VERSIÓN 2.2.0

En el siguiente alineamiento, la secuencia de aminoácidos superior corresponde a la secuencia del ortólogo de bldA en *S.fulvissimus* y la secuencia inferior corresponde a la secuencia de *S.mobaraensis*. Las líneas representan que hubo un alineamiento entre las dos secuencias y los punto que no hubo un alineamiento en esa parte de la secuencia. Como se puede observar, existe una correlación al buscar el gen del ortólogo en el genoma de *S.mobaraensis* a partir del programa exonerate.

C4 Alignment:

Query: gi505421894refWP_015608996.1

Target: NZ_AORZ01000104.1.0.11269-14133

Model: protein2genome:bestfit

Raw score: 749

Query range: 0 -> 294

Target range: 1000 -> 1891

1 : MetArgSerSerAsnProValPheSerArgArgGlyPheSerArgAspAsnGlyHisAlaGl : 21

|||||||!|||||||!!!!!! !! ..|||:!!|||..

MetArgSerArgAsnProValPheSerArgArgGlyPheThrProGlyGlyGlyTyrAlaAs

1001 :
ATGAGGAGCAGGAACCCGGTCTTCTCGCGACGGGGTTCCTCCCGGAGGCGGCTA
CGCGAA : 1061

22 : yPheAsnAlaAlaProGlnAlaGlyAlaAlaAlaThr >>>> Target Intron 1 >> : 34

!|||||||!!!!!! !:!!|||:!!|||.!! ! 33 bp

nPheAsnAlaAlaProProSerGlySerAlaThrGln+-

1062 : CTTCAACGCGGCACCGCCGTCCGGGTCCGCGACGCAGgg..... :
1102

35 : >> GlyAlaAsnProPheAlaGlnGlyThrAlaAlaAsnProTyrAlaThrAsnProTyrA : 53

!|||:!!|||:!!||| ..! !! !!..!..||| !! !! !! !! !!

++ProAlaAspProTyrAlaGlyAsnProTyrGlyGlnProThrAsnProTyrAlaGlnG

1103 :
..agCCGGCCGACCCGTACGCGGGCAACCCGTACGGCCAGCCCACCAACCCGTACGC
GCAGG : 1190

54 : laGlnGlnGlyThrGlnProGlyAlaPro<->AlaProAlaArgThrAspAlaMetThrIle : 72

..! !!!!!! !!!!! !!!!! !!!!!!!! !!! !!!!!!!!:

lyAlaProAspLeuGlnGlnGlyMetProGlnAlaProAlaArgProGlyAlaMetThrMet

1191

:

GCGCCCCGATCTCCAGCAGGGGATGCCGCAGGCCCGGCCCGGCCGGGCGCCAT
GACGATG : 1250

73 : AspAspValValThrArgThrAlaMetThrLeuGlyThrValValValAlaAlaAlaIleAl : 93

!!!!!!!:!!!!!!!:!!!!!!! !!!!!:!!!!!!!:!! !!

AspAspValValSerArgThrAlaIleThrLeuGlyLeuValIleValAlaAlaGlyAlaAl

1251

:

GACGACGTCGTCAGCCGCACCGCCATCACGCTGGGCCTGGTGATCGTCGCGGCCGG
CGCGGC : 1313

94 : aTrpTrpAlaLeuProValAspGlnAlaAsnLeuGlyThrAlaTyrGlyValAlaIleGlyA : 114

!!!! !!!!! !!!!!:!!!!:!!!!

aTrp-----AlaLeuLysLeuProValGlyLeuGlyPheGlyA

1314 : GTGG-----GCGCTCAAGCTGCCGGTCGGCCTCGGCTTCGGTG :
1352

115 : laAlallelleGlyPheValLeuSerLeuValAsnSerPheLysArgArgProSerProPro : 134

||||:!:|||!..|||||!|||||!..||||||| !!:||||||| !!

laAlaVallleAlaMetValLeuGlyLeuValGlnSerPheLysAlaLysProSerProAla

1353

:

CCGCGGTGATCGCGATGGTGCTGGGCCTCGTCCAGTCGTTCAAGGCCAAGCCGTCC
CCGGCG : 1412

135 : LeulleLeuThrTyrAlaAlaPheGluGlyValPheLeuGlyValValSerAsnIleValSe : 155

|||||||!|||||||||||||||||:|||||||||:|||||. !:

LeulleLeuAlaTyrAlaAlaPheGluGlyLeuPheLeuGlyValleSerGlnAlaTyrAs

1413

:

CTGATCCTCGCCTACGCGGCGTTCGAGGGCCTGTTCCCTCGGTGTGATCAGCCAGGC
GTACAA : 1475

156 : rValTyrValAlaProGlyAlaAlaMetGlnAlaValLeuGlyThrMetAlaValPheAlaG : 176

! ! ||||| !||||| !|||||||||||||||||:|||||||||

n---GluValAlaLysGlyAlaProMetGlnAlaValLeuGlyThrValAlaValPheAlaG

1476

:

C---

GAGGTCGCCAAGGGCGCCCCGATGCAGGCGGTGCTGGGCACGGTGGCGGTCTTCG
CCG : 1535

177 : IyValLeulleAlaTyrArgThrGlyLeulleArgValThrArgArgPheTyrGlyPheVal : 196

|||||||:!!|||||||:!! !!:!!|||:!!|:!!:!!||||||| !!|||||||

IyValLeuPheAlaTyrArgAlaArgllelleAsnValAsnAsnArgPheTyrArgPheVal

1536 : :

GTGTGCTCTTCGCGTACCGGGCCCGGATCATCAACGTGAACAACAGGTTCTACCGCT
TCGTG : 1595

197 : MetAlaAlaAlalleGlyPheMetLeuLeuMetMetValAsnLeuLeuPheAlaValPheGI : 217

!!|||||||:!!||||||| :!:|||||:!!|||||||!!:|||||||

AlaGlyAlaAlalleGlyPheLeuLeuLeuGlyValValAsnMetLeuPheAlaAlaPheGI

1596 : :

GCCGGTGCCGCGATCGGCTTCCTGCTGCTGGGCGTCGTCAACATGCTGTTCGCCGC
CTTCGG : 1658

218 : yGlyGlyAspGlyLeuGlyPheArgSerGlyAlaLeuGlyValValPheGlylleValAlal : 238

||||||:!!|||||||!!!!!!||| !!:!!|||:!!:!! !!||:!!:!!:!!:

yGlyGlyAsnGlyLeuGlyPheArgThrGlyProValGlylleLeuValGlyVallleGlyV

1659 : :

CGGCGGCAACGGCCTCGGCTTCCGCACCGGCCCGGTGGGCATCCTCGTCGGCGTC

ANEXO 5: Secuencia nucleotídica de bldA en S.mobaraensis obtenida a partir de programa exonerate protein2genome

CDs: (gen bldA Streptomyces mobaraensis)

>gi505421894refWP_015608996.1

ATGAGGAGCAGGAACCCGGTCTTCTCGCGACGGGGGTTCACTCCCGGAGGCGGCTA
 CGCGAACTTCAACGCGGCACCGCCGTCCGGGTCCGCGACGCAGCCGGCCGACCCG
 TACGCGGGCAACCCGTACGGCCAGCCCACCAACCCGTACGCGCAGGGCGCCCCCG
 ATCTCCAGCAGGGGATGCCGCAGGCCCCCGGCCCGCCCGGGCGCCATGACGATGGA
 CGACGTCGTCAGCCGCACCGCCATCACGCTGGGCCTGGTGATCGTCGCGGCCGGC
 GCGGCGTGGGCGCTCAAGCTGCCGGTCGGCCTCGGCTTCGGTGCCGCGGTGATCG
 CGATGGTGCTGGGCCTCGTCCAGTCGTTCAAGGCCAAGCCGTCCCCGGCGCTGATC
 CTCGCCTACGCGGCGTTCGAGGGCCTGTTCCCTCGGTGTGATCAGCCAGGCGTACAA
 CGAGGTCGCCAAGGGCGCCCCGATGCAGGCGGTGCTGGGCACGGTGGCGGTCTTC
 GCCGGTGTGCTCTTCGCGTACCGGGCCCGGATCATCAACGTGAACAACAGGTTCTAC
 CGCTTCGTGGCCGGTGCCGCGATCGGCTTCCTGCTGCTGGGCGTCGTAACATGCT
 GTTCGCCGCCTTCGGCGGGCGGCAACGGCCTCGGCTTCCGCACCGGCCCGGTGGGC
 ATCCTCGTCGGCGTCATCGGTGTGCTGATCGGTGCCGCGTTCCTGGCGCTCGACTT
 CAAGCAGGTCGAGGACGGCGTCCAGTACGGCGCCCCGCGCGAGGAGTCGTGGCTG
 GCCGCGTTCGGTCTGACGCTGTGCTGGTGTGGATCTACACCGAGCTGCTGCGGGT
 CATCGCCCTGGTGATGAGCGACGAC

Secuencia aminoacídica del gen bldA de S.mobaraensis obtenida a partir de exonerate protein2genome:

Proteína: (ortólogo S. fulvissinus)

>gi505421894refWP_015608996.1 0

MRSRNPVFSRRGFTPGGGYANFNAAPPSGSATQPADPYAGNPYQGPTNPYAQGAPDL
 QQGMPQAPARPGAMTMDDVVSRTAITLGLVIVAAGAAWALKLPVGLGFGA AVIAMVLGL
 VQSFKAKPSPALILAYAAFEGFLFLGVISQAYNEVAKGAPMQAVLGTVAVFAGVLFAYRARI
 NVNNRFYRFVAGAAIGFLLLGVVNMLFAAFGGGNLGFRTGPVGILVGVIGVLIGAAFLAL
 DFKQVEDGVQYGAPREESWLA AFGLTSLVWIYTELLRVIALVMSDD

ANEXO 6: Secuencias nucleotídicas de los genes marcadores whig, whib y bldA que se utilizaron para el diseño de los oligonucleótidos.

>NZ_AORZ01000033_2592 (secuencia de WhiG: *S.mobaraensis*)

atgctcagcgcgcacgggtgacacatccgacaaggagtgagcaacatatggtgctatgacgcgaagacgggtcacggc
 ggtcggggcgggggcggtgacggccctgggctgtcccggggcggggacggggcgggacgccgggactcccacgga
 gttccggggcgatgggcccaccgtcgccaacatcgactggccgtcccgggggctcggccgggaccggcagcgc
 gaggaactcctcgccctcctggactccgccgtgaagcggcggtcaacgtcgtcctcctccagatccggccgaccgccgac
 gcgttctggcgtcgcggtacgaaccgtggtccgagttcctgaccggcacgcaggggaaggaccgggctgggaccggct
 ggacttcgccgtccgcgagggcgaccggcgagcctgcaactgcacggctggtcaaccctaccgcatcgccaaccaca
 ccgaccccgggcggtcgtgccgtcccacccggcgcggaagcaccgggctgggcggtgccctacggcggggaagtcta
 ctacaacctggcctgcccgacgtccggcggtcgtccaggacgccatgctcgacgcgggttccgctacgacctcgacggg
 gtgcacttcgacgactacttaccgtaccgggtggcggggaggagttcgacgacgcggcggtaccggcggtacggc
 ggggaagttctccgaccggggcgctggcgggcgggacaacatcgaccggctggtgcgcgagacggggcgagcgcataag
 cggcgcaagaaacacgtgcggtcggggtagcccggtcggcgtggtggcgcaataaggcgacggactcccgggggtcggg
 caccggggcggtgacgacgtacgacgacctgacgcggacaccgggaagtgggtgctcgaggggatggatcgactac
 atcgtccccagggttactggcacatcggaacgccggccgactacgcgacgctcgtaccgtggtggggccggaccgtg
 cgggcaccgcgctcggcctgtacatcggcgagggcgtctaccggcagggcgaccctcacagcccggccctggcagg
 acccgccgaacttcccggccacctcagccttccggcgccatcgcgaggtggggcggaacgtctacttctccggcgca
 ggtgcgcgacgaccgatcggggcgatggcgcgctggtcggggaccactaccccgccgcgcgcccggcgctg
 a

>NZ_AORZ01000001_38 (secuencia de whiB: *S.mobaraensis*)

gtgcacatcaaggcacacaccccgctcagtagccaccgacctgatcccccgcccgtcccacggaggactccttgaccccc
 ctcgctccgctcaccgcgctcaccgacctcgacgacgcgatcgagaacctcggcacccccgtgccgtgccgcacctacgac
 cccgaggtcttctcggcaggtccccggccgacgtcgagtagccaagtcgctctgccagacctgccgctgctgaggcctg
 cctcggcgcgcaaggaccgccgagccctggggcgtctggggcgagagctctcgtccagggcgctcgtctggtggccc
 gcaagcgtccccgtggtcgcggcgaagaaccgggtcggcgcata

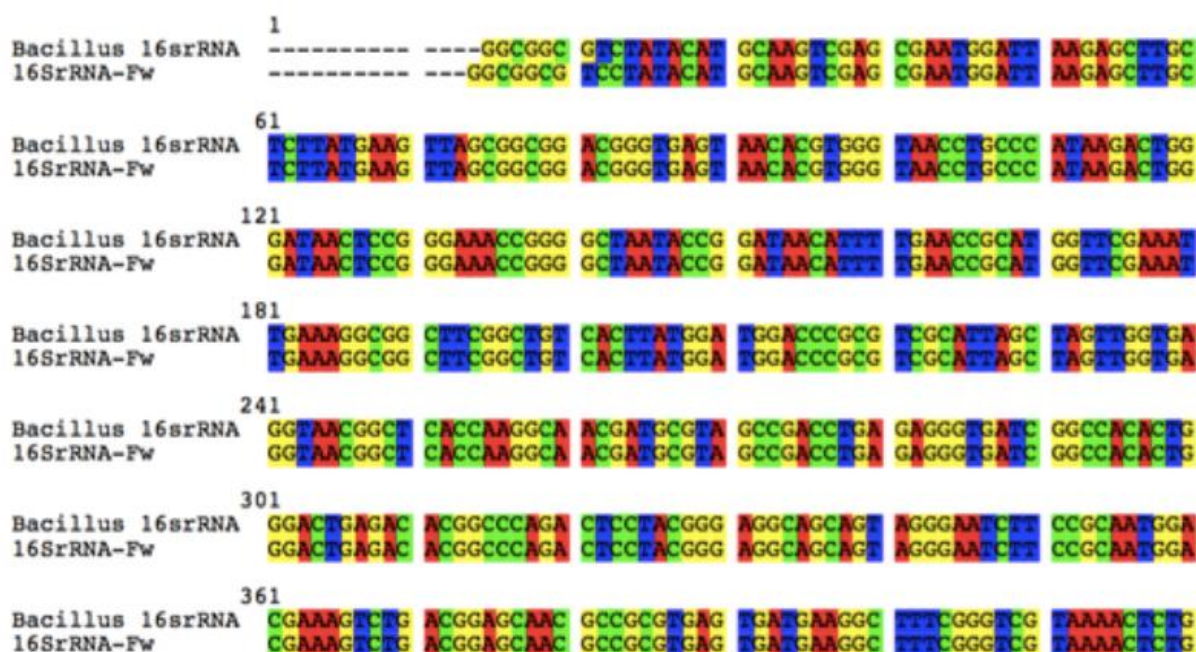
CDs:>gi505421894refWP_015608996.1 (secuencia del gen bldA: *S.mobaraensis*)

ATGAGGAGCAGGAACCCGGTCTTCTCGCGACGGGGTTCACTCCCGGAGGCGGCTA

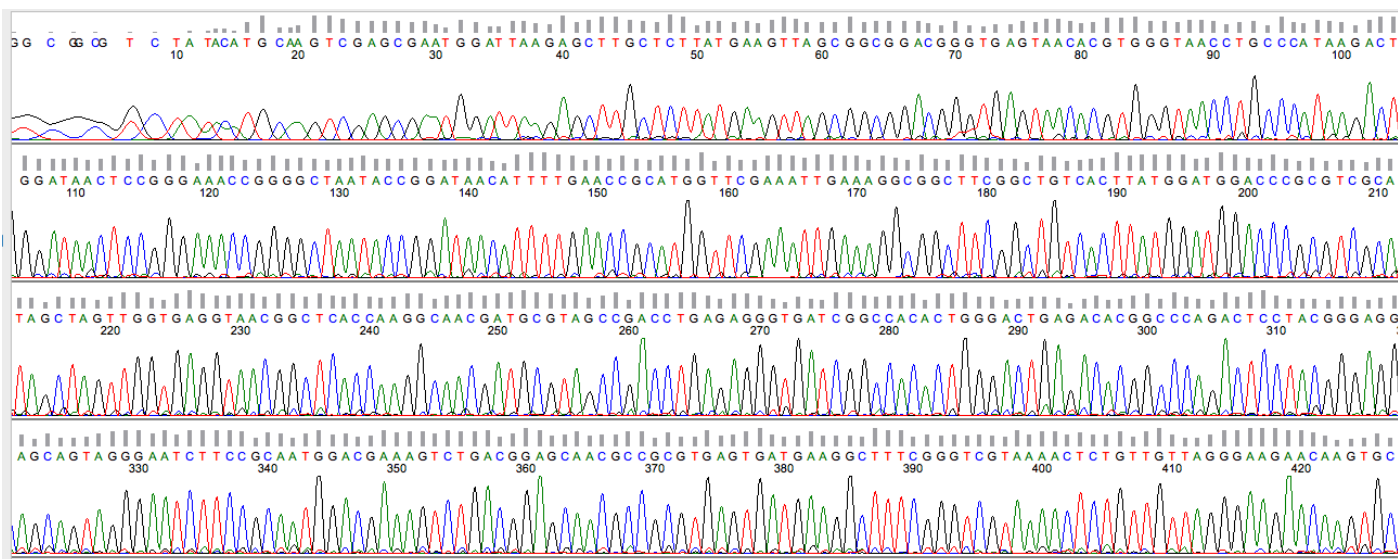
CGCGAACTTCAACGCGGCACCGCCGTCCGGGTCCGCGACGCAGCCGGCCGACCCG
TACGCGGGCAACCCGTACGGCCAGCCCACCAACCCGTACGCGCAGGGCGCCCCCGA
TCTCCAGCAGGGGATGCCGCAGGCCCGGCCCGCCCGGGCGCCATGACGATGGAC
GACGTCGTCAGCCGCACCGCCATCACGCTGGGCTGGTGATCGTCGCGGCCGGCG
CGGCGTGGGCGCTCAAGCTGCCGGTCGGCCTCGGCTTCGGTGCCGCGGTGATCGC
GATGGTGCTGGGCCTCGTCCAGTCGTTCAAGGCCAAGCCGTCCCCGGCGCTGATCC
TCGCCTACGCGGCGTTCGAGGGCCTGTTCTCGGTGTGATCAGCCAGGCGTACAAC
GAGGTCGCCAAGGGCGCCCCGATGCAGGCGGTGCTGGGCACGGTGGCAGTCTTCG
CCGGTGTGCTCTTCGCGTACCGGGCCCGGATCATCAACGTGAACAACAGGTTCTACC
GTTTCGTGGCCGGTGCCGCGATCGGCTTCTGCTGCTGGGCGTCGTCAACATGCTG
TTCGCCGCCTTCGGCGGCGGCAACGGCCTCGGCTTCCGCACCGGCCCGGTGGGCA
TCCTCGTCGGCGTCATCGGTGTGCTGATCGGTGCCGCGTTCCTGGCGCTCGACTTCA
AGCAGGTCGAGGACGGCGTCCAGTACGGCGCCCCGCGCGAGGAGTCGTGGCTGGC
CGCGTTCGGTCTGACGCTGTCGCTGGTGTGGATCTACACCGAGCTGCTGCGGGTCA

Anexo 7: Alineamientos y cromatogramas de los genes: 16S rRNA, ciclotiazomicina, bldA, whig y whib.

Alineamiento del gen 16S rRNA de *B. cereus* ATCC14579. La secuencia de arriba corresponde a la secuencia del gen mientras que la de abajo corresponde al producto de la secuenciación con el oligonucleótido universal 16S rRNA.



Cromatograma de las primeras 400 bases nucleotídicas del gen 16S rRNA de *B. cereus* ATCC14579 obtenido a partir del programa FinchTv. Cada pico corresponde a una base nucleotídica y esta representado por un código de color: Adenina (verde),



Citosina (azul), Timina (rojo) y Guanina (negro).

Alineamiento del gen 16S rRNA de *S. mobaraensis*. La secuencia de arriba corresponde a la secuencia del gen mientras que la de abajo corresponde a la secuencia resultado de la secuenciación con el oligonucleótido universal 16SrRNA.

| | | | | | | |
|-------------------------------------|-----|------------|------------|------------|------------|------------|
| 16srRNA <i>Streptomyces</i> mob. fw | 1 | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- |
| 16SrRNA <i>S.MOB</i> | | AGTTGATCC | TGGCTCAGGC | TGGATCACC | CCCTTCGAG | TTTGAATCC |
| 16srRNA <i>Streptomyces</i> mob. fw | 51 | ----- | ----- | GGSAKCT | ACACAACAA | GTCGAACGAT |
| 16SrRNA <i>S.MOB</i> | | GGCTCAGGAC | GAAACCTGGC | GGCGTCTTA | ACACAACAA | GTCGAACGAT |
| 16srRNA <i>Streptomyces</i> mob. fw | 101 | GAACTCCTT | CGGGAGGGGA | TTAGTGGCGA | ACGGGTAG | AACACGTGGG |
| 16SrRNA <i>S.MOB</i> | | GAACTCCTT | CGGGAGGGGA | TTAGTGGCGA | ACGGGTAG | AACACGTGGG |
| 16srRNA <i>Streptomyces</i> mob. fw | 151 | CAATCTGCC | TGCACCTCGG | GACAAGCCCT | GGAAAACGGG | TCTAATACCG |
| 16SrRNA <i>S.MOB</i> | | CAATCTGCC | TGCACCTCGG | GACAAGCCCT | GGAAAACGGG | TCTAATACCG |
| 16srRNA <i>Streptomyces</i> mob. fw | 201 | GATAYGACTG | CTGAGCGCAT | GCTCGG TGG | GGAAAACCTC | GGCGGTGCAG |
| 16SrRNA <i>S.MOB</i> | | GATAYGACTG | CTGAGCGCAT | GCTCGG TGG | GGAAAACCTC | GGCGGTGCAG |
| 16srRNA <i>Streptomyces</i> mob. fw | 251 | GATGAGCCCG | CGGCCATCA | GCTTGTGGT | GGGGTATGG | CCTACCAAGG |
| 16SrRNA <i>S.MOB</i> | | GATGAGCCCG | CGGCCATCA | GCTTGTGGT | GGGGTATGG | CCTACCAAGG |
| 16srRNA <i>Streptomyces</i> mob. fw | 301 | CGACGACGGG | TAGCCGGCCT | GAGAGGGCGA | CCGGCCACAC | TGGGACTGAG |
| 16SrRNA <i>S.MOB</i> | | CGACGACGGG | TAGCCGGCCT | GAGAGGGCGA | CCGGCCACAC | TGGGACTGAG |
| 16srRNA <i>Streptomyces</i> mob. fw | 351 | ACACGGCCCA | GACTCCTACG | GGAGGCAGCA | GTGGGGAATA | TTGCACAATG |
| 16SrRNA <i>S.MOB</i> | | ACACGGCCCA | GACTCCTACG | GGAGGCAGCA | GTGGGGAATA | TTGCACAATG |
| 16srRNA <i>Streptomyces</i> mob. fw | 401 | GGCGAAGCC | TGATGCAGCG | ACGCCCGCTG | AGGGATGACG | GCCCTCGGGT |
| 16SrRNA <i>S.MOB</i> | | GGCGAAGCC | TGATGCAGCG | ACGCCCGCTG | AGGGATGACG | GCCCTCGGGT |
| 16srRNA <i>Streptomyces</i> mob. fw | 451 | TGTAACCTC | TTTCAGCAGG | GAAGAAGCGA | AAGTGAACGG | ACCTGCAGAA |
| 16SrRNA <i>S.MOB</i> | | TGTAACCTC | TTTCAGCAGG | GAAGAAGCGA | AAGTGAACGG | ACCTGCAGAA |
| 16srRNA <i>Streptomyces</i> mob. fw | 501 | GAAGCGCCGG | CTAACTACGT | GCCAGCAGCC | GCGGTAATAC | GTAGGGCGCA |
| 16SrRNA <i>S.MOB</i> | | GAAGCGCCGG | CTAACTACGT | GCCAGCAGCC | GCGGTAATAC | GTAGGGCGCA |
| 16srRNA <i>Streptomyces</i> mob. fw | 551 | AGCGTGTCC | GGAATTAATG | GGCGTAANGA | GCTCGTAGGC | GGCTTGTCCG |
| 16SrRNA <i>S.MOB</i> | | AGCGTGTCC | GGAATTAATG | GGCGTAANGA | GCTCGTAGGC | GGCTTGTCCG |

601
 16srRNA Streptomyces mob. fw GTCGGATGAG AAAGCCCGGG GCTTAAACCC GGGTCGCAT TCGATACGGG
 16SrRNA S.MOB GTCGGATGAG AAAGCCCGGG GCTTAAACCC GGGTCGCAT TCGATACGGG

651
 16srRNA Streptomyces mob. fw CAGGCATAGAG TTCGGTAGGG GAGATCGGAA TTCCTGGGT AGCGGTGAAA
 16SrRNA S.MOB CAGGCATAGAG TTCGGTAGGG GAGATCGGAA TTCCTGGGT AGCGGTGAAA

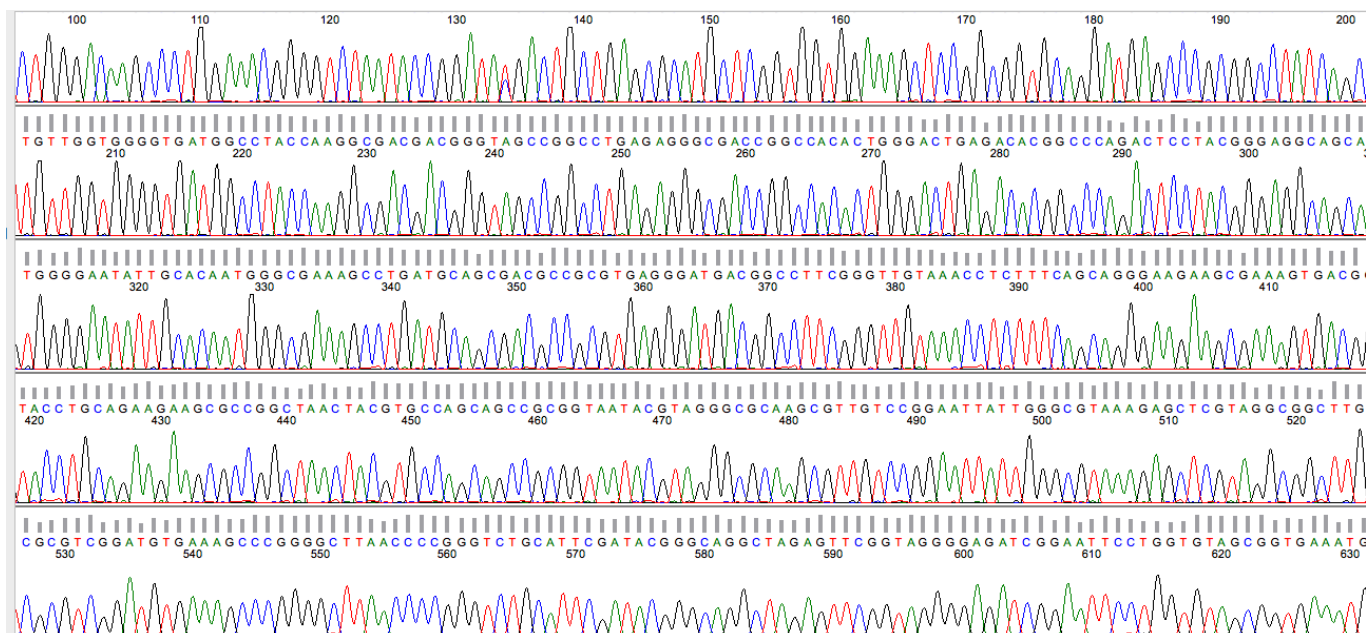
701
 16srRNA Streptomyces mob. fw TGGCAGATA TCAGGAGGAA CACCGGTGGC GAAGGCGGAT CTCCTGGGCCG
 16SrRNA S.MOB TGGCAGATA TCAGGAGGAA CACCGGTGGC GAAGGCGGAT CTCCTGGGCCG

751
 16srRNA Streptomyces mob. fw ATACTGACGC TGAGGAGCGA AAGCGTGGGG AGCGAACAGG ATTAGATACC
 16SrRNA S.MOB ATACTGACGC TGAGGAGCGA AAGCGTGGGG AGCGAACAGG ATTAGATACC

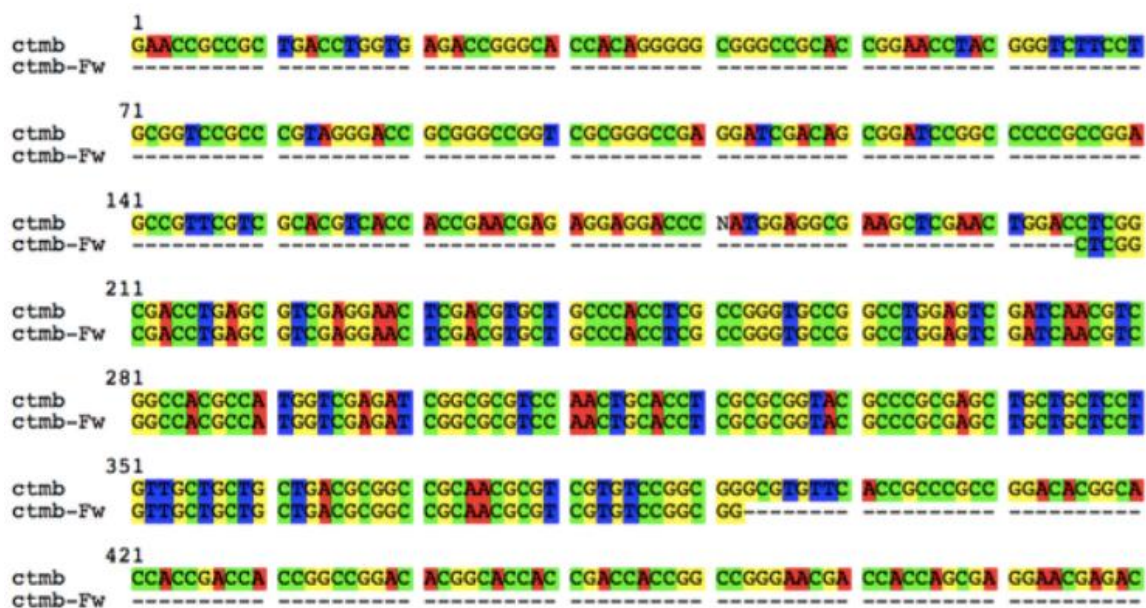
801
 16srRNA Streptomyces mob. fw CTGGTAGTCC ACGCCGTAAA CGTTGGGAAC TAGGTGTGGG CGACATCCA
 16SrRNA S.MOB CTGGTAGTCC ACGCCGTAAA CGTTGGGAAC TAGGTGTGGG CGACATCCA

851
 16srRNA Streptomyces mob. fw CGTCGTCCGT GCCGCAGCTA ACGCATTAG TTCCCCGCCT GGGGAGTACG
 16SrRNA S.MOB CGTCGTCCGT GCCGCAGCTA ACGCATTAG TTCCCCGCCT GGGGAGTACG

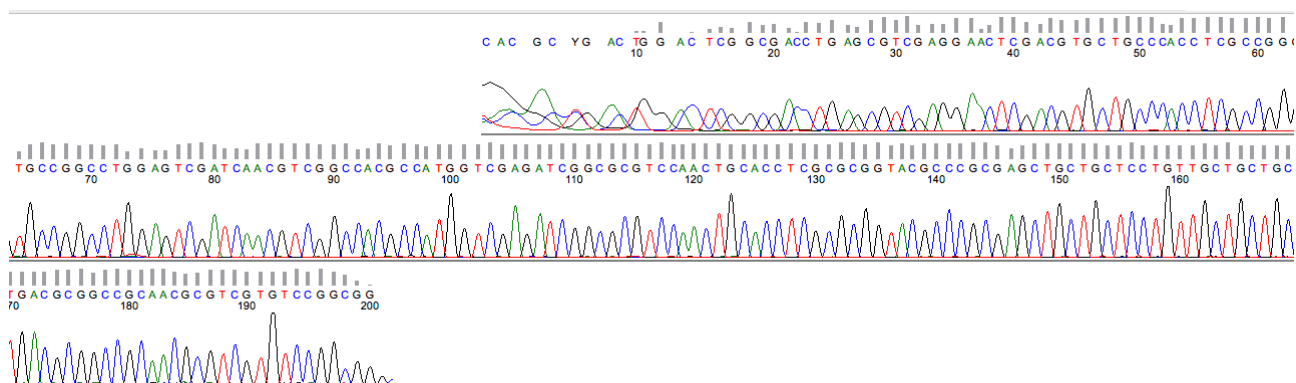
Cromatograma de las primeras 600 bases nucleotídicas del gen 16S rRNA de *S.mobaraensis* obtenido mediante el programa FinchTv.



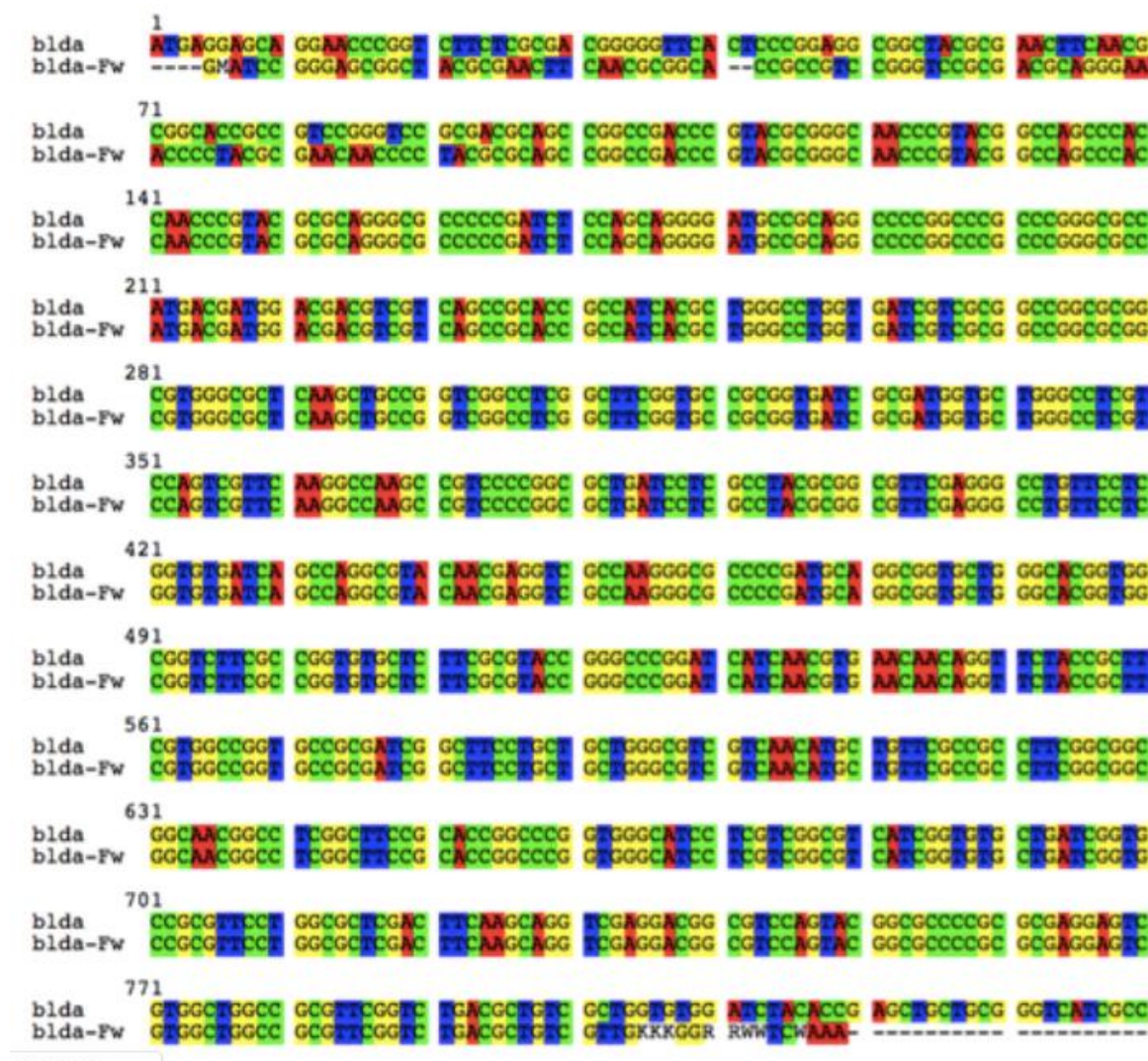
Alineamiento del gen ciclotiazomicina. La secuencia de arriba corresponde a la secuencia del gen mientras que la de abajo corresponde a la secuencia resultado de la secuenciación con el oligonucleótido de ciclotiazomicina.



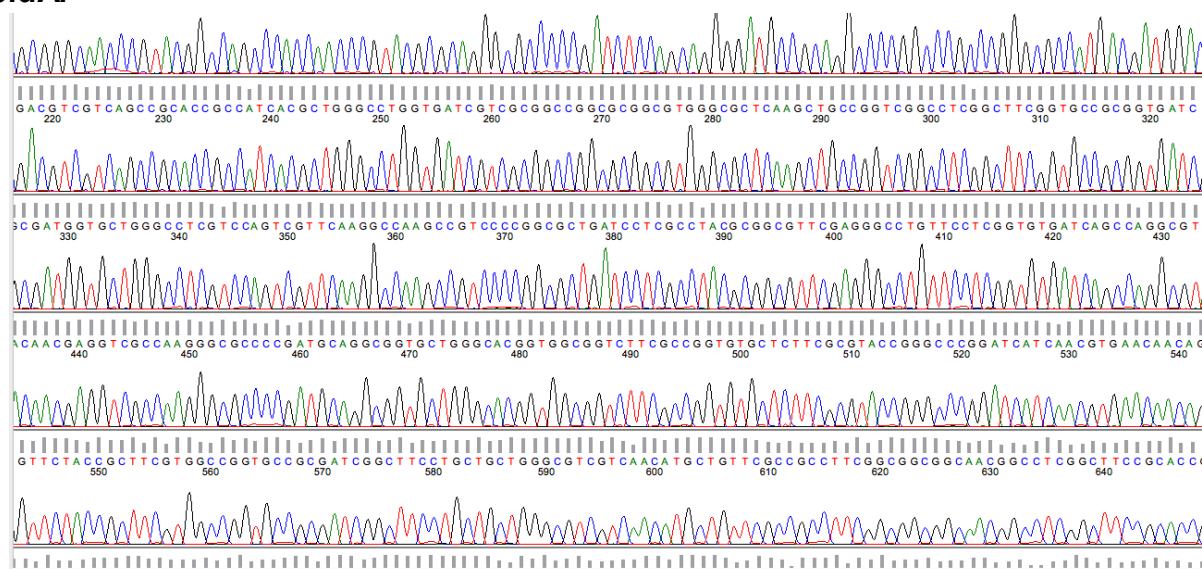
Cromatograma obtenido a partir del programa FinchTv de la secuenciación del gen ciclotiazomicina.



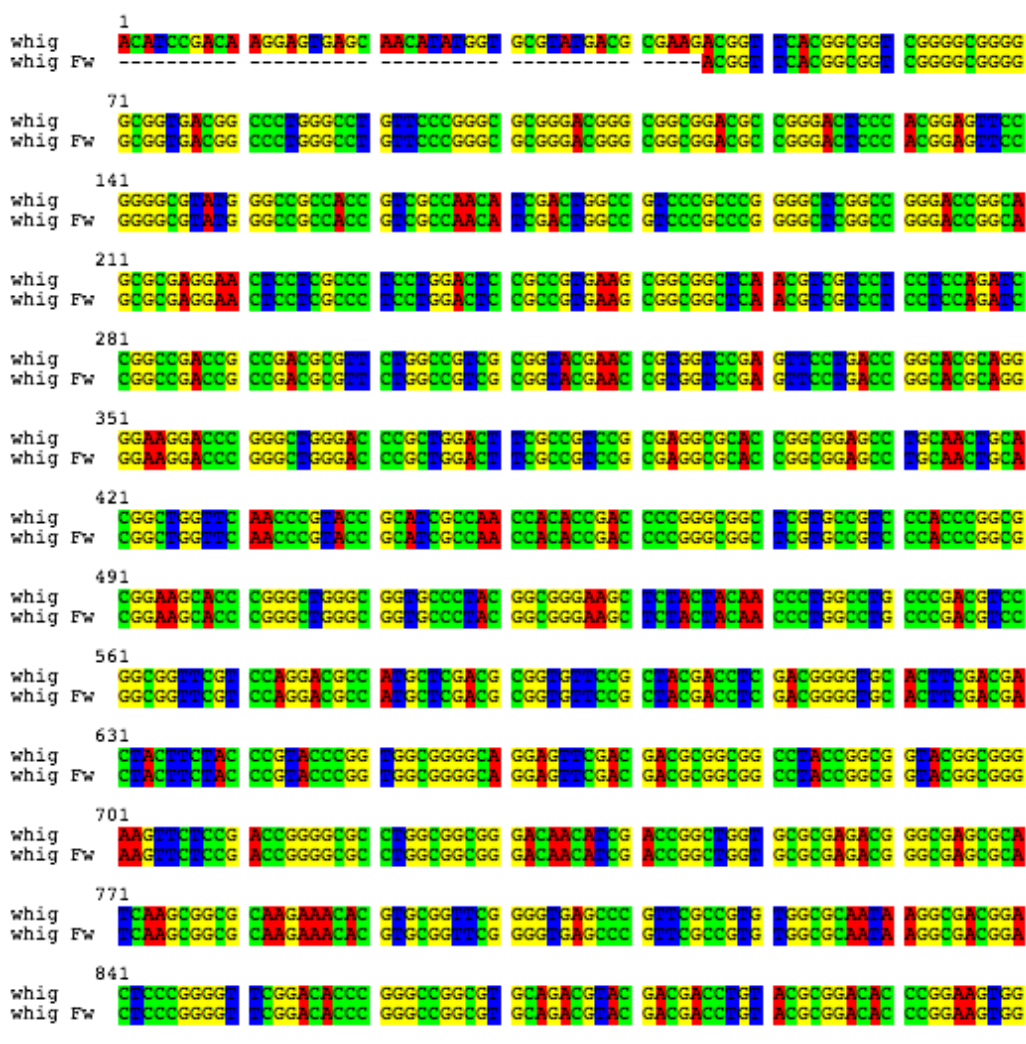
Alineamiento del gen bldA. La secuencia de arriba corresponde a la secuencia del gen mientras que la de abajo corresponde al producto de la secuenciación con el oligonucleótido de bldA.



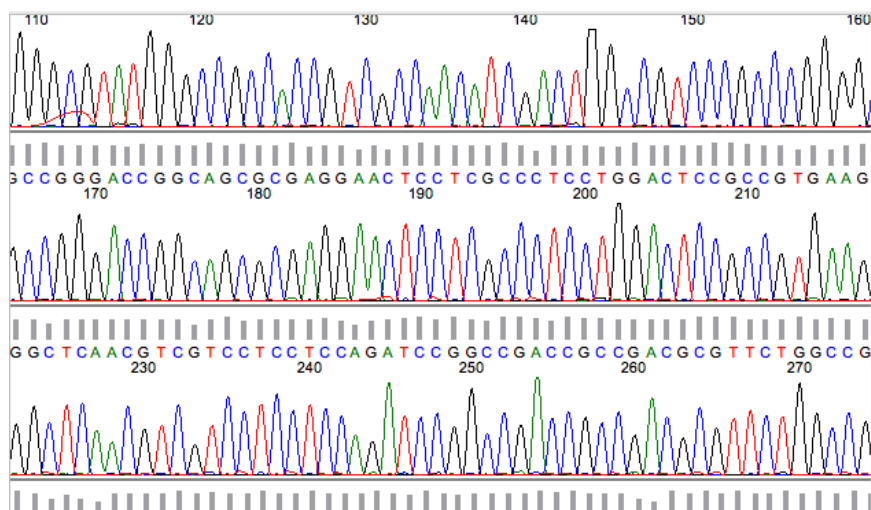
Cromatograma obtenido a partir del programa FinchTV de la secuenciación del gen bldA.



Alineamiento del gen whig (955 pb) mediante el programa Seaview. La secuencia de arriba corresponde a la secuencia del gen mientras que la de abajo corresponde a la secuencia resultado de la secuenciación con el oligonucleótido derecho de whig.



Cromatograma de la secuenciación del gen whig obtenido a partir del programa FinchTv.



Alineamiento del gen whib. La secuencia de arriba corresponde a la secuencia del gen mientras que la de abajo corresponde a la secuencia resultado de la secuenciación con el oligonucleótido de whib.

```

whib      1
whib-Fw  TCAGTAGCCA CCGACCTGAT CCCCCCGCCC GTCCCCACGG AGGACTCCTT GACCCCCCTC GCTCCGCTCA

whib     71
whib-Fw  CCGCGCTCAC CGACCTCGAC GACGCGATCG AGAACCTCGG CACCCCCGTG CCGTGCCGCA CCTACGACCC

whib    141
whib-Fw  CGAGGCTCTC TTCGCCGAGT CCCCCGCCGA CGTCGAGTAC GC

```

Cromatograma de la secuenciación del gen whib obtenido a partir del programa FinchTv.

