



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS DEL MAR Y LIMNOLOGÍA
(QUÍMICA ACUÁTICA)

ESTUDIO DEL POTENCIAL DE PRODUCCIÓN DE POLICÉTIDOS Y
PÉPTIDOS NO RIBOSOMALES EN ACTINOMICETOS DE LA ZONA
COSTERA DE YUCATÁN

T E S I S

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA:

CLAUDIA AZZIZA REMES RODRÍGUEZ

DIRECTORA DE TESIS: DRA. ALEJANDRA PRIETO DAVÓ

FACULTAD DE QUÍMICA (UNAM) UNIDAD ACADÉMICA YUCATÁN

COMITÉ TUTOR: DR. SERGIO SÁNCHEZ ESQUIVEL

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS (UNAM)

DRA. ASUNCIÓN LAGO LESTÓN

CENTRO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA Y ESTUDIOS SUPERIORES DE
ENSENADA (CICESE)

SISAL, YUCATÁN. AGOSTO 2018



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

ÍNDICE		
1	INTRODUCCIÓN	5
2	ANTECEDENTES	7
2.1	LOS ACTINOMICETOS EN EL AMBIENTE MARINO	8
2.2	DIVERSIDAD DE GENES PKS Y NRPS	8
2.3	POLICÉTIDO SINTASAS (PKS)	9
2.4	DOMINIOS CETOSINTASA (KS)	11
2.5	SINTETASAS DE PÉPTIDOS NO RIBOSOMALES	12
2.6	DOMINIOS DE ADENILACIÓN	13
3	JUSTIFICACIÓN	13
4	HIPÓTESIS	14
5	OBJETIVO GENERAL	14
5.1	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	15
6	MATERIALES Y MÉTODOS	15
6.1	OBTENCIÓN DE LAS MUESTRAS	15
6.2	REACTIVACIÓN DE CEPAS Y ESCRUTINIO DE SELECCIÓN	17
6.3	MÉTODOS MOLECULARES	18
6.3.1	EXTRACCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE ADN	18
6.3.2	ESCRUTINIO DE CEPAS POR MEDIO DE AMPLIFICACIÓN DE FRAGMENTOS KS	18
6.3.3	SEGUNDO ESCRUTINIO; AMPLIFICACIÓN DE FRAGMENTOS PERTENECIENTES AL DOMINIO KS DE LAS PKS TIPO I PARA SECUENCIACIÓN AMPLICONES.	18
6.3.4	SECUENCIACION MASIVA DE AMPLICONES DE DOMINIOS KS EN POLICÉTOS SINTETASAS Y DOMINIOS A EN SITETASAS DE PÉPTIDOS NO	19

RIBOSOMALES.	
6.3.5 PRIMERA AMPLIFICACIÓN DE PCR CON PRIMERS DEGENERADOS.	19
6.3.6 PCR CON CEBADORES MARCADOS (<i>BARCODED</i> PRIMERS)	19
6.3.7 POOLING Y PRIMERA LIMPIEZA DE PRODUCTOS DE PCR	20
6.3.8 CUANTIFICACIÓN POR FLUOROMETRÍA CON QUBIT	21
6.3.9 DILUCIÓN DE MUESTRAS PARA MEDICIÓN Y ANÁLISIS POR AGILET 4200TapeStation.	21
6.3.10 SEGUNDA AMPLIFICACIÓN DE PCR PARA SECUENCIACIÓN: ADAPTADORES ILLUMINA	21
6.3.11 POOLING Y SEGUNDA LIMPIEZA DE PRODUCTO DE PCR	22
6.3.12 SEGUNDA CUANTIFICACIÓN POR FLUOROMETRÍA CON QUBIT	22
6.3.13 SEGUNDA DILUCIÓN DE MUESTRAS PARA MEDICIÓN Y ANÁLISIS POR TAPESTATION	22
6.3.14 NORMALIZACIÓN DE LAS MUESTRAS Y POOLING	23
6.3.15 PREPARACIÓN DE LA PLATAFORMA MISEQ	23
6.3.16 OBTENCIÓN Y LIMPIEZA DE LAS SECUENCIAS	24
6.3.17 ESTANDARIZACIÓN DE LAS SECUENCIAS	24
6.4 ALINEAMIENTO DE SECUENCIAS	24
6.4.1 ANÁLISIS BLAST EN NCBI: BÚSQUEDA DE SECUENCIAS DE CETOSINTASAS Y ADENILASAS.	25
6.4.2 ANÁLISIS BLAST EN NaPDoS y eSNaPD	25
6.5 ANÁLISIS FILOGENÉTICO	26
7 RESULTADOS	26
7.1 SELECCIÓN DE CEPAS	26

7.2 EXTRACCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE ADN	27
7.3 RESULTADOS DEL PRIMER ESCRUTINIO DE CEPAS POR MEDIO DE AMPLIFICACIÓN DE FRAGMENTOS PERTENECIENTES AL DOMINIO KS EN POLICÉTIDO SINTASAS	28
7.4 RESULTADOS DEL SEGUNDO ESCRUTINIO POR MEDIO DE AMPLIFICACIÓN DE FRAGMENTOS PERTENECIENTES AL DOMINIO KS Y A	30
7.5 RESULTADOS DE LA PRIMERA AMPLIFICACIÓN DE PCR CON PRIMERS DEGENERADOS	31
7.6 RESULTADO DE LA SEGUNDA DILUCIÓN DE MUESTRAS PARA LA MEDICIÓN Y ANÁLISIS POR TAPESTATION	31
7.7 ALINEAMIENTO DE SECUENCIAS	32
7.8 BLAST NCBI	32
7.9 BLAST NaPDoS/ eSNaPD	32
8 ANÁLISIS FILOGENÉTICO	33
8.1 ANÁLISIS FILOGENÉTICO DEL DOMINIO KS: NaPDoS	34
8.2 ANÁLISIS FILOGENÉTICO DEL DOMINIO A: eSNaPD	36
8.3 ANÁLISIS FILOGENÉTICO DEL DOMINIO KS: GENBANK	39
8.4 ANÁLISIS FILOGENÉTICO DEL DOMINIO A: GENBANK	43
9 DISCUSIÓN	47
10 CONCLUSIÓN	52
11 PERSPECTIVAS	53
10 BIBLIOGRAFÍA	54
11 ANEXOS	

1. INTRODUCCIÓN

Los actinomicetos son una clase de bacterias Gram positivas filamentosas con alto contenido de G+C parecidas superficialmente a los hongos. Este grupo de microbios está extensamente distribuido en los ecosistemas naturales a nivel mundial y, aunque han sido estudiados principalmente en hábitats terrestres, también están vastamente distribuidos en los ecosistemas marinos convirtiéndose en una fuente importante en el área del descubrimiento de nuevos productos naturales bioactivos. Los actinomicetos presentan propiedades fisiológicas y metabólicas interesantes, como la producción de enzimas extracelulares y compuestos con actividad biológica. Ejemplo de ello son los más de 11,000 compuestos bioactivos que se encuentran reportados bajo producción de esta Clase de bacterias (Berdy et al., 2005). Los compuestos aislados de actinomicetos marinos tienen un amplio espectro de actividades biológicas, tales como antibióticas, fungicidas, antivirales, tóxicas, neurotóxicas, citotóxicas, antimitóticas, inmunosupresoras, enzimáticas y antineoplásicas (Jadón et al., 2014). Debido a esto y, en parte por el creciente número de metabolitos secundarios únicos y biológicamente activos que poseen, existe interés, tanto académico como industrial, por los microorganismos marinos (Fenical et al., 1994). A partir de los años 70's, se empezaron a explorar nuevos ambientes que pudieran ser nichos de aislamiento de actinomicetos (Fenical et al., 1997). Entre éstos, los ambientes marinos presentan características muy específicas y distintas a las encontradas en los ambientes terrestres, y debido al rol ecológico de estos microorganismos, que son degradadores de materia orgánica y recicladores de nutrientes en los sedimentos, se empezaron a explorar los fondos de los océanos. Los factores bióticos y abióticos que imperan en los ecosistemas marinos, como alta salinidad, bajas temperaturas, bajo porcentaje de oxígeno disuelto, altas presiones, ambientes oligotróficos y elementos químicos, principalmente halógenos disueltos en el agua de mar, son factores que van influenciar y condicionar de manera considerable al metabolismo y desarrollo de los actinomicetos marinos y por lo tanto, a la síntesis de sus metabolitos secundarios debido a la incorporación de dichos elementos durante su biosíntesis. Debido a lo anterior, los ambientes marinos son fuentes inexhaustibles para el aislamiento de microorganismos productores de compuestos bioactivos únicos (Ellaiah and Reddy, 1987; Ramesh and Mathivanan, 2009; Mahajan B., 2015)

Dentro de la amplia gama de compuestos bioactivos producidos por microorganismos marinos, los policétidos y los péptidos no ribosomales son metabolitos secundarios que

son sintetizados por complejos multienzimáticos como Policétido Sintetasas (PKS) y Sintetasas de Péptidos no Ribosomales (NRPS), los cuales cuentan con una notable diversidad funcional y estructural con diversas actividades biológicas contra otros microorganismos y/o eucariotas superiores (Robinson JA, 1991), y por lo tanto, son de gran interés farmacológico. Una manera de conocer la diversidad de los genes de los complejos multienzimáticos de policétido sintetasas y sintetasas de péptidos no ribosomales en cepas de actinomicetos aislados, es mediante análisis filogenéticos de sus dominios. Los dominios cetosintetasas (KS) y dominios de adenilación (A) son enzimas que poseen funciones muy importantes dentro de los complejos multienzimáticos, y, por lo tanto, posee regiones conservadas que contienen motivos y sitios catalíticos, y regiones muy variadas, como las de soporte. Sin embargo, debido a la tasa de mutación de estas enzimas a nivel genético, es posible poder observar los cambios en los grupos de aminoácidos, y con ello, se podría determinar la diversidad en las secuencias para la producción de diferentes compuestos bioactivos (Moffitt and Neilan, 2003; Zhao et al., 2008) Este trabajo está enfocado a estudiar el potencial de producción de metabolitos secundarios producidos por actinomicetos de la zona costera de Yucatán. Para ello, se utilizaron cepas de actinomicetos aislados que provenían de un estudio anterior que exploró la diversidad de actinomicetos en la Península (Parera- Valadez, 2015). Para explorar el potencial de producción de policétidos y péptidos no ribosomales presentes en actinomicetos de la zona costra de Yucatán se realizaron análisis filogenéticos de fragmentos de secuencias provenientes de genes cetosintetasa y adenilasa para conocer su diversidad.

2. ANTECEDENTES

Los Actinomicetos son una clase de microorganismos que son considerados una fuente virtualmente ilimitada de producción de metabolitos secundarios, los cuales presentan diversas actividades terapéuticas que son benéficas para la salud humana (Subramani et al., 2012). Hay más de 22,000 metabolitos secundarios microbianos conocidos, el 70% de los cuales son producidos por actinomicetos, 20% de hongos, 7% de *Bacillus* spp y 1-2% por otras bacterias (Subramani et al., 2012). Entre los actinomicetos, el grupo de los *Streptomyces* se considera económicamente importante, ya que, del 50-55% de los más de 10,000 antibióticos conocidos, son producidos por este género (Berdy, 2005).

Debido a la riqueza en la producción de metabolitos secundarios con actividad farmacológica, el género *Streptomyces* ha sido el grupo de actinomicetos más estudiado, pero poco a poco esta tendencia ha ido cambiando. El estudio de otros géneros, los llamados Actinomicetos raros, ha demostrado que estos microorganismos poseen también una alta capacidad metabólica para la producción de metabolitos secundarios. La búsqueda y el descubrimiento de actinomicetos raros y nuevos es de interés significativo para el descubrimiento de fármacos debido a la creciente necesidad de desarrollar nuevos y potentes agentes terapéuticos que puedan responder a las necesidades actuales relacionadas con la resistencia bacteriana a los antibióticos. Las tecnologías moleculares modernas son herramientas que han facilitado la búsqueda de secuencias específicas dentro de los genomas para la detección y aislamiento de actinomicetos productores de compuestos bioactivos (Gómez- Escribano et al., 2016). Un ejemplo de esto, es el diseño de cebadores degenerados dirigidos a la amplificación específica de secuencias de genes PKS I y NRPS en actinomicetos (Ayuso-Sacido et al., 2005). Asimismo, la secuenciación de alto rendimiento, o *Next Generation Sequencing* (NGS), no sólo ha reducido el costo de procesamiento de genomas enteros, sino también ha incrementado substancialmente la calidad de los datos obtenidos (Gómez- Escribano et al., 2016). La secuenciación de ADN ha evolucionado de obtener un borrador de la secuencia del genoma, compuesta de varios centenares de *contigs* (empalme de secuencias contiguas) cortos de confiabilidad dudosa, a la posibilidad de obtener una secuencia cromosómica casi completa y precisa en un solo *contig*, permitiendo así el estudio detallado de los clústers (o grupos contiguos) de genes (Gómez- Escribano et al., 2016). Todo lo anterior, promete proporcionar acceso a esta importante fuente de nueva diversidad de compuestos químicos mediante el estudio de los genomas de actinomicetos, tanto nuevos como raros.

2.1 Los Actinomicetos en el ambiente marino

El océano es un ambiente único y extremo que es caracterizado por alta presión, bajas temperaturas, falta de luz y variabilidad con respecto a salinidad y concentración de oxígeno (Bull, et al., 2000). Aunado a lo anterior, el océano también presenta ambientes oligotróficos, en los cuales la supervivencia de microorganismos puede llegar a ser todo un reto. Sin embargo, la vida marina se ha abierto paso para conquistar estos ambientes que, a simple vista, podrían parecer impropios para soportar la vida. Los microorganismos marinos han demostrado ser un grupo que presenta ciertas adaptaciones a estos ambientes, las cuales les han permitido no solo sobrevivir, sino proliferar como población. Pero a pesar de que las regiones marinas son muy vastas, el conocimiento científico y la investigación acerca de la diversidad microbiana de estos ambientes es muy escasa (Das et al., 2006). Sin embargo, ha sido demostrado que estas regiones son una buena fuente de microorganismos nuevos para el descubrimiento de nuevos antibióticos (Bull, et al., 2000). Los Actinomicetos, que son bacterias degradadoras Gram positivas con representantes como *Streptomyces*, *Micromonospora*, *Dietzia*, *Salinispora*, *Jiangella*, *Nocardia* y *Verrucosipora*, entre otros, han demostrado tener un alto potencial de producción de metabolitos secundarios.

2.2 Diversidad de genes PKS y NRPS

La impresionante diversidad de estructuras de policétidos y péptidos no ribosomales es el resultado de una serie de eventos biosintéticos que se producen antes, durante y después de los montajes de las cadenas. En todos los casos, los principales determinantes son el tipo y el número de bloques de construcción empleados para la biosíntesis de estos dos tipos de moléculas (Khosla et al., 1999). Después de la síntesis de la columna vertebral del policétido y péptidos no ribosomales, sufren una serie de modificaciones postraduccionales comunes como glicosilaciones, alquilaciones, transferencias de acilo, hidroxilaciones y epoxidaciones. Otras modificaciones conocidas incluyen la halogenación, transaminación, la formación de nitrilos, y desaturación para producir alquinos (Hertweck, 2009).

2.3 Policétido Sintetasas

Dentro de la amplia gama de compuestos producidos por microorganismos, los policétidos son considerados como metabolitos secundarios con una notable diversidad funcional y estructural con diversa actividad biológica contra otros microorganismos y/o eucariotas superiores (Robinson JA, 1991). La biosíntesis de policétidos se da a partir de la polimerización de subunidades de acetilo y propionilo, los cuales son considerados como bloques de construcción para un amplio rango de productos naturales (Robinson JA, 1991). Los policétidos son clasificados de acuerdo a la arquitectura de sus enzimas biosintéticas o complejos enzimáticos denominados Policétido Sintetasas (PKS) quienes llevan a cabo la biosíntesis escalonada de diversos esqueletos de carbono a partir de unidades de ácidos carboxílicos simples activados (Holger et al., 2005). Dependiendo de la estructura enzimática que presentan, los PKS se dividen en tres tipos: 1) Las PKSs I, que en general se pueden dividir en modulares e iterativas. Las PKSs modulares son primordialmente encontradas en actinomicetos, mixobacterias, pseudomonas y cianobacterias. El módulo básico reducido está compuesto por los siguientes dominios: cetosintasa (KS), aciltransferasa (AT) y proteína acarreadora del grupo acilo (ACP). Así mismo, de manera frecuente encontramos dominios de ceto reductasa (KR), deshidratasa (DH) y enoil reductasa que también están incrustados en las megasintasas multifuncionales (Holger et al., 2005). Cada unidad produce una elongación de la cadena, como se puede observar en la Figura 1.

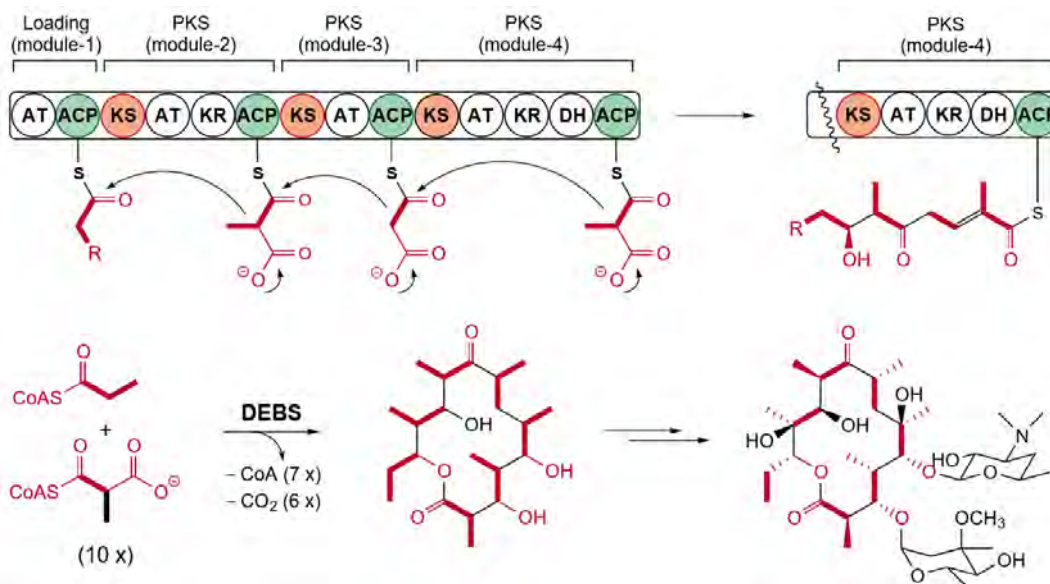


Fig. 1 Esquema de una PKS tipo I modular (Shen, B., 2003)

Las PKS tipo II son complejos multienzimáticos que llevan a cabo un único conjunto de actividades de manera iterativa, como se ejemplifica en la figura 3 por la PKS doxorubicina asociada con la síntesis de tetracenomicina.

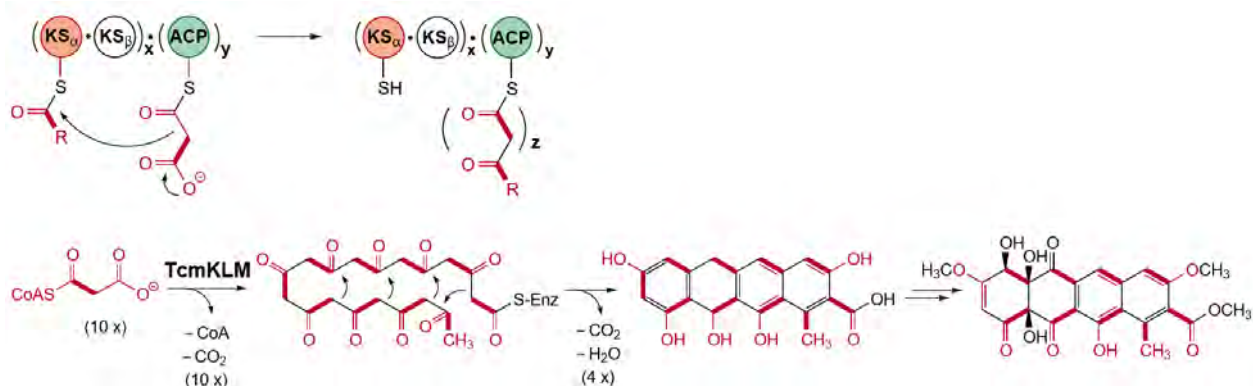


Fig. 2 Ejemplo de PKS tipo II (Shen, B., 2003)

Las PKS tipo III son enzimas homodiméricas que, esencialmente, realizan una condensación iterativa, como se ejemplifica por la sintasa 3,5-Dehidroxifenilglicina en la figura 4 (Yolande et al., 2009). Las PKS tipo I y II utilizan proteínas acarreadoras del grupo acilo (ACP) para activar los sustratos del Acil CoA para canalizar los productos intermedios de policétidos, mientras que la PKS tipo III, que es independiente del dominio ACP, actúa directamente sobre los sustratos del Acil CoA (Shen, B., 2003)

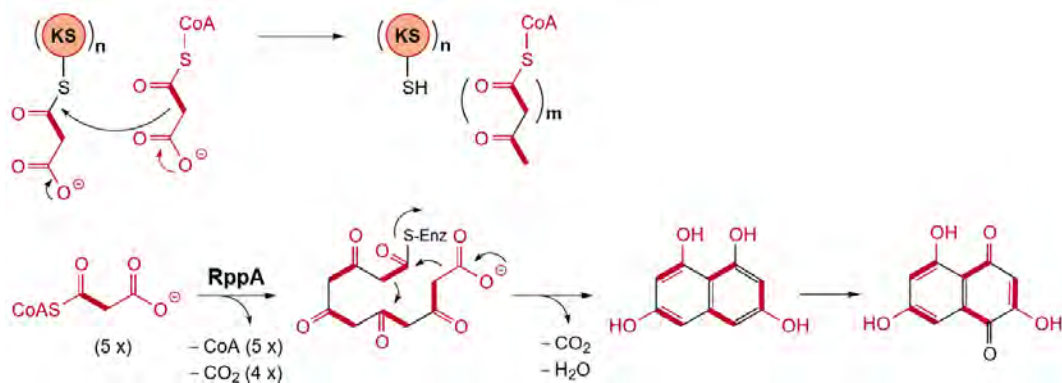


Fig. 3 Ejemplo de PKS tipo III (Shen, B., 2003)

Estos descubrimientos han llevado subsecuentemente a la elucidación de diversas rutas metabólicas de la PKS, en particular aquéllas involucradas en la formación de fármacos prometedores. Algunos ejemplos de compuestos derivados de productos naturales tipo PKS con actividad biológica son: Halichondrina B, Discodermolida, Laulimalida,

Pelorusida A y Salicilhalimida A y B (Salomon et al, 2004). Estos compuestos fueron obtenidos de extractos químicos provenientes de esponjas marinas, aunque existe la teoría de que éstos compuestos son en realidad producidos por microorganismos que se encuentran en relación simbiótica con la esponja (Hochmuth T., 2009).

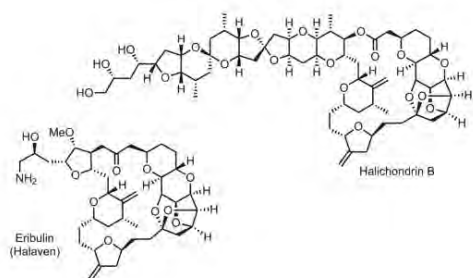


Fig. 4 Halichondrin B y su análogo sintético macrocíclico, Eribulin (Salomon et al, 2004).

2.4 Dominios Cetosintasa (KS)

El dominio cetosintasa (KS) es necesario para llevar a cabo la condensación de las unidades de extensión (malonil CoA, metil-malonil CoA) en la cadena creciente del policétido durante su biosíntesis, la cual ocurre mediante condensaciones de Claisen, en el sitio activo de la cisteína en el dominio KS (Moffitt and Neilan, 2003). Debido a la importante función de condensación de ese dominio, las cetosintasas son los dominios más conservados en las policétido sintasas. Aunque el papel de estos motivos conservados sea desconocido, se cree que están involucrados en la función enzimática o el reconocimiento del sustrato por parte de la KS (Mofit and Neilan, 2003). Debido a lo anterior, se han realizado diversos estudios en los cuales se han analizado muestras metagenómicas y genómicas en diversos ambientes para rastrear clústeres biosintéticos de PKS tipo I, y, debido a su naturaleza modular, se ha demostrado que el reemplazo de un dominio o módulo dentro del complejo multienzimático podría resultar en un complejo funcional que podría sintetizar un nuevo policétido (Gokhale et al. 1999; McDaniel et al. 1999). Debido a lo anterior, el reconocer la diversidad de las secuencias que conforman a los dominios KS en el ambiente es importante para el descubrimiento de nuevos fármacos e investigaciones futuras en biosíntesis combinatoria (Mofit and Neilan, 2003).

2.5 Sintetasas de Péptidos No Ribosomales (NRPS)

En contraste con la biosíntesis ribosomal de péptidos y proteínas, en donde la línea de producción biológica interpreta el código genético, se sabe que muchos péptidos naturales son sintetizados por secuencias de procesos enzimáticamente controlados en los que cada aminoácido es añadido como resultado de la especificidad de la enzima involucrada (Dewick, 2002). Éste proceso está compuesto de múltiples etapas que son llevadas a cabo por un complejo enzimático multifuncional, las Sintetasas de Péptidos no Ribosomales (NRPS), las cuáles poseen una arquitectura tipo modular comparable al que presentan las PKS tipo I. Estas enzimas tienen la consigna de sintetizar péptidos no ribosomales (NRP, por sus siglas en inglés), los cuales son una clase de metabolitos secundarios que poseen el tamaño de un péptido pequeño. La diferencia principal entre ambas rutas recae en que los NRP se biosintetizan por la condensación secuencial de monómeros de aminoácidos, mientras que los PKs se conforman debido a la adición repetitiva de dos unidades céticas de carbono derivadas de tioésteres de etilo u otros ácidos carboxílicos cortos (Ansari et al., 2004). Las NRPS y las PKSs se componen de módulos, que son conjuntos dominios o sitios activos diferentes y que catalizan cada condensación y cada etapa de la elongación de la cadena (Ansari et al., 2004). En el caso de las NRPS, los dominios básicos que presenta cada módulo, que a su vez son parte del complejo multienzimático, son los siguientes: un dominio de adenilación (A), un dominio de una proteína acarreadora de péptidos (PCP) y un dominio de condensación (C). Los NRP son una familia muy diversa de productos naturales que poseen una amplia variedad de actividad biológica y farmacológica como antibióticos, inmunosupresores, antitumorales, citostáticos entre otros (Holger et al., 2005). En la figura 5 se muestra la biosíntesis de un compuesto derivado de productos naturales NRPS con actividad biológica, como la vancomicina (Fig. 5).

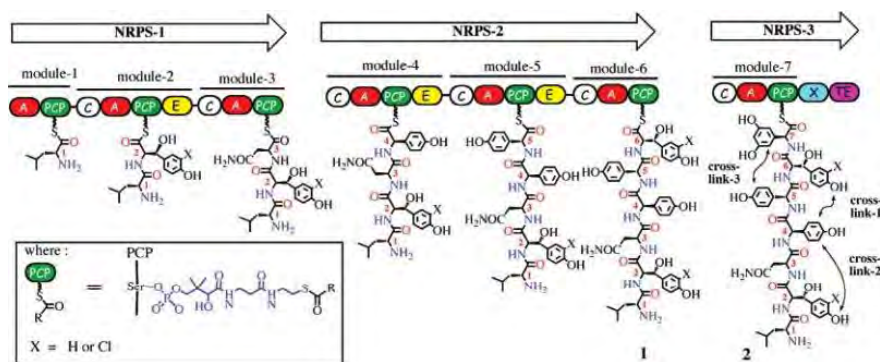


Fig. 5 Biosíntesis de la vancomicina (Woithe et al., 2007)

Al igual que los PKS, los genes de las NRPS, necesarios para la producción de un determinado compuesto, generalmente se encuentran organizados en operones en el genoma de las bacterias y las enzimas se encuentran organizadas en módulos, que son los responsables de la introducción de cada molécula iniciadora. De esta manera, es posible localizar una ruta metabólica completa a partir de los genes encargados de codificar a los dominios funcionales de la megasintasa (Ansari et al., 2004).

2.6 Dominios de adenilación (A)

El dominio de adenilación (A) es el dominio encargado de llevar a cabo el reconocimiento y selección de las unidades de extensión (aminoácidos) para elongar la cadena creciente del péptido (Ayuso-Sacido,2005). Debido a ésta importante función de selección, las adenilasas son dominios conservados en las NRPS, y poseen motivos altamente conservados dentro de sus secuencias. Al igual que en el caso de las cetosintasas, debido a su naturaleza modular, se ha demostrado que el reemplazo de un dominio o módulo dentro del complejo multienzimático podría resultar en un complejo funcional que podría sintetizar un nuevo policétido (Gokhale et al. 1999; McDaniel et al. 1999) o péptido no ribosomal. Como fue mencionado anteriormente para las secuencias de cetosintasas, el reconocer la diversidad de las secuencias que conforman a los dominios A en el ambiente es importante para el descubrimiento de nuevos fármacos.

3. JUSTIFICACIÓN

En los últimos años, la investigación relacionada con producción de metabolitos secundarios sintetizados por microorganismos terrestres, especialmente del género *Streptomyces* ha sido muy amplia, sin embargo, el hallazgo de moléculas nuevas ha disminuido o se ha encontrado que tienen funciones similares a las ya reportadas. La búsqueda y el descubrimiento de actinomicetos raros y nuevos es de especial importancia para el descubrimiento de nuevos fármacos, debido a la creciente necesidad de desarrollar nuevos y potentes agentes terapéuticos. Por esta razón, la búsqueda de actinomicetos con potencial de producción de productos naturales se ha centrado en nichos no convencionales (Gulder y Moore, 2009; Meyer et al, 2011), como los ambientes marinos.

Los actinomicetos marinos, presentan un gran potencial para la producción de nuevos metabolitos secundarios con actividad antibiótica no observada en actinomicetos terrestres (Jadón et al., 2014; Berdy, 2005) por lo tanto, han acaparado la atención de la investigación y desarrollo de productos naturales marinos, en especial los actinomicetos raros responsables de la producción de 3,500 metabolitos bioactivos (Berdy, 2015).

Debido a esto, explorar nuevas áreas marinas puede traducirse nuevos productos biotecnológicos que generen procesos más eficientes y ambientalmente amigables, incluyendo la diversidad y disponibilidad de genes PKS y NRPS. Uno de estos ambientes son las costas de Yucatán que se encuentran prácticamente inexploradas. Solo existen algunos trabajos en sedimentos del acuífero subterráneo de Yucatán realizado por De la Rosa y Gamboa (2004), aislando actinomicetos y hongos filamentosos. Maldonado et al. (2008) realizó aislamientos de microorganismos pertenecientes a la clase *Actinobacteria* en el Golfo de México y en el Golfo de California. De igual manera, Becerril- Espinosa (2013) realizó aislamientos e identificaciones de cepas del orden de los *Actinomycetales*, llevando a cabo pruebas de bioactividad con extractos orgánicos. Asimismo, Marfil-Santana (2016) realizó una búsqueda de comunidades microbianas con potencial de producción de metabolitos secundarios presentes en el acuífero de Yucatán.

Con el presente trabajo, se pretende realizar una contribución científica mediante la primera descripción en México de la diversidad genómica de PKS /NRPS de actinomicetos marinos aislados en sedimentos de la zona costera de Yucatán mediante la amplificación, identificación y estudio de la diversidad filogenética de estos genes en varias cepas de *Streptomyces* y actinomicetos raros.

4. HIPÓTESIS

Los actinomicetos aislados de la zona costera de la península de Yucatán tienen una alta diversidad de genes KS y genes A involucrados, respectivamente, en la síntesis de policétidos y péptidos no ribosomales

5. OBJETIVO GENERAL

Evaluar el potencial de producción de PKS y NRPS de cepas de actinomicetos aislados de la zona costera de Yucatán mediante la amplificación, identificación y estudio de la diversidad de genes KS y A en cepas aisladas.

5.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Determinar la cantidad de genes de PKS y NRPS presentes en 13 cepas de actinomicetos marinos de la península de Yucatán.

Caracterizar la diversidad de secuencias de los genes KS y A asociados a la producción de metabolitos secundarios presentes en cepas de actinomicetos y su relación evolutiva a los diversos compuestos a los que están relacionados mediante métodos filogenéticos

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Obtención de las muestras

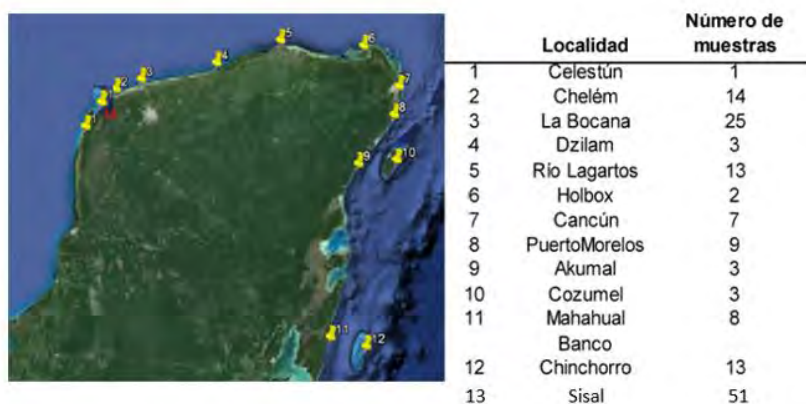


Figura 1. Zona de muestreo de la colección NCA de cepas de actinomicetos (Parera-Valadez, 2015)

El muestreo de los sedimentos pertenecientes a la zona de manglar se realizó en la Reserva Estatal El Palmar, perteneciente al Puerto de Sisal en la Península de Yucatán. Las zonas en las que se tomaron las muestras fueron en la parte de la raíz del mangle (R), afuera del mangle (A) y en el canal (C) (Figura 3)

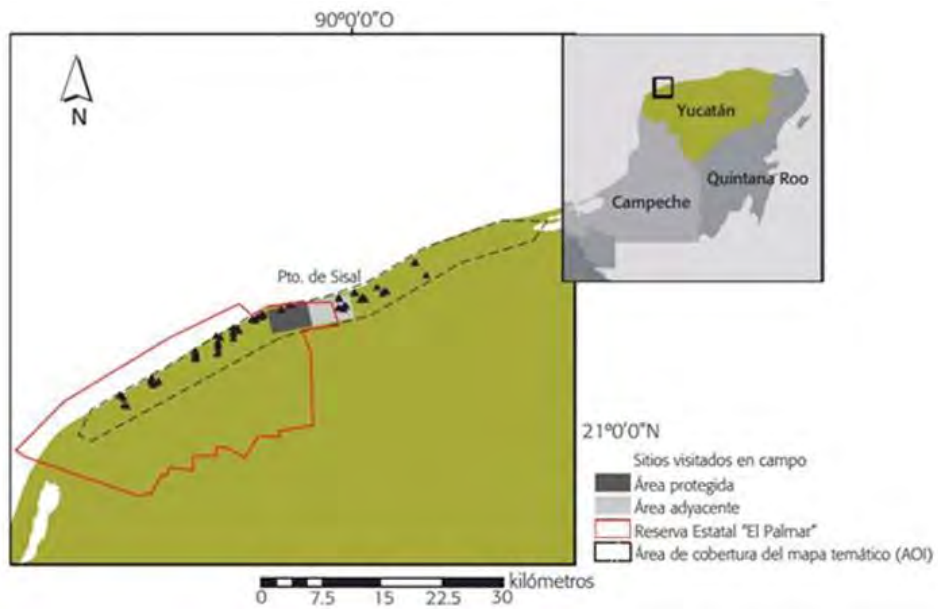


Figura 2. Localización de la Reserva Estatal El Palmar en el norte de la Península de Yucatán (Rioja-Nieto, 2015)



Figura 3. Zonas de muestreo en la Reserva Estatal El Palmar (Ruíz- Hernández, 2018.)
Tesis en proceso.

6.2 Reactivación de cepas y escrutinio de selección

Se reactivaron 2 cepas de *Streptomyces* y 11 cepas de actinomicetos raros, que son los actinomicetos que no pertenecen al género *Streptomyces*, (Berdy, 2015) pertenecientes a la colección del Laboratorio de Ecología Microbiana y Productos Naturales Marinos NCA (Número de Colección A) de la Facultad de Química, Unidad Académica Sisal, que se colectaron en un proyecto anterior (Parera-Valadez, 2015) y a la que corresponden a los siguientes géneros: *Streptomyces lusitanus* (NCA 005) y *Streptomyces albogriseolus* (NCA 008), *Saccharopolyspora tripterygii* (NCA 023), *Saccharomonospora xinjiangensis* (NCA 025), *Nocardiopsis* sp. (NCA 034), *Salinispora arenicola* (NCA 041), *Jiangella gansuensis* (NCA 042), *Nocardiopsis dassonvillei* subsp. *Albirubida* (NCA 044), *Pseudonocardia alni* (NCA 045), *Pseudonocardia antitumoralis* (NCA 046), *Salinispora tropica* (NCA 047), *Jiangella gansuensis* (NCA 050) y *Actinomadura livida* (NCA 064). Como primer escrutinio de selección, se realizaron ensayos de antagonismo entre cepas aisladas del manglar, y aquellas que mostraron actividades como inhibición de crecimiento o inhibición de esporulación, fueron posteriormente procesadas para obtener el extracto con solventes orgánicos como acetato de etilo, acetona y metanol. Una vez obtenidos los extractos orgánicos, se realizaron ensayos de difusión en disco, probando los extractos contra cepas aisladas de manglar. De manera paralela, se realizaron ensayos para determinar la actividad de los extractos de las cepas seleccionadas contra patógenos por medio de bioautografías (Colorado et al., 2007). Los patógenos que fueron utilizados fueron *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus*. Adicionalmente se realizó la prueba del KOH al 3%(cita) para discriminar entre bacterias Gram positivas y Gram negativas y aislar las primeras utilizando el método de siembra en estría en medio marino A1. Cada cepa seleccionada se transfirió por separado a un matraz Erlenmeyer de 125 ml con 50 ml de medio marino A1, preparado con 10 g de almidón, 4 g de extracto de levadura y 2 g de peptona en 1 L de agua de mar filtrada.

6.3 MÉTODOS MOLECULARES

6.3.1 Extracción y cuantificación de ADN

Se realizó la extracción del ADN genómico de las 55 cepas previamente mencionadas con el *Quick-DNA™ Fungal/Bacterial Miniprep Kit* de Zymo de manera exitosa. La integridad del ADN fue evaluada mediante electroforesis en geles de agarosa al 1% teñidos con SYBR Green. La cuantificación de ADN se realizó haciendo una dilución 1:5 con agua de grado molecular y leída en el equipo Nanodrop 2000c.

6.3.2 Escrutinio de cepas por medio de amplificación de fragmentos KS.

Los oligonucleótidos empleados para amplificar un fragmento del gen KS a partir de ADN genómico de las 55 cepas fueron los siguientes: KI (5'-TSAAGTCSAACATCGGBCA-3') M6R (5'-CGCAGGTTSCSGTACCAGTA-3') (Ayuso-Sacido et al., 2005); 5LL (5' GGRTCNCCIARYTGIGTICCGTICCRTGIGC-3') y 4UU (5' MGIGARGCIYTICARATGGAYCCICARCARMG 3') Parsley et. al., (2011); KPF (5' GTGCCGGTNC CRTGNGYYTC 3') y KPR (5' GCGATGGGAYCCNCARCARYG 3') sugeridos por Moffitt y Neilan (2001); KSF (5' GCNATGGAYCCNCARCARMGNVT 3') y KS (GTNCCNGTNC CRTGNSCYCYTCNAC 3') sugeridos por Schimer et al. (2005).

6.3.3 Segundo escrutinio; amplificación de fragmentos pertenecientes al dominio KS en PKS para secuenciación de amplicones.

De las 55 cepas aisladas inicialmente, se seleccionaron 32 cepas con base en los resultados obtenidos por la amplificación del fragmento perteneciente al dominio KS, a la calidad del ADN y a su actividad inhibitoria (aparición de halo de inhibición). Las cepas escogidas fueron las siguientes: *Streptomyces lusitanus* (NCA 005), *Streptomyces albogriseolus* (NCA 008), *Saccharopolyspora tripterygii* (NCA 023), *Saccharomonospora xinjiangensis* (NCA 025), *Nocardiosis* sp. (NCA 034), *Nocardiosis dassonvillei* subsp. *albirubida* (NCA 044), *Pseudonocardia alni* (NCA 045) y *Pseudonocardia antitumoralis* (NCA 046), las cuales fueron identificaron previamente por secuenciación del gen ADNr 16S (Parera- Valadez, 2015). Las cepas pertenecientes a la colección A (NCA) con los números de identificación 109, 115, 116, 117, 119, 121, 123, 127, 128, 129 131, 137, 138, 139, 140, 142, 143, 144 , 145, 146 149, 151 y 157 no han sido identificadas por secuenciación del gen ADNr 16S, pero se presume que son cepas que pertenecen al filo

de los actinomicetos de acuerdo a lo sugerido en la literatura relacionado a morfología presentada por las cepas (Jensen et al., 1991; Prieto-Davó et al., 2008).

6.3.4 Secuenciación masiva de amplicones de dominios KS en PKS y dominios A en NRPS

La preparación de las 32 muestras para llevar a cabo la secuenciación de amplicones pertenecientes a fragmentos de los dominios KS y A en PKS y NRPS respectivamente, se realizó en el laboratorio Genetically Encoded Small Molecules, en The Rockefeller University, bajo la tutela del Dr. Sean F. Brady. A continuación, se describe el proceso de amplificación y secuenciación masiva de amplicones.

6.3.5 Primera amplificación de PCR con primers degenerados

Las 32 cepas de actinomicetos fueron sometidas a un proceso de PCR para amplificar los fragmentos de los dominios A en NRPS con los siguientes primers degenerados: AD01F (5'GCSTACSYSATSTACACSTCSGG), AD01R (5'SASGTCVCCSGTSCGGTA), con un tamaño de amplicón de ~ 800bp. Asimismo, se amplificaron fragmentos pertenecientes al dominio KS en PKS con los siguientes pares de primers degenerados: KS01F (5'GCNATGGAYCCNCARCARMGNVT), KS01R (5'GTNCNNGTNC CRTGN SCYTCNAC) con un tamaño de amplicón de ~ 800 pb. Las condiciones de reacción para un volumen final de 20 µl por muestra fueron: 10 µl Buffer G (2X) para PCR Master Mix (Lodo Therapeutics Corporation), 1.6 µl de cebador *Forward* (10 µM), 1.6 µl de cebador *Reverse* (10 µM), 0.2µl de OmniTaq DNA Polymerase 5u/µl, 1 µl de la muestra de ADN y 5.6 µl de agua MilliQ. El programa utilizado fue el siguiente: 5 min a 95°C, 39 ciclos de 30 s a 95°C, 30 s a 55°C, 1 min a 72°C y finalmente 7 min a 72°C, para después mantener por tiempo definido 14°C una vez que acabaron los ciclos.

6.3.6 PCR con cebadores marcados (*barcoded primers*)

Para permitir la secuenciación en paralelo de amplicones de cada una de las 32 muestras, se decidió adoptar una estrategia propuesta por Charlop- Powers *et al.*, (2016) que

consiste en el diseño de cebadores marcados (*barcoded primers*). Esta estrategia añade a cada cebador 5' (F) y 3' (R) una secuencia única de 8 pb que, en conjunto, pueden usarse para identificar a cada muestra.

Tabla 1. Ejemplo de ensamblado de secuencias de cebadores con los marcadores y espaciadores *Forward Reverse*.

ORDEN DE LA PLACA: 32 CEPAS

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	NCA005	NCA008	NCA023	NCA025	NCA034	NCA044	NCA045	NCA046	NCA109	NCA115	NCA116	NCA117
B	NCA119	NCA121	NCA123	NCA127	NCA128	NCA129	NCA131	NCA137	NCA138	NCA139	NCA140	NCA142
C	NCA143	NCA144	NCA145	NCA146	NCA147	NCA149	NCA151	NCA157				

MARCADORES AD01F /AD01R

Marcadores	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	F01 & R01	F02 & R01	F03 & R01	F04 & R01	F05 & R01	F06 & R01	F07 & R06	F08 & R06	F09 & R06	F10 & R06	F11 & R06	F12 & R06
B	F01 & R02	F02 & R02	F03 & R02	F04 & R02	F05 & R02	F06 & R02	F07 & R07	F08 & R07	F09 & R07	F10 & R07	F11 & R07	F12 & R07
C	F01 & R03	F02 & R03	F03 & R03	F04 & R03	F05 & R03	F06 & R03	F07 & R08	F08 & R08				

Nombre Cebador <i>Forward</i>	Columna	Marcador <i>Forward</i>	Espaciador <i>Forward</i>	Secuencia cebador <i>Forward</i>
Brady2017_ADF01	1	TATCAGCA	A	GCSTACSYSATSTACACSTCSGG
Brady2017_ADF02	2	TGGAACAA	TC	GCSTACSYSATSTACACSTCSGG
Brady2017_ADF03	3	CAATGGAA	CTA	GCSTACSYSATSTACACSTCSGG
Brady2017_ADF04	4	GAGTGAA	GATA	GCSTACSYSATSTACACSTCSGG

Nombre Cebador <i>Reverse</i>	Fila	Marcador <i>Reverse</i>	Espaciador <i>Reverse</i>	Secuencia Cebador <i>Reverse</i>
Brady2017_ADR01	A	CTGTAGCC	A	SASGTCVCCSGTSCGGTA
Brady2017_ADR02	B	ACGCTGGA	TC	SASGTCVCCSGTSCGGTA
Brady2017_ADR03	C	CAGCGTTA	GTA	SASGTCVCCSGTSCGGTA
Brady2017_ADR04	D	AGTACAAG	GATA	SASGTCVCCSGTSCGGTA

Brady2017_ADF01: TATCAGCAAGCSTACSYSATSTACACSTCSGG

Brady2017_ADR01: CTGTAGCCASASGTCVCCSGTSCGGTA

● MARCADOR ● ESPACIADOR ● CEBADOR

El cebador también contiene una secuencia espaciadora, la cual es necesaria para minimizar los problemas causados por amplicones de baja diversidad de secuencia (Charlop- Powers *et al.*, 2016, Fadrosh *et al.*, 2014). La secuencia espaciadora permite que una proporción igual de muestras sea secuenciada de manera desfasada (Fadrosh *et al.*, 2014). Para consultar las secuencias de cebadores con los marcadores y espaciadores *Forward* y *Reverse* correspondientes, consultar el Anexo 1.

6.3.7 Pooling y primera limpieza de productos de PCR

Una vez realizada la amplificación de los fragmentos, se realizó el *pool* de amplicones en un tubo Eppendorf de 1.5 ml tomando la totalidad de la muestra del producto de PCR (20

μl). Éste *pooling* se llevó a cabo por cada par de primers degenerados utilizados. La limpieza de los productos de PCR se llevó a cabo con kit NucleoSpin® Gel and PCR clean-up, de Macherey-Nagel. El DNA fué eluído en 30 μl de buffer NE (buffer de elución) para los *pools* AD01 y KS01.

6.3.8 Cuantificación por Fluorometría con Qubit

Las muestras fueron sometidas a medición fluorométrica utilizando el Qubit dsDNA HS Assay kit (Invitrogen) por ser un método que es mucho más sensible en cuanto a precisión de detección de contaminantes y/o fragmentos pequeños de ADN que los métodos cuantificadores por absorbancia UV. Se utilizaron 199 μl de HS Buffer, 1 μl de reactivo y 0.2 μl de DNA. Las mediciones obtenidas por cada *pool* de amplicones fueron 66.1 ng/μl para el *pool* AD01 y 70.0 ng/μl para el *pool* KS01.

6.3.9 Dilución de muestras para medición y análisis por Agilent 4200TapeStation

Una vez obtenida la cuantificación por Qubit®, se diluyeron cada una de las 4 muestras de *pool* de amplicones con agua Millipore hasta alcanzar una concentración de 2-4 ng/μl. Se necesitó un volumen final de al menos 4 μl por muestra para su procesamiento y medición de concentración de alta calidad por Agilent 4200 *TapeStation*. Las concentraciones obtenidas fueron 71.8 nanomoles (nM) para el *pool* AD01 y 39.6 nM para el *pool* KS01.

6.3.10 Segunda amplificación de PCR para secuenciación: Adaptadores Illumina MiSeq

Los 2 *pools* de amplicones (AD01, KS01) fueron sometidos a una segunda amplificación para anexar los adaptadores Illumina. Se utilizó un índice *forward* y 2 índices *reverse* idxR5 (AD01) e idxR6 (KS01) para distinguir entre *pools*. Los adaptadores Illumina MiSeq tienen las siguientes secuencias: *Forward* (5'CTACACGACGCTCTTCCGATCT) y *Reverse* (5'CAGACGTGTGCTCTTCCGATCT). Las condiciones para la segunda amplificación fueron las siguientes: 80 μl de Buffer G (2X) para PCR Master Mix (Lodo

Therapeutics Corporation), 3.2 μl de adaptador Illumina MiSeq *Forward*, 3.2 μl de índice Illumina MiSeq *Reverse*, 3.2 μl de rTaq DNA Polymerase 5u/ μl , 20 μl de producto de PCR de la reacción anterior y 50.4 μl de agua MilliQ. El programa utilizado fue el siguiente: 5 min a 95°C, 6 ciclos de 30 s a 95°C, 30 s a 70°C, 1 min a 72°C y finalmente 7 min a 72°C, para después mantener por tiempo definido 14°C una vez que acabaron los ciclos.

6.3.11 Pooling y segunda limpieza de productos de PCR

Una vez realizada la amplificación de los fragmentos, de nuevo los 20 μl de cada amplicón se juntaron en un solo *pool* en un tubo Eppendorf de 1.5 ml. Éste proceso se llevó a cabo por cada par de primers degenerados utilizados. La limpieza de los productos de PCR se llevó a cabo con kit NucleoSpin® Gel and PCR clean –up, de Macherey-Nagel. El DNA fué eluído en 20 μl de buffer NE (buffer de elución). En este punto, se tiene el fragmento de DNA que corresponde a la secuencia del primer, la secuencia espaciadora, los marcadores, los índices y adaptadores Illumina.

6.3.12 Segunda cuantificación por Fluorometría con Qubit

Las muestras fueron sometidas a una segunda medición fluorométrica utilizando el Qubit dsDNA HS Assay kit (Invitrogen). Se utilizaron 199 μl de HS Buffer, 1 μl de reactivo y 0.2 μl de DNA. Las mediciones obtenidas por cada *pool* de amplicones fueron las siguientes: AD01: 220.0 ng/ μl y KS01: 233.0 ng/ μl .

6.3.13 Segunda dilución de muestras para medición y análisis por TapeStation

Una vez obtenida la cuantificación por Qubit®, se diluyeron por segunda ocasión cada una de las muestras de *pool* de amplicones con agua Millipore hasta alcanzar una concentración de 2-4 ng/ μl . Se necesitó un volumen final de al menos 4 μl por muestra para su procesamiento. Las mediciones de molaridad obtenidas en el TapeStation fueron tomadas, y dado que están dadas en valores picomolares (pM), fueron divididas entre 1000 para obtener valores nanomolares (nM).

6.3.14 Normalización de las muestras y pooling

Se calculó la dilución con buffer TE de cada uno de los *pools* de amplicones a 4 nM, que es la molaridad sugerida por Illumina antes de iniciar la desnaturalización y los subsecuentes pasos de dilución para la secuenciación con Reagent Kit V3. Una vez normalizados los 2 *pools*, se realizó un *pooling* adicional, en el cual se juntaron ambos *pools* (AD01, KS01). Para determinar el porcentaje del volumen total que ocuparon las muestras en el proceso de secuenciación masiva, se realizaron cálculos para determinar el volumen total del *pool* normalizado que dará como resultado el número de lecturas deseadas por *pool*.

6.3.15 Preparación de la plataforma MiSeq

Una vez lista la normalización y el *pool* a 4 nM, se realizaron los lavados necesarios al equipo Illumina MiSeq, y el Reagent Kit V3 fue extraído de su almacenamiento a -20°C. Se siguieron las instrucciones de manual de Illumina para la preparación de las librerías para secuenciación por MiSeq, las cuales incluyen la preparación de una solución 0.2 N NaOH el mismo día de la secuenciación. El *pool* final del paso anterior de 4 nM se diluyó hasta alcanzar una concentración de 15 pM y de éste, se tomaron 5 µl para la secuenciación por MiSeq.

Entre los reactivos que extrajeron de almacenamiento a -20 C, se encuentra el control PhiX. El control PhiX v3 es una biblioteca confiable, ligada a adaptadores que es utilizada como control para realización de la secuenciación de Illumina. La biblioteca se deriva del genoma PhiX, que es un genoma pequeño y bien caracterizado, y ofrece varios beneficios para la secuenciación y la alineación de secuencias. La utilidad de la biblioteca PhiX es proporcionar un control de calidad para la generación, secuenciación, alineación de *clústers* y ser control de calibración. Se puede alinear rápidamente para estimar la secuencia relevante mediante métricas de síntesis (SBS) como la fase (*phasing*) y la tasa de error. Se realizó la dilución del control PhiX a 15 Pm, e inmediatamente después se llevó a cabo la combinación de la librería y del PhiX ya diluido. Una vez finalizado éste paso, se cargó la librería dentro del cartucho de reactivos de Illumina y se llevó a cabo la secuenciación. Se decidió utilizar el Reagent Kit V3 por presentar una química mejorada que aumenta a densidad de clusters y la longitud de las lecturas, así como mejorar los puntajes de calidad (Q).

6.3.16 Obtención y limpieza de las secuencias

Las secuencias resultantes del proceso de secuenciación de amplicones fue tipo *pair-ending* de 300 pb, y ambas lecturas, 1 y 2 (*Read 1* y *Read 2*) fueron obtenidas en dos archivos FASTQ, uno por cada *pool* de amplicones, y fueron sometidas a un proceso de limpieza con herramientas bioinformáticas utilizando líneas de comandos específicas para quitar los adaptadores e índices Illumina MiSeq, así como la secuencia espaciadora, para, finalmente dejar al fragmento de la secuencia únicamente con el marcador, lo que permitió identificar el origen de la cepa a la que pertenece.

6.3.17 Estandarización de las Secuencias

Las lecturas obtenidas como producto de la secuenciación fueron de 2 x 300 pb; sin embargo, se ha notado que partir de los 240 pb la fidelidad de la polimerasa disminuye, y aunado a deficiencias en el funcionamiento del Reagent Kit V3 e inespecificidades causadas por los cebadores degenerados utilizados, la calidad en general de la secuenciación se ve disminuída conforme la corrida avanza. Éste fenómeno afecta aún más al *Read 2*, el cuál ve disminuída la calidad de la secuenciación a los 150 pb. Debido a lo anterior, se utilizó sólo las lecturas 1 (*Read 1*) obtenidas, y fueron estandarizadas a 240 pb con el propósito de mantener veracidad en los resultados obtenidos para análisis de diversidad.

6.4 ALINEAMIENTO DE SECUENCIAS

El alineamiento de las secuencias se llevó a cabo con el software MEGA 7.0, mediante MUSCLE (MULTiple Sequence Comparison by Log-Expectation) (Edgar, 2004) con los valores asignados por *defecto*. Cabe mencionar que las únicas secuencias que se utilizaron para realizar estudios de diversidad en éste estudio son las secuencias de dominios KS y A pertenecientes a las cepas de actinomicetos que se encuentran identificadas por el gen ADNr 16S (Parera- Valadez, 2015), entre las cuales se encuentran: *Streptomyces lusitanus* (NCA 005), *Streptomyces albogriseolus* (NCA 008), *Saccharopolyspora tripterygii* (NCA 023), *Saccharomonospora xinjiangensis* (NCA 025), *Nocardiopsis* sp. (NCA 034), *Nocardiopsis dassonvillei* (NCA 044), *Pseudonocardia alni*

(NCA 045) y *Pseudonocardia antitumoralis*(NCA 046). Las secuencias fueron traducidas de nucleótidos a aminoácidos y, de igual manera, se determinó el marco de lectura correcto con el software Geneious R11.

Para llevar a cabo el alineamiento de fragmentos de secuencias de dominios KS, fueron incluidas las secuencias referencia de la base de datos NaPDoS (Natural Product Domain Seeker) (Ziemert et al., 2012), pertenecientes a dominios KS de policétido sintasas tipo modular, y en el caso de fragmentos de secuencias de dominios A, se incluyeron como secuencias referencia las pertenecientes a la base de datos eSNaPD (Environmental Surveyor of Natural Product Diversity) (Reddy et al., 2014) pertenecientes a dominios de adenilación de sintasas de péptidos no ribosomales.

Con el propósito de tener una secuencia referencia de anclaje para realizar los cortes de las secuencias a 240 pdb, se utilizó, en el caso del alineamiento del dominio de la cetosintasa, una secuencia de KS completa de la base de datos NaPDoS, y ésta fue utilizada para realizar los cortes de las secuencias de referencia y las de los grupos externos de la misma base de datos. En el caso del corte de las secuencias del dominio de adenilación, se obtuvo la secuencia completa del dominio A del buscador UniProt, y ésta fue utilizada como secuencia de anclaje para realizar los cortes a 240 pdb de las secuencias de referencia y los grupos externos una vez alineados por MUSCLE.

6.4.1 Análisis BLAST en NCBI: Búsqueda de secuencias de cetosintasas y adenilasas

Para realizar las comparaciones de las secuencias de los fragmentos de KS y A obtenidas de las secuencias asociadas a dominios de KS de PKS y A de NRPS reportadas en la base de datos del GenBank, se realizó un análisis BLASTx del Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) (Altschul et al. 1990) en el sitio web del National Center for Biotechnology Information (NCBI) (www.ncbi.nlm.nih.gov/).

6.4.2 ANALISIS BLAST en NaPDoS y eSNaPD

Para realizar las comparaciones de las secuencias de los fragmentos de cetosintasas y adenilasas obtenidas y de las secuencias reportadas pertenecientes a dominios de

cetosintasas y adenilasas asociadas con productos naturales conocidos, se llevó a cabo una comparación con las bases de datos de la plataforma bioinformática NaPDoS y, en el caso de los dominios de adenilación, con la base de datos del eSNaPD utilizando la herramienta bioinformática prfectBLAST (Santiago-Sotelo et al., 2012)

6.5 ANÁLISIS FILOGENÉTICO

Una vez realizado el alineamiento de las secuencias de los dominios de las cetosintasas y adenilasas, se llevó a cabo una curación de las mismas con el programa GBLOCKS, el cual elimina posiciones de alineamiento deficientes, así como las regiones muy divergentes de los alineamientos de secuencias de ADN o proteínas. GBLOCKS selecciona bloques o secciones conservadas del alineamiento múltiple de acuerdo a una serie de características que presenten las posiciones del alineamiento. Una vez realizada la curación, se utilizó el software FastTree 2.1 (Price et al., 2009) para hacer el análisis de reconstrucción filogenética. El software utilizó el método estadístico Maximum Likelihood con el modelo de sustitución de aminoácidos Jones- Taylor Thornton con el método heurístico Nearest- Neighbor-Interchange (NNI). Como índice de confianza, el software utilizó la prueba Shimodaira- Hasegawa (SH), con un remuestreo de 1000 repeticiones y 100 *bootstraps*.

7. RESULTADOS

7.1 SELECCIÓN DE CEPAS

Las cepas que fueron seleccionadas con base en los criterios anteriormente mencionados se muestran en la siguiente tabla:

Tabla 2. Cepas de actinomicetos pertenecientes a la colección del Laboratorio de Ecología Microbiana y productos naturales marinos de la Unidad Académica Sisal, UNAM

NCA	Especie
NCA 005	<i>Streptomyces lusitanus</i>
NCA 008	<i>Streptomyces albogriseolus</i>

Streptomyces

NCA	Especie
NCA 023	<i>Saccharopolyspora tripterygii</i>
NCA 025	<i>Saccharomonospora xinjiangensis</i>
NCA 034	<i>Nocardioopsis sp.</i>
NCA 041	<i>Salinispora arenicola</i>
NCA 042	<i>Jiangella gansuensis</i>
NCA 044	<i>Nocardioopsis dassonvillei</i>
NCA 045	<i>Pseudonocardia alni</i>
NCA 046	<i>Pseudonocardia antitumoralis</i>
NCA 047	<i>Salinispora tropica</i>
NCA 050	<i>Jiangella gansuensis</i>
NCA 064	<i>Actinomadura livida</i>

Actinomycetos Raros

7.2 EXTRACCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE ADN

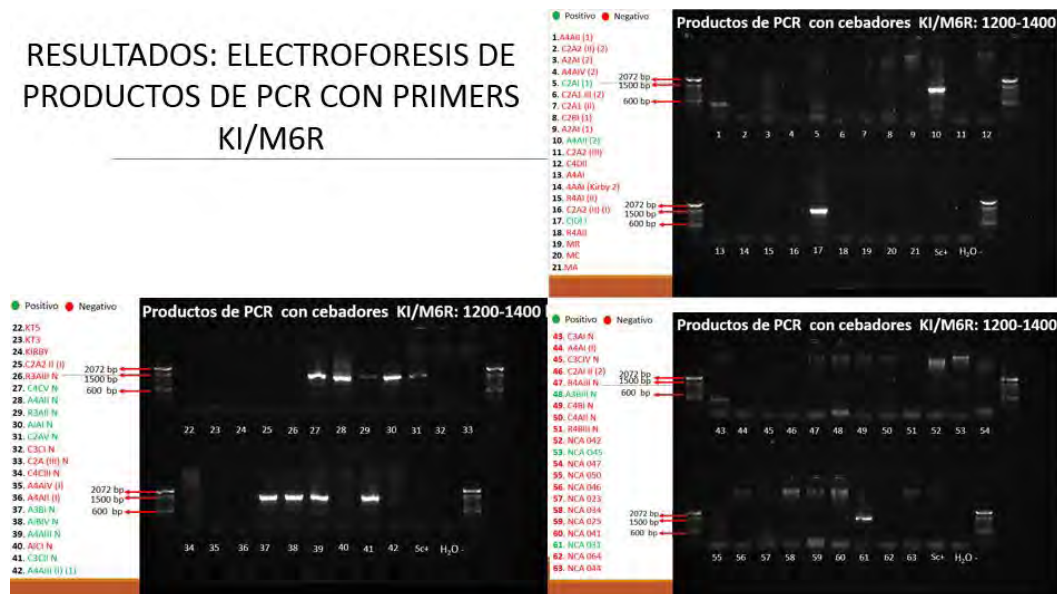
Tabla 2. Valores obtenidos por cepa de la cuantificación de ADN por Nanodrop 2000c.

NCA	ADN (ng/μl)
NCA 005	221.8
NCA 008	234.1
NCA 023	111.6
NCA 025	181.6
NCA 034	126
NCA 041	225.5
NCA 042	178
NCA 044	107.4
NCA 045	144.9
NCA 046	38.1
NCA 047	192.2
NCA 050	111.5
NCA 064	6.8

7.3 Resultados del primer escrutinio de cepas por medio de amplificación de fragmentos pertenecientes al dominio KS en PKS

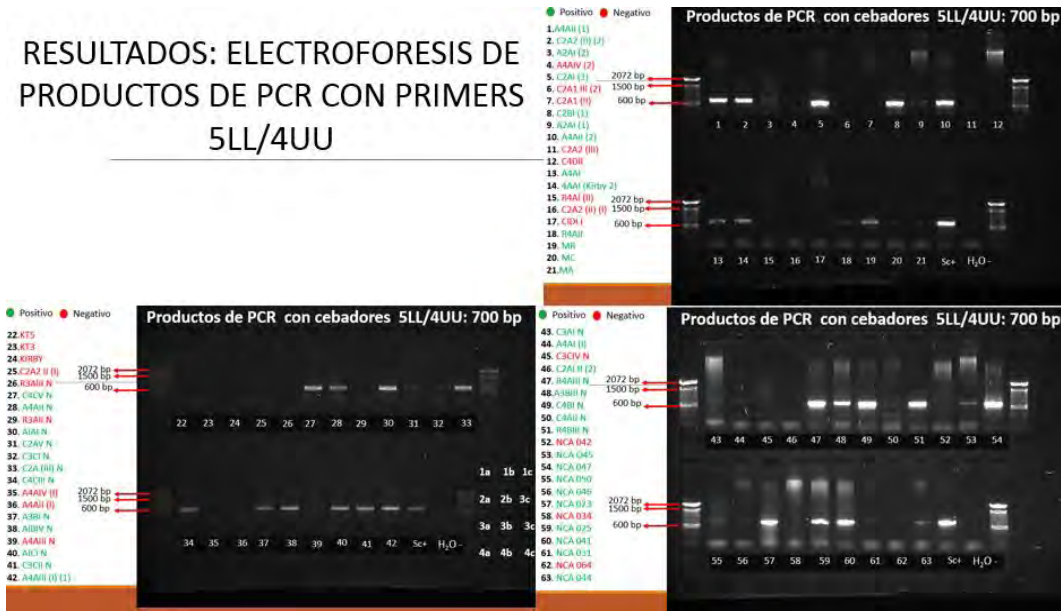
Los resultados de la amplificación del fragmento de KS en las cepas seleccionadas por medio de los pares de cebadores degenerados KI (5' TSAAGTCSAACATCGGBCA 3') M6R (5' CGCAGGTTSCSGTACCAGTA 3') (Ayuso-Sacido 2005); 5LL (5' GGRTCNCCIARYTGIGTICCICTICCRTGIGC 3') y 4UU (5' MGIGARGCIYTICARATGGAYCCICARCARMG 3') (Parsley *et. al.*, 2011); KPF (5' GTGCCGGTNC CRTGNGYYTC 3') y KPR (5' GCGATGGGAYCCNCARCARYG 3') sugeridos por Moffitt y Neilan (2001); KSF (5' GCNATGGAYCCNCARCARMGNVT 3') y KS (GTNCCNGTNC CRTGNSCYCYTCNAC 3') (Schimer *et al.* 2005) fueron los siguientes:

RESULTADOS: ELECTROFORESIS DE PRODUCTOS DE PCR CON PRIMERS KI/M6R



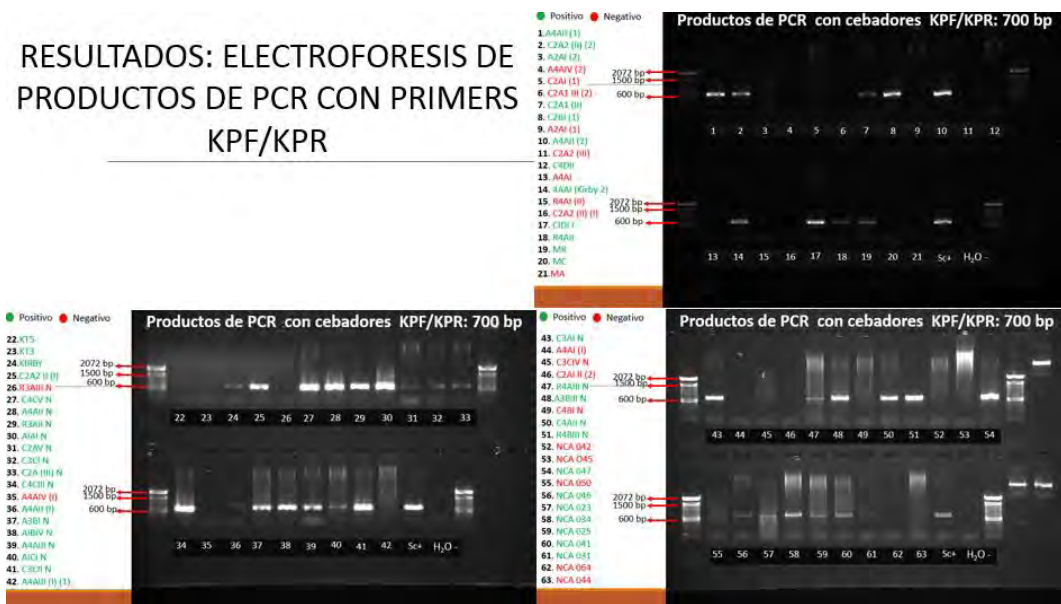
4)

RESULTADOS: ELECTROFORESIS DE PRODUCTOS DE PCR CON PRIMERS 5LL/4UU



5)

RESULTADOS: ELECTROFORESIS DE PRODUCTOS DE PCR CON PRIMERS KPF/KPR



6)

Figuras 4-6. Resultados de la amplificación del fragmento del dominio KS en los actinomicetos identificados NCA 005, NCA 008, NCA 023, NCA 025, NCA 034, NCA 041, NCA 042, NCA 044, NCA 045, NCA 046, NCA 047, NCA 050 y NCA 064 con los cebadores KI/M6R (Fig.4), 5LL/4UU (Fig. 5) y KPF/KPR (Fig. 6). En las imágenes se pueden observar los fragmentos de amplificación correspondientes a cepas adicionales en un proyecto paralelo.

De las 13 cepas probadas con los 3 pares de cebadores degenerados KI/M6R (1200-1400 pb); 5LL/4UU (~700 pb) y KPF/KPR (~700 pb), únicamente 8 cepas resultaron positivas para la amplificación del fragmento de KS.

7.4 Resultados del segundo escrutinio de cepas por medio de amplificación de fragmentos pertenecientes al dominio KS y A para secuenciación de amplicones.

Las cepas que fueron seleccionadas para la amplificación del dominio KS en PKS y dominio A en NRPS fueron las siguientes: *Streptomyces lusitanus* (NCA 005), *Streptomyces albogriseolus* (NCA 008), *Saccharopolyspora tripterygii* (NCA 023), *Saccharomonospora xinjiangensis* (NCA 025), *Nocardiopsis* sp. (NCA 034), *Nocardiopsis dassonvillei* subsp. *albirubida* (NCA 044), *Pseudonocardia alni* (NCA 045) y *Pseudonocardia antitumoralis* (NCA 046).



Figura 7. Cepas seleccionadas para secuenciación de amplicones. En el cuadro amarillo se observa el ADN de las cepas NCA 005, NCA 008, NCA 023, NCA 025, NCA 034, NCA 044, NCA 045 y NCA 046. En la imagen se puede observar muestras de ADN correspondientes a cepas adicionales en un proyecto paralelo.

7.5 Resultados de la primera amplificación de PCR con primers degenerados

En la figura 8 se pueden observar los fragmentos amplificados pertenecientes a los dominios A (AD01) y KS (KS01) en las 8 cepas aisladas.



Figura 8. Geles de agarosa al 1% con amplificación de los fragmentos con los primers AD01F/AD01R y KS01F/KS01R. En el cuadro amarillo se observan los amplicones de las cepas NCA 005, NCA 008, NCA 023, NCA 025, NCA 034, NCA 044, NCA 045 y NCA 046. En la imagen también se puede observar fragmentos de amplificación correspondientes a cepas adicionales en un proyecto paralelo.

7.6 Resultados de la Segunda dilución de muestras para medición y análisis por TapeStation

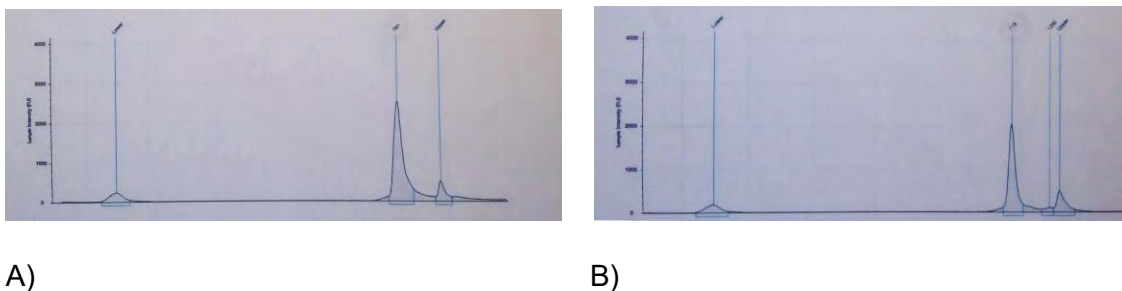


Figura 9. Valores obtenidos de la cuantificación por TapeStation. En la figura A se observa que el pico que muestra el tamaño en pares de bases del amplicón obtenido del *pool* AD01 (761 pb), mientras que en la figura B se muestra el tamaño en pares de bases

del amplicón obtenido del *pool* KS01 (718 pb). Estos valores nos indican que el tamaño del amplicón obtenido, su pureza y su cuantificación son los adecuados para realizar el proceso de secuenciación de manera confiable.

7.7 ALINEAMIENTO DE SECUENCIAS

Una vez obtenidos los alineamientos de los aminoácidos realizados por MUSCLE, se realizó una curación manual de las 124 secuencias de KS y de las 81 secuencias de dominios de adenilación obtenidas de la secuenciación debido a que algunas secuencias obtenidas presentaron ausencia de los motivos conservados AMDPQQ en secuencias de cetosintasas y TSGSTG en las de adenilación. La presencia de codones de paro o presencia de secuencias cortas por errores durante la secuenciación. Como resultado, se obtuvieron un total de 122 secuencias pertenecientes a dominios KS de PKS, y 78 secuencias pertenecientes a dominios A de NRPS de 8 cepas de actinomicetos como *Streptomyces lusitanus* (NCA 005), *Streptomyces albogriseolus* (NCA 008), *Saccharopolyspora tripterygii* (NCA 023), *Saccharomonospora xinjiangensis* (NCA 025), *Nocardiopsis* sp. (NCA 034), *Nocardiopsis dassonvillei* (NCA 044), *Pseudonocardiaalni* (NCA 045) y *Pseudonocardia antitumoralis*(NCA 046).

7.8 BLAST NCBI

Las 122 secuencias de dominios KS y las 78 secuencias de dominios A fueron comparadas contra la base de datos del GenBank, y como resultado se obtuvieron los valores de porcentajes de identidad y los números de acceso. Se determinó la homología con la secuencia más cercana tomando la secuencia que mostró el valor más alto en cuanto a porcentaje de identidad. Los resultados de dicha comparación se muestran en el Anexo 1.

7.9 BLAST NaPDoS/ eSNaPD

Las 122 secuencias de dominios KS y las 78 secuencias de dominios A fueron comparadas contra las bases de datos de las plataformas NaPDoS y eSNaPD. Asimismo, se determinó la homología con la secuencia más cercana tomando la secuencia que

mostró el valor más alto en cuanto a porcentaje de identidad. Los resultados se muestran en el Anexo 2.

8. ANÁLISIS FILOGENÉTICO

Las 122 secuencias pertenecientes a dominios KS de PKS y las 78 secuencias pertenecientes a dominios A de NRPS obtenidas de la secuenciación de amplicones están distribuidas por microorganismo de la siguiente manera:

Tabla 3. Distribución del número de fragmentos obtenidos de secuencias del dominio cetosintasa (KS) y adenilasa (A) por microorganismo.

Identificación NCA	Secuencias KS	Secuencias A
<i>Streptomyces lusitanus</i> (NCA 005)	23	11
<i>Streptomyces albogriseolus</i> (NCA 008)	17	12
<i>Saccharopolyspora tripterygii</i> (NCA 023)	14	4
<i>Saccharomonospora xinjiangensis</i> (NCA 025),	24	6
<i>Nocardiopsis</i> sp. (NCA 034),	8	13
<i>Nocardiopsis dassonvillei</i> (NCA 044)	12	11
<i>Pseudonocardia alni</i> (NCA 045)	7	6
<i>Pseudonocardia antitumoralis</i> (NCA 046)	17	15

8.1 Análisis filogenético del dominio KS: NaPDoS



Figura 10. Análisis filogenético mediante el método estadístico Maximum Likelihood, con secuencias de 80 aminoácidos, mediante el modelo de sustitución Jones-Taylor Thornton con Nearest Neighbor Interchange (NNI), con prueba de confianza Shimodaira- Hasegawa con 1000 repeticiones y 100 *bootstraps*. Se observan los fragmentos de los dominios cetosintasa y su relación de homología con las secuencias de productos naturales relacionados con dominios cetosintasa del NaPDoS (Ziemert et al., 2012). En color rojo se observan las secuencias de cetosintasas (KS); en turquesa las secuencias de antibióticos; en morado las secuencias de antitumorales; en verde las secuencias de antifúngicos; en magenta las secuencias de neurotoxinas; en olivo se muestran las secuencias de compuestos inmunosupresores; en azul las secuencias de inhibidores de la cadena transportadora de electrones (CTE); en naranja las secuencias de compuestos antihelmínticos; en amarillo las secuencias de inhibidores enzimáticos y en negro la secuencia del grupo externo (PKS tipo II). Asimismo, se pueden observar algunos ejemplos de clados numerados, los cuales contienen la(s) secuencia(s) de KS de interés con su secuencia de compuesto homólogo en NaPDoS.

La figura 10 corresponde al árbol filogenético obtenido del alineamiento resultante entre las 122 secuencias de dominios KS obtenidas (rojo) y 77 secuencias referencia provenientes de la base de datos NaPDoS (colores). En el árbol se pueden observar 4 secuencias que corresponden a dominios KS de los actinomicetos identificados como *Streptomyces*, *Saccharopolyspora*, *Saccharomonospora*, *Nocardiopsis* y *Pseudonocardia*, las cuales están relacionadas filogenéticamente a secuencias de antibióticos (i.e. grupo1); 4 secuencias correspondientes a los géneros *Pseudonocardia* y *Streptomyces* están relacionadas filogenéticamente con secuencias pertenecientes a neurotoxinas (i.e. grupo 2); 15 secuencias pertenecientes a los géneros *Streptomyces*, *Saccharopolyspora*, *Saccharomonospora*, *Nocardiopsis* y *Pseudonocardia* que están relacionadas filogenéticamente con secuencias de familias de compuestos antifúngicos (i.e. grupo 3). El género *Nocardiopsis* presenta una secuencia relacionada filogenéticamente con compuestos de naturaleza inmunosupresora (i.e. grupo 4). Finalmente, se pueden observar 56 secuencias pertenecientes a dominios KS sin secuencia reportada formando clados propios (*).

8.2 Análisis filogenético del dominio A: eSNaPD

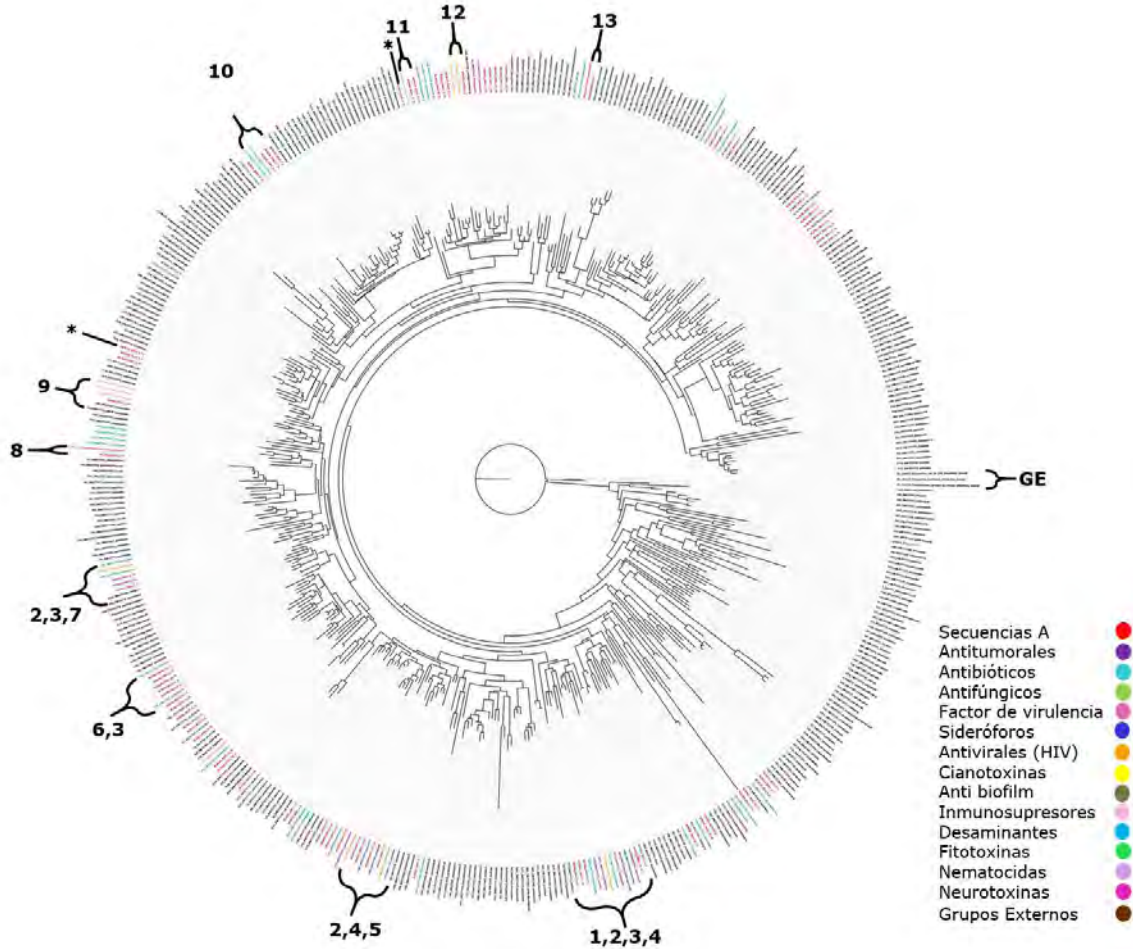


Figura 11. Análisis filogenético mediante el método estadístico Maximum Likelihood, con secuencias de 80 aminoácidos, mediante el modelo de sustitución Jones-Taylor Thornton con Nearest Neighbor Interchange (NNI), con prueba de confianza Shimodaira- Hasegawa con 1000 repeticiones y 100 *bootstraps*. Se observan los fragmentos de los dominios de adenilación y su relación de homología con las secuencias de productos naturales relacionados con dominios de adenilación del eSNaPD (Reddy et al., 2014). En el árbol se pueden observar las secuencias del dominio de adenilación de las 8 cepas de actinomicetos (rojo); las secuencias de antitumorales en color morado; en turquesa las secuencias de antibióticos; en verde las secuencias de antifúngicos; en rosa las secuencias de factores de virulencia; en azul oscuro las secuencias relacionadas con sideróforos; en color naranja las secuencias de compuestos antivirales (HIV); en amarillo las secuencias de cianotoxinas; en verde musgo las secuencias de compuestos anti biofilm; en rosa pastel los compuestos inmunosupresores; en azul cielo los compuestos desaminantes; en verde lima los compuestos fitotóxicos; en color lavanda los compuestos con acción nematocida y en magenta los compuestos neurotóxicos. Asimismo, se muestran las secuencias de los grupos externos (dominios de adenilación) de *E. coli*, *Shewanella* y *Pseudomonas*. También se pueden observar algunos ejemplos de clados

numerados, los cuales contienen la(s) secuencia(s) de adenilasas y la secuencia del compuesto homólogo en eSNaPD.

La figura 11 corresponde al árbol filogenético obtenido del alineamiento resultante entre las 78 secuencias de dominios A obtenidas de las 8 cepas de actinomicetos cultivados a partir de sedimentos costeros de la península de Yucatán y de las 391 secuencias referencia provenientes de la base de datos eSNaPD. En el árbol se pueden apreciar 24 secuencias del domino A presentes en los géneros *Streptomyces*, *Saccharomonospora*, *Nocardiopsis* y *Pseudonocardia*, las cuales están relacionados filogenéticamente a secuencias de la familia de compuestos antitumorales como bleomicina, safracina y pellasoren (i.e. grupo 1); 12 secuencias de dominios A que corresponden a actinomicetos de los géneros *Streptomyces*, *Saccharomonospora*, *Nocardiopsis* y *Pseudonocardia*, las cuales están relacionados filogenéticamente a secuencias de la familia de compuestos con acción antiviral (HIV y otros) como sporolida, y livipeptina (i.e. grupo 2); 44 secuencias correspondientes a dominios A en los géneros *Streptomyces*, *Saccharopolyspora*, *Saccharomonospora*, *Nocardiopsis* y *Pseudonocardia* que están relacionadas filogenéticamente con secuencias de la familia de los antibióticos como tambromicina (i.e. grupo 3).

Los géneros *Streptomyces*, *Saccharopolyspora*, *Saccharomonospora*, *Nocardiopsis* y *Pseudonocardia* presentan 23 secuencias relacionadas con la familia de los sideróforos, como scabichelina, eritrochelina y albachelina (i.e. grupo 4); los géneros *Streptomyces*, *Saccharomonospora* y *Nocardiopsis* presentan 3 secuencias de dominios A relacionadas con la familia de compuestos inhibidores de biofilms bacterianos como cahuitamicina (i.e. grupo 5); *Streptomyces*, *Nocardiopsis* y *Pseudonocardia* presentan 3 secuencias de dominios A relacionadas con compuestos de la familia de las fitotoxinas como taxtomina (i.e. grupo 6); 3 secuencias pertenecientes a dominios A de los géneros *Nocardiopsis* y *Pseudonocardia* están relacionadas filogenéticamente con secuencias de compuestos antifúngicos como nikomicina (i.e. grupo 7). El género *Streptomyces* tiene dos secuencias de dominios A relacionadas filogenéticamente con compuestos de la familia de factores de virulencia bacteriana, como 2-amino-4 metoxitrans-3 ácido butenoico (i.e. grupo 8) y compuestos de naturaleza inmunosupresora, como rapamicina, meridamicina y nocardiosina (i.e. grupo 9); 3 secuencias de dominios A en los géneros *Saccharopolyspora* y *Pseudonocardia* están relacionadas filogenéticamente con compuestos involucrados en la desaminación oxidativa de los aminoácidos, como

koranimina (i.e. grupo 10). Los géneros *Streptomyces* y *Nocardiopsis* presentan dos secuencias de dominios A relacionadas filogenéticamente con compuestos nematocidas, como teleocidina (i.e. grupo 11); y el género *Saccharomonospora* presenta una secuencia del dominio A relacionada con la familia de las cianotoxinas, como lyngbyatoxina (i.e. grupo 12); mientras que el género *Nocardiopsis* presenta una secuencia del dominio A relacionada filogenéticamente con compuestos neurotóxicos, como jamaicamida (i.e. grupo 13). Finalmente, se pueden observar 3 secuencias del dominio A en el género *Nocardiopsis* que no se encuentran relacionadas con alguna secuencia reportada en la base de datos eSNaPD, y las cuales se agrupan en clados propios (*).

8.3 Análisis filogenético del dominio KS: GenBank

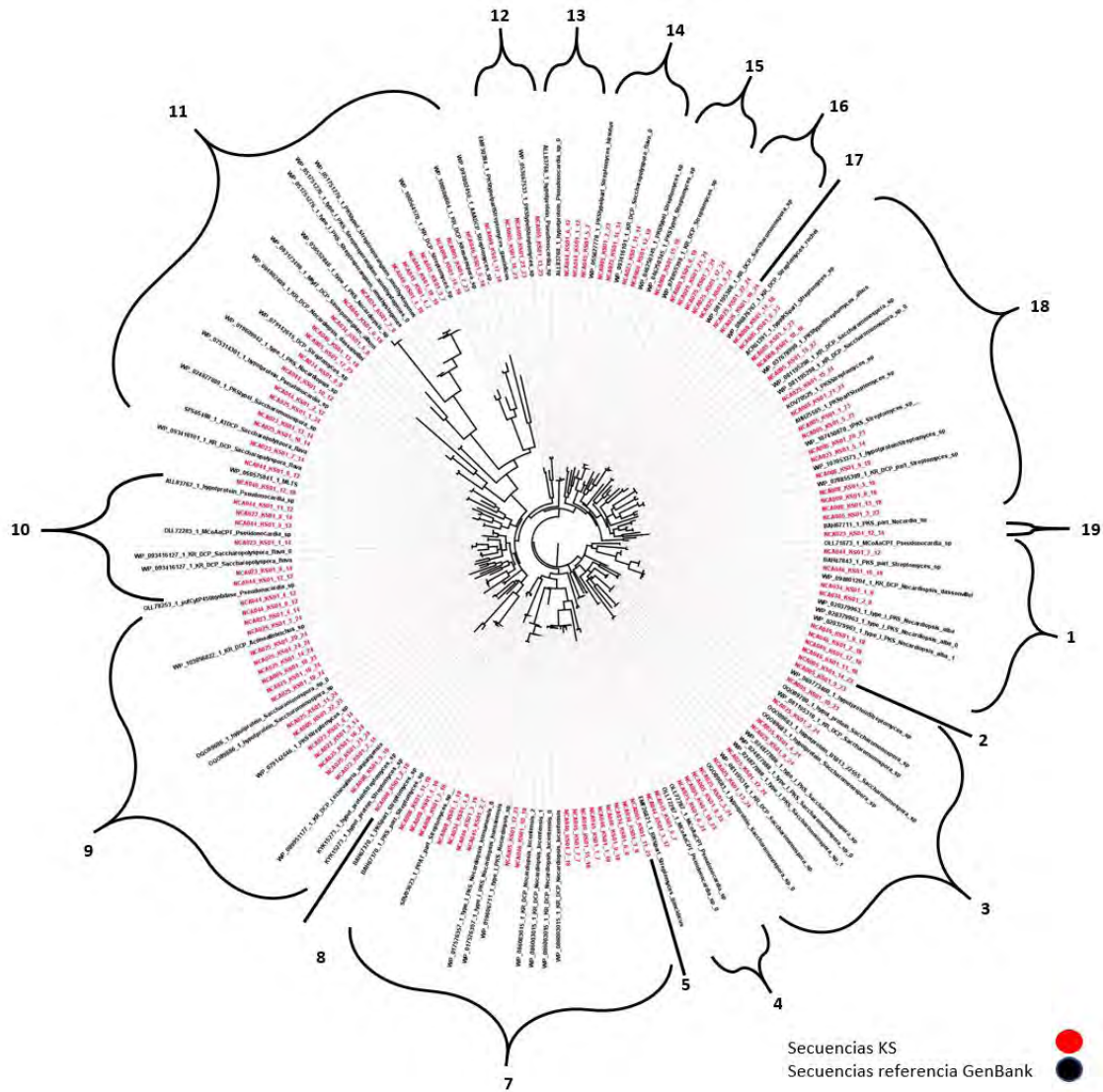


Figura 12. Análisis filogenético mediante el método estadístico Maximum Likelihood, con secuencias de 80 aminoácidos, mediante el modelo de sustitución Jones-Taylor Thornton con Nearest Neighbor Interchange (NNI), con prueba de confianza Shimodaira- Hasegawa con 1000 repeticiones y 100 *bootstraps*. Se muestran los fragmentos de las secuencias de los dominios de cetosintasas de las cepas de los 8 actinomicetos (rojo) y su relación de homología con las secuencias referencia relacionadas con los dominios de cetosintasas del GenBank (negro).

La figura 12 muestra el árbol filogenético obtenido mediante el método Maximum Likelihood, con secuencias de 80 aminoácidos, mediante el modelo de sustitución Jones-Taylor Thornton con las 122 secuencias de dominios KS obtenidas de las cepas cultivadas y de sus secuencias homólogas del GenBank con el más alto porcentaje de

identidad de referencia provenientes de la base de datos GenBank. El árbol consiste de 19 subclados, los cuáles se encuentran constituidos de la siguiente manera: el subclado 1 muestra 8 secuencias de fragmentos de KS que corresponden a cepas de los géneros *Nocardiosis* (NCA034_1_8, NCA034_2_8, NCA044_7_12) y *Pseudonocardia* (NCA046_2_18, NCA046_8_18, NCA046_11_18, NCA046_16_18, NCA046_17_18). Estos fragmentos se encuentran relacionados filogenéticamente con secuencias de genes pertenecientes a proteínas transacilasas acarreadoras de grupos Malonil CoA en *Pseudonocardia*, secuencias parciales de PKS tipo I (PKS I) y proteínas que contienen el dominio cetoreductasa (KR) en *Nocardiosis dassonvillei* y PKS I en *Nocardiosis*. El subclado 2 muestra a una secuencia de KS reportada para el género de *Streptomyces* (NCA005_14_23) la cual no está relacionada filogenéticamente con ninguna secuencia previamente reportada, y por lo tanto, se encuentra en un clado propio. El subclado 3 está compuesto por 10 secuencias de KS que pertenecen a bacterias aisladas de los géneros *Saccharomonospora* (NCA025_2_24, NCA025_2_24, NCA025_4_24, NCA025_5_24, NCA025_8_24, NCA025_12_24, NCA025_13_24) y *Streptomyces* (NCA005_8_23, NCA005_8_23, NCA005_9_23, NCA005_10_23, NCA005_19_23), las cuales se encuentran relacionadas filogenéticamente con secuencias hipotéticas de proteínas reportadas para *Saccharomonospora* sp., proteínas que contienen el dominio KR en *Saccharomonospora* sp., PKS I de *Saccharomonospora* sp. y proteínas no identificadas relacionadas con el género *Streptomyces*. El subclado 4 muestra 3 secuencias de KS encontradas en cepas identificadas como *Saccharomonospora* (NCA025_6_24), *Nocardiosis* (NCA044_3_12) y *Pseudonocardia* (NCA045_6_7), las cuales se encuentran agrupadas con secuencias KS pertenecientes a proteínas transacilasas acarreadoras de grupos Malonil CoA en *Pseudonocardia*. El subclado 5 está compuesto de una secuencia KS perteneciente a una de las bacterias del género *Streptomyces* (NCA005_11_23) y que está relacionada filogenéticamente con una secuencia parcial de la enzima Beta-cetoacil Sintasa en *Streptomyces gancidicus*. El subclado 6 está conformado de 17 secuencia KS pertenecientes a bacterias de los géneros *Streptomyces* (NCA005_12_23, NCA008_1_18, NCA008_4_18, NCA008_7_18, NCA008_11_18) *Nocardiosis* (NCA034_3_8, NCA034_4_8, NCA034_6_8) y *Pseudonocardia* (NCA045_1_7, NCA045_2_7, NCA045_7_7, NCA046_1_18, NCA046_3_18, NCA046_7_18, NCA046_9_18, NCA046_10_18) las cuales están relacionadas filogenéticamente con proteínas que contienen el dominio KR en *Nocardiosis lucentensis*, PKS I en *Nocardiosis* sp. y *Nocardiosis kunsanensis* y del sitio de unión de la enzima fosfopanteína en

Streptomyces sp. El subclado 7 está compuesto por 7 secuencias KS pertenecientes a los géneros *Streptomyces* (NCA008_2_18, NCA008_5_18) *Saccharopolyspora* (NCA023_2_14, NCA023_3_14, NCA023_6_14) y *Saccharomonospora* (NCA025_16_24, NCA025_21_24) las cuáles se encuentran agrupadas filogenéticamente con secuencias hipotéticas de proteínas de *Streptomyces* sp. y con proteínas que contienen el dominio KR en *Lechevalieria xinjiangensis*. El subclado 8 está compuesto de una secuencia KS perteneciente al género *Streptomyces* (NCA005_22_23), la cual está relacionada filogenéticamente con una secuencia de PKS I de *Streptomyces*. El subclado 9 está compuesto de 18 secuencias KS pertenecientes a los géneros *Streptomyces* (NCA005_18_23), *Saccharopolyspora* (NCA023_1_14, NCA023_4_14, NCA023_8_14, NCA023_9_14), *Saccharomonospora* (NCA025_3_24, NCA025_10_24, NCA025_11_24, NCA025_14_24, NCA025_18_24, NCA025_20_24, NCA025_24_24) *Nocardiosis* (NCA044_4_12, NCA044_5_12, NCA044_9_12, NCA044_11_12, NCA044_12_12) y *Pseudonocardia* (NCA046_12_18), los cuales están relacionados filogenéticamente con secuencias hipotéticas de proteínas en *Saccharomonospora* sp, y *Pseudonocardia*, proteínas que contienen el dominio KR en *Saccharopolyspora flava* y *Actinoalloteichus* sp. El subclado 10 está compuesto de 7 secuencias KS pertenecientes a los géneros *Saccharopolyspora* (NCA023_7_14, NCA023_10_14, NCA023_13_14), *Saccharomonospora* (NCA025_1_24) y *Nocardiosis* (NCA044_2_12, NCA044_8_12, NCA044_10_12), las cuales están relacionadas filogenéticamente con secuencias de PKS I de *Saccharomonospora* sp., proteínas que contienen el dominio KR en *Saccharopolyspora flava*, y proteínas hipotéticas de *Pseudonocardia* sp. (Figura 12). El subclado 11 está compuesto por 14 secuencias KS pertenecientes a los géneros *Streptomyces* (NCA005_7_23, NCA005_17_23, NCA008_16_18, NCA008_17_18), *Nocardiosis* (NCA034_5_8, NCA034_7_8, NCA034_8_8) y *Pseudonocardia* (NCA045_3_7, NCA045_4_7, NCA046_4_18, NCA046_5_18, NCA046_6_18, NCA046_13_18, NCA046_18_18) las cuales están relacionadas filogenéticamente con PKS I de *Nocardiosis* sp. y *Streptosporangium* sp., proteínas que contienen el dominio KR en *Streptomyces* sp., *Nocardiosis dassonvillei*, y *Kitasatospora* sp. El subclado 12 muestra tres secuencias KS del género *Streptomyces* (NCA005_13_23, NCA005_16_23, NCA005_23_23) que están relacionadas con secuencias de PKS I de *Streptomyces* sp.

El subclado 13 muestra 3 secuencias KS que pertenecen a los géneros *Nocardiosis* (NCA044_1_12, NCA044_6_12) y *Pseudonocardia* (NCA045_5_7), las cuales están relacionadas con secuencias de proteínas hipotéticas de *Pseudonocardia* sp. El subclado

14 muestra 3 secuencias KS que pertenecen a los géneros *Streptomyces* (NCA005_2_23) y *Saccharopolyspora* (NCA023_11_14, NCA023_14_14), los cuales están relacionados con secuencias parciales de PKS I de *Streptomyces hirsutus* y con proteínas que contienen el dominio KR en *Saccharopolyspora flava* (Figura 12). El subclado 15 contiene 3 secuencias KS de género *Streptomyces* (NCA008_6_18, NCA008_12_18, NCA008_15_18) que se encuentran relacionadas filogenéticamente con secuencias de PKS I de *Streptomyces* sp. El subclado 16 está constituido por 5 secuencias que pertenecen al género *Saccharomonospora* (NCA025_7_24, NCA025_9_24, NCA025_17_24, NCA025_22_24, NCA025_23_24) las cuales están relacionadas filogenéticamente con proteínas que contienen el dominio cetoreductasa (KR) en *Saccharomonospora* sp. El subclado 17 está compuesto de una sola secuencia perteneciente al género *Saccharomonospora* (NCA025_19_24), la cual se encuentra agrupada en un clado propio sin estar relacionada filogenéticamente a alguna secuencia reportada en la base de datos del NaPDoS. El subclado 18 se compone de 16 secuencias pertenecientes a los géneros *Streptomyces* (NCA005_1_23, NCA005_3_23, NCA005_4_23, NCA005_5_23, NCA005_6_23, NCA005_15_23, NCA005_20_23, NCA005_21_23, NCA008_3_18, NCA008_8_18, NCA008_9_18, NCA008_10_18, NCA008_13_18, NCA008_14_18), *Saccharopolyspora* (NCA023_5_14) y *Saccharomonospora* (NCA025_15_14), las cuales se encuentran agrupadas en el clado con secuencias de PKS I y secuencias de proteínas hipotéticas de *Streptomyces* sp. y *Streptomyces albus* y proteínas que contienen el dominio KR en *Saccharomonospora* sp. El subclado 19 está compuesto por una secuencia del género *Saccharopolyspora* (NCA023_12_14), la cual está relacionada filogenéticamente con una secuencia parcial de PKS tipo I de *Nocardia* sp.

8.4 Análisis filogenético del dominio A: GenBank

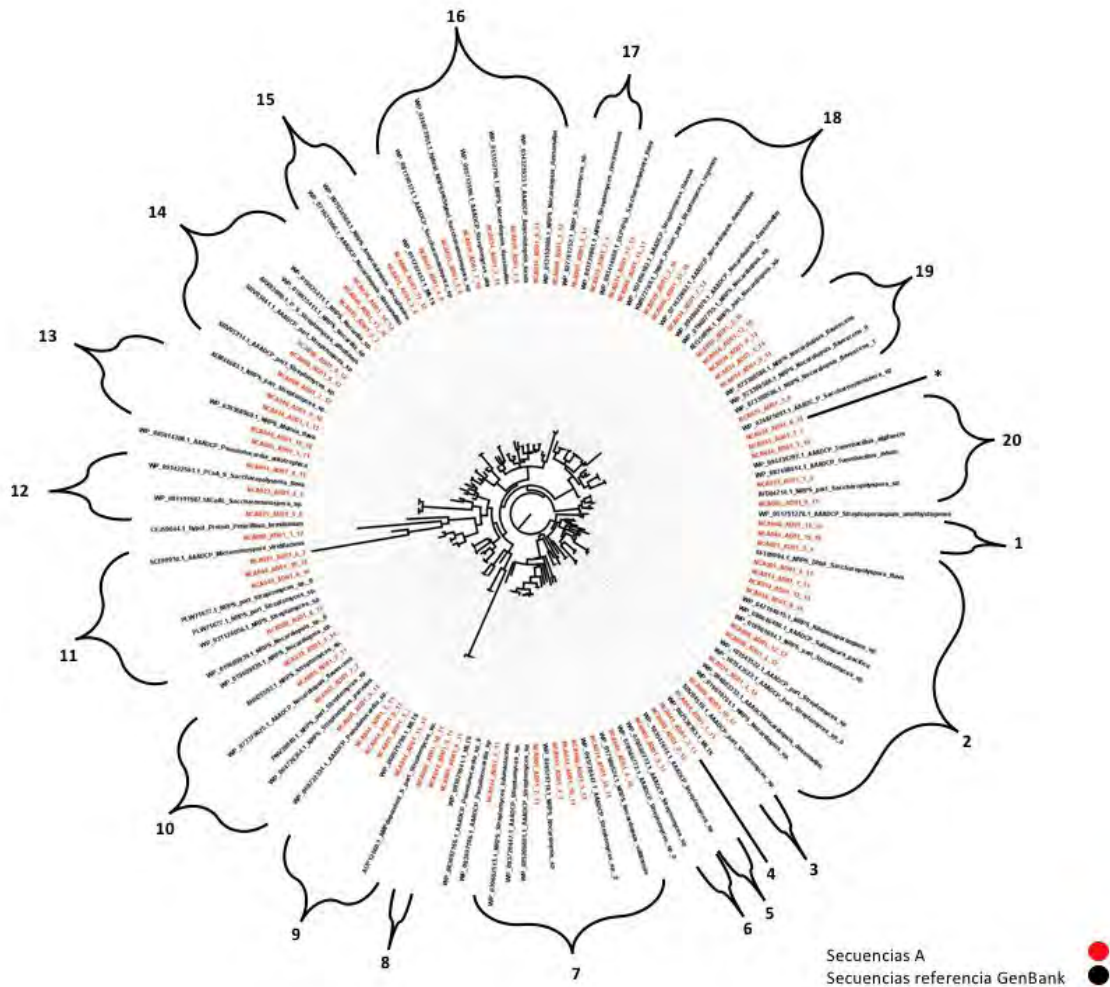


Figura 13. Análisis filogenético mediante el método estadístico Maximum Likelihood, con secuencias de 80 aminoácidos, mediante el modelo de sustitución Jones-Taylor Thornton con Nearest Neighbor Interchange (NNI), con prueba de confianza Shimodaira- Hasegawa con 1000 repeticiones y 100 *bootstraps*. Se observan los fragmentos de los dominios de adenilación y su relación de homología con las secuencias referencia relacionadas con dominios adenilasa del GenBank.

La figura 13 corresponde al árbol filogenético obtenido del alineamiento resultante entre las 78 secuencias de dominios A (secuencias A) obtenidas de los actinomicetos aislados y de las secuencias homólogas con el más alto porcentaje de identidad de referencia provenientes de la base de datos GenBank. El árbol consiste de 20 subclados, los cuáles se encuentran constituidos de la siguiente manera: el subclado 1 muestra dos secuencias A obtenidas de cepas del género *Pseudonocardia* (NCA046_14_16, NCA046_15_16) que

se encuentran relacionadas filogenéticamente con secuencias de dominios de adenilación de aminoácidos de *Streptosporangium amethystogenes*. El subclado 2 muestra 9 secuencias A pertenecientes a los géneros *Streptomyces* (NCA005_4_11, NCA008_4_12, NCA008_10_12, NCA008_12_12), *Saccharopolyspora* (NCA023_3_4), *Nocardiosis* (NCA034_4_14, NCA034_13_14, NCA044_7_11) y *Pseudonocardia* (NCA046_6_16), las cuales están relacionadas con una secuencia de sintasa de péptidos no ribosomales (NRPS) de *Saccharopolyspora flava*, NRPS de *Kibdelosporagium* sp, *Streptomyces* sp. y *Nocardiosis* sp. y con dominios de adenilación de aminoácidos de *Salinispora pacífica*, *Streptomyces* sp. y *Nocardiosis dassonvillei*. El subclado 3 está compuesto por 1 secuencia del género *Nocardiosis* (NCA044_1_11), la cual se encuentra en un clado propio, relacionada con una secuencia de proteína multiespecies. El subclado 4 está compuesto por una secuencia de *Nocardiosis* (NCA044_3_11), la cual está ubicada en una rama sola, sin mostrar ninguna relación filogenética con algún compuesto reportado. El subclado 5 presenta una secuencia A perteneciente al género *Streptomyces* (NCA008_2_12) que está relacionada filogenéticamente a una secuencia de proteína de dominio de adenilación de aminoácidos de *Streptomyces* sp., y el subclado 6 presenta una secuencia A del género *Streptomyces* (NCA005_5_11) que está relacionada filogenéticamente a una de secuencia de proteína de dominio de adenilación de aminoácidos de *Streptomyces* sp. El subclado 7 presenta 7 secuencias de genes A pertenecientes a los géneros *Streptomyces* (NCA005_7_11, NCA008_5_12), *Nocardiosis* (NCA034_10_14, NCA044_5_11, NCA044_10_11) y *Pseudonocardia* (NCA045_4_7, NCA046_4_16), las cuales se encuentran relacionadas filogenéticamente a secuencias de NRPS de *Nocardiosis valiformis*, *Nocardiosis* sp. y *Streptomyces fulvovioláceus*, y con secuencias de proteínas de dominios de adenilación de aminoácidos de *Streptomyces* sp. y *Pseudonocardia* sp. (Figura 13). El subclado 8 contiene 2 secuencias A pertenecientes a los géneros *Streptomyces* (NCA005_6_11) y *Nocardiosis* (NCA044_9_11), las cuales están agrupadas en un clado propio, sin mostrar relación filogenética con algún compuesto reportado. El subclado 9 está compuesto por 5 secuencias A pertenecientes a los géneros *Streptomyces* (NCA005_10_11), *Nocardiosis* (NCA044_2_11, NCA044_6_11, NCA044_11_11) y *Pseudonocardia* (NCA045_3_7), las cuales se encuentran relacionadas filogenéticamente con secuencias de proteína de dominio de adenilación de aminoácidos de *Pseudonocardia* sp. El subclado 10 está integrado por 4 secuencias A pertenecientes a los géneros *Streptomyces* (NCA005_2_11, NCA005_9_11), *Nocardiosis* (NCA034_1_14) y *Pseudonocardia*

(NCA045_7_7), las cuales están relacionadas filogenéticamente con secuencias de NRPS de *Streptomyces* sp y con secuencias de proteínas de dominios de adenilación de aminoácidos de *Nocardioopsis flavescens* (Figura 13). El subclado 11 tiene 5 secuencias A de los géneros *Streptomyces* (NCA008_1_12, NCA008_8_12 y *Pseudonocardia* (NCA045_6_7, NCA046_8_16, NCA046_10_16), las cuales están relacionadas con secuencias NRPS de *Streptomyces* sp, secuencias de proteínas hipotéticas de *Penicillium brasilianum* y secuencias de proteínas de dominios de adenilación de aminoácidos de *Micromonospora viridifaciens*. El subclado 12 muestra 3 secuencias A de los géneros *Saccharopolyspora* (NCA023_4_4), *Saccharomonospora* (NCA025_6_6) y *Nocardioopsis* (NCA044_8_11), las cuales están relacionadas filogenéticamente con secuencias de la enzima propionil CoA de *Saccharopolyspora flava*, ligasas de grupos acetato de *Saccharomonospora* sp. y secuencias de proteínas de dominios de adenilación de aminoácidos de *Pseudonocardia autotrophica*. El subclado 13 está conformado por 4 secuencias A pertenecientes a los géneros *Streptomyces* (NCA005_1_11), *Nocardioopsis* (NCA044_4_11) y *Pseudonocardia* (NCA046_9_16, NCA046_16_16), las cuales están relacionadas con secuencias de NRPS de *Mumia flava* y *Streptomyces* sp. El subclado 14 tiene 5 secuencias A pertenecientes a los géneros *Streptomyces* (NCA008_6_12, NCA008_7_12, NCA008_9_12) y *Pseudonocardia* (NCA045_2_7, NCA46_13_16), las cuales están relacionadas con secuencias de proteínas de *Streptomyces alboflavus*; secuencias de NRPS de *Nocardia* sp. y secuencias de proteínas de dominios de adenilación de aminoácidos de *Streptomyces* sp. El subclado 15 contiene 3 secuencias A pertenecientes a los géneros *Streptomyces* (NCA008_11_12), *Saccharomonospora* (NCA025_2_6) y *Nocardioopsis* (NCA034_14_14), las cuales están relacionadas con secuencias de NRPS de *Amycolatopsis decaplanina* y secuencias de proteínas de dominios de adenilación de aminoácidos de *Nocardioopsis dassonvillei*. El subclado 16 presenta 7 secuencias A pertenecientes a los géneros *Streptomyces* (NCA008_3_12), *Saccharomonospora* (NCA025_1_6, NCA025_4_6, NCA025_5_6), *Nocardioopsis* (NCA034_2_14, NCA034_5_14) y *Pseudonocardia* (NCA046_7_16), las cuales están relacionadas filogenéticamente con secuencias de proteínas de dominios de adenilación de aminoácidos en *Saccharomonospora* sp, *Streptomyces alni* y *Amycolaptosis lurida*, así como secuencias de NRPS de *Nocardioopsis dassonvillei* y una secuencia híbrida de NRPS/PKS tipo I de *Saccharomonospora* sp. El subclado 17 tiene 2 secuencias A de los géneros *Streptomyces* (NCA005_3_11) y *Saccharopolyspora* (NCA023_2_4), las cuales están relacionadas con secuencias de NRPS de *Streptomyces zinciresistens* (Figura 13).

El subclado 18 está constituido por 7 secuencias de los géneros *Streptomyces* (NCA005_11_11), *Nocardiopsis* (NCA034_7_14) y *Pseudonocardia* (NCA046_2_16, NCA046_3_16, NCA046_11_16, NCA046_12_16), las cuales están relacionadas con secuencias de proteínas hipotéticas de *Streptomyces regensis*, secuencias de NRPS de *Nocardiopsis* sp y secuencias de proteínas de dominios de adenilación de aminoácidos de *Streptomyces flavus* y *Nocardiopsis dassonvillei*. El subclado 19 tiene 4 secuencias A de los géneros *Saccharomonospora* (NCA025_3_6) y *Nocardiopsis* (NCA034_3_14, NCA034_8_14, NCA034_9_14), las cuales están relacionadas con secuencias de NRPS de *Nocardiopsis flavescens* y secuencias de proteínas de dominios de adenilación de aminoácidos de *Saccharomonospora* sp. El actinomiceto NCA034 identificado como *Nocardiopsis* sp. presenta una secuencia A (NCA034_6_14) que no se encuentra relacionada filogenéticamente con ninguna secuencia reportada anteriormente; por lo tanto, se encuentra en una rama formando un clado propio. Finalmente, en el subclado 20 se encuentran 4 secuencias A pertenecientes a bacterias aisladas de los géneros *Streptomyces* (NCA005_8_11), *Saccharopolyspora* (NCA023_1_4) y *Pseudonocardia* (NCA045_1_7, NCA046_1_16), las cuales se encuentran relacionadas filogenéticamente con secuencias de proteínas de dominios de adenilación de aminoácidos de *Tumebacillus algifacis* y *Tumebacillus avium*, así como secuencias parciales de NRPS de *Saccharopolyspora* sp.

9. DISCUSIÓN

Desde finales del siglo XX, la resistencia a los antibióticos se ha convertido en un tema recurrente a abordar en los paneles de salud pública mundial. Debido a esto, el descubrimiento de nuevos antibióticos se ha convertido en un asunto prioritario, y con este proyecto se pretende contribuir a este objetivo.

El aislamiento de microorganismos productores de metabolitos secundarios en ambientes marinos o lagunas costeras alberga la posibilidad de descubrir a nuevos microorganismos con adaptaciones específicas debido a las condiciones físicas y químicas características de estos ambientes. Por ello, en este trabajo se han utilizado cepas de cinco géneros y ocho especies de actinomicetos aisladas de zonas costeras de la península de Yucatán e identificadas mediante secuenciación de 16S ribosomal por Parera-Valadez (2015): *Streptomyces lusitanus* (NCA 005), *Streptomyces albogriseolus* (NCA 008), *Saccharopolyspora tripterygii* (NCA 023), *Saccharomonospora xinjiangensis* (NCA 025), *Nocardiopsis sp.* (NCA 034), *Nocardiopsis dassonvillei subsp. albirubida* (NCA 044), *Pseudonocardia alni* (NCA 045) y *Pseudonocardia antitumoralis* (NCA 046). Debido al gran potencial de producción de metabolitos secundarios que presenta este filo (Berdy, 2005), este trabajo se enfocó, específicamente, en la capacidad de producción de policétidos y péptidos no ribosomales de los ocho géneros cultivados. Además, este trabajo representa el primer estudio del potencial de producción de metabolitos secundarios de actinomicetos procedentes de sedimentos de ambiente marino/ costero de la península de Yucatán, el cual servirá como referencia para futuros trabajos de productos naturales marinos.

Una vez obtenidas las 122 secuencias de dominio de cetosintasa y las 78 secuencias del dominio de adenilación, se realizó el análisis BLAST (Altschul et al. 1990) para identificar secuencias homólogas reportadas en la base de datos GenBank. Utilizando un criterio de homología si las secuencias compartían >85% de sus aminoácidos, fue posible observar que, alrededor de ~30% de las secuencias de KS pueden identificarse con secuencias anotadas como policétidos sintetas tipo I, ~55% de las secuencias con secuencias de proteínas que contienen el dominio cetoreductasa y ~15% con proteínas hipotéticas, lo cual habla de la poca especificidad de los primers utilizados (primers degenerados). Sin embargo, a pesar de que el 55% se identificaron como cetoreductasas, fue posible comprobar la ausencia de los motivos conservados del dominio KS hacia el extremo 5' (AMDPQQ) de las secuencias provenientes de GenBank. Es decir, considerando la

arquitectura de los complejos enzimáticos para síntesis de policétidos, y la anotación libre que existe en GenBank, es posible que las secuencias reportadas como cetoreductasas contengan secuencias de KS aledañas. Con relación al análisis BLAST de las secuencias de dominios de adenilación, se observó que una gran mayoría (~70%) de las secuencias se identificaron como secuencias de sintetetasas de péptidos no ribosomales. Inclusive, algunas de ellas comparten 96% de su secuencia de aminoácidos con secuencias de proteínas que contienen dominios de adenilación de aminoácidos (e.g. NCA008 6_12, figura 13). Más aún, la presencia de los motivos conservados del dominio de adenilación de NRPS (TSGSTG) demuestra la selectividad de los primers hacia secuencias de dominios de adenilación de sintetetasas de péptidos no ribosomales.

ANALISIS FILOGENÉTICO: DOMINIO CETOSINTASA

Con relación al análisis filogenético realizado con las 122 secuencias del fragmento del dominio de la cetosintasa, podemos observar que las secuencias se encuentran filogenéticamente relacionadas con compuestos antibióticos, antifúngicos, neurotóxicos e inmunosupresores (NaPDoS, base de datos) (Fig. 10). En el caso de la cepa identificada como *Streptomyces lusitanus*, la mayoría de sus secuencias (~70%) se encuentran relacionadas filogenéticamente con antibióticos de tipo macrólido, macrolactano y macrolactano polieno. En algunos casos, la relación filogenética que comparten los KS de actinomicetos aislados con sus secuencias homólogas es muy cercana (>85%), lo cual podría indicar que el actinomiceto produce el mismo compuesto, sin embargo, para afirmar lo anterior es necesario contar con la secuencia de toda la ruta biosintética y no solamente de un dominio a la cual pertenece. Por ejemplo, las secuencias NCA005 9_23 y NCA005 21_23 se encuentran en ramas contiguas dentro del mismo clado al de los antibióticos tetranomicina y micinamicina. Otra forma de confirmarlo sería mediante el estudio de la producción de compuestos que tiene esta cepa y así confirmar si el actinomiceto NCA005 identificado como *Streptomyces lusitanus*, contiene los clústers biosintéticos relacionados con la síntesis de estos compuestos. Más aún, Kluepfel et al., (1975) realizaron estudios en los que se comprobó la producción de naftiridinomicina, antibiótico de amplio espectro, en una cepa de *Streptomyces lusitanus*.

Por otro lado, en el árbol se pueden observar dos secuencias que se encuentran agrupadas en el mismo clado que spinosad, un compuesto neurotóxico sintetizado por el actinomiceto *Saccharopolyspora spinosa* (Guojum et al., 2016) y dos secuencias relacionadas con compuestos inmunosupresores. Aunque no está reportado que el actinomiceto NCA 005 identificado como *Streptomyces lusitanus* esté involucrado en la síntesis de compuestos como oleandomicina, megalomicina, rifamicina entre otros, la relación filogenética que muestran sus secuencias de KS's podría sugerir que *Streptomyces lusitanus* contiene clusters biosintéticos dedicados a la síntesis de compuestos similares.

Con relación a NCA 008 identificado como *Streptomyces albogriseolus*, la totalidad de sus secuencias de KS se encuentran relacionadas a compuestos antibióticos como pimaricina, rifamicina, micinamicina, entre otros. Estudios llevados a cabo por Endre, et al., (2013) reportaron que *Streptomyces albogriseolus* es un microorganismo productor de antibióticos como neomicina B y neomicina C. De manera similar, se podría inferir que *Streptomyces albogriseolus*, podría contener clústers biosintéticos relacionados con la síntesis de compuestos antibióticos similares. Adicionalmente, en el árbol se pueden observar 14 secuencias KS pertenecientes a ambas especies de *Streptomyces* las cuales se encuentran agrupadas en clados o ramas separadas, sin tener alguna secuencia homóloga a la cual pueda estar relacionada filogenéticamente. Esto sugiere que podría tratarse de posibles secuencias nuevas.

Las secuencias KS pertenecientes a actinomicetos miembros de la familia *Pseudonocardiaceae*,: NCA 023, NCA 025, NCA 045 y NCA 046 identificadas como *Saccharopolyspora tripterygii*, *Saccharomonospora xinjiangensis*, *Pseudonocardia alni* y *Pseudonocardia antitumoralis* respectivamente, tienen un alto potencial de producción de PKS novedosos ya que, únicamente el 15% de ellas fueron identificadas como similares a antibióticos ya reportados, como rifampicina, micinamicina, oleamicina, nidamicina, antifúngicos (nistatina) e inmunosupresores, como meridamicina (NaPDoS, base de datos).

Con relación a compuestos inmunosupresores, la secuencia de la KS NCA025 24_24 presenta una relación filogenética muy cercana a su secuencia homóloga, la cual está reportada (NaPDoS, base de datos). como perteneciente a la síntesis de meridamicina, por ello podría tratarse del mismo compuesto. Adicionalmente, se puede observar que el 85 % de las secuencias de cetosintas que pertenecen a esta familia se encuentran

agrupadas en clados o ramas separadas, sin tener alguna secuencia homóloga a la cual pueda estar relacionadas filogenéticamente. De nuevo, esta característica habla del alto potencial de producción de compuestos PKS novedosos por parte de los actinomicetos de la familia *Pseudonocardiaceae*.

El actinomiceto NCA 034 identificado como *Nocardiopsis sp.*, presenta 20% de secuencias KS filogenéticamente relacionadas a compuestos antibióticos, como nidamicina y tilosina (Fig. 10). El 80% restante de las secuencias KS se encuentran agrupadas en clados o ramas separadas, sin tener alguna secuencia homóloga a la cual pueda estar relacionadas filogenéticamente, una vez más mostrando el alto potencial de producción de compuestos PKS novedosos. Más aún, existen varios trabajos que reportan que el género *Nocardiopsis* está involucrado en la síntesis de una gran variedad de productos naturales como antifúngicos y carcinogénicos (pendolmicina); agentes anticancerígenos selectivos (apoptolidinas), compuestos antimicrobianos y anticancerígenos (griseusinas), surfactantes (lipopéptidos), antibióticos (tiopéptidos) y compuestos antimicrobianos y anticancerígenos (Sun et al. 1991; Kim et al. 1997; Li et al. 2007; Gandhimathi et al. 2009; Engelhardt et al. 2010a; Ding et al. 2010).

Por otro lado, las secuencias de KS del actinomiceto NCA 044 identificado como *Nocardiopsis dassonvillei*, se encuentran relacionadas con compuestos antifúngicos (nistatina, ascomicina), antibióticos (pimaricina y concanamicina) e inmunosupresores (rapamicina). Con relación a compuestos inmunosupresores, la secuencia de KS NCA044 7_12 perteneciente a esta cepa es de interés porque se encuentra en una rama separada dentro de un clado que agrupa secuencias de compuestos inmunosupresores, como la rapamicina (fig 10). De acuerdo con Fu et al., (2011) y Jiang et al., (2007), *Nocardiopsis dassonvillei* ha mostrado biactividad antimicrobiana y está relacionada con la síntesis de antibióticos como α -pyrones y nocapyrones, ambos compuestos activos contra *B. subtilis*. Pei Su et al., (2014) reportaron que la cepa *Nocardiopsis dassonvillei* contenía secuencias de cetosintasas y de péptidos no ribosomales relacionadas con compuestos antibióticos y compuestos inhibidores del crecimiento. Asimismo, cabe mencionar que, alrededor del ~60% de las secuencias KS encontradas en NCA044 se encuentran agrupadas en clados o ramas separadas a las reportadas en bases de datos de productos naturales conocidos, por lo tanto, el no tener alguna secuencia homóloga

relacionada filogenéticamente, sugiere que esta cepa tiene el potencial de producir nuevos productos naturales bioactivos.

ANÁLISIS FILOGENÉTICO: DOMINIO DE ADENILACION

Con relación al análisis filogenético realizado con las 78 secuencias del fragmento del dominio adenilasa (secuencias A) y 391 secuencias referencia pertenecientes a productos naturales reportados en la base del eSNaPD, podemos observar de manera general que los actinomicetos aislados de sedimentos costeros de la península de Yucatán presentan secuencias A que son homólogas presentando valores mayores al 85% de identidad con compuestos antitumorales, antivirales, antibióticos, antifúngicos, sideróforos, neurotóxicos, inhibidores de biofilm, fitotoxinas, biosurfactantes, desaminantes, inmunosupresores, carcinogénicos y factores de virulencia (Fig. 11). En el análisis filogenético se pudo observar que todos los géneros descritos en este análisis (*Streptomyces lusitanus*, *Streptomyces albogriseolus*, *Saccharopolyspora tripterygii*, *Saccharomonospora xinjiangensis*, *Nocardiosis sp.*, *Nocardiosis dassonvillei*, *Pseudonocardia alni* y *Pseudonocardia antitumoralis*) presentaron al menos una secuencia relacionada con compuestos antitumorales y compuestos antibióticos (Fig. 11). Destacan los actinomicetos NCA 008 identificado como *Streptomyces albogriseolus* y NCA 046 identificado como *Pseudonocardia antitumoralis*, los cuales presentaron al menos 30 % del total de secuencias A relacionadas filogenéticamente con compuestos antitumorales. De manera similar, los actinomicetos NCA 005, NCA 008, NCA 025, NCA 044, NCA 045 y NCA 046 identificados como *Streptomyces lusitanus*, *Streptomyces albogriseolus*, *Saccharomonospora xinjiangensis*, *Nocardiosis dassonvillei*, *Pseudonocardia alni* y *Pseudonocardia antitumoralis* respectivamente, presentaron al menos una secuencia relacionada filogenéticamente con compuestos antivirales (HIV) (FIG 10). Ambos actinomicetos reportados como *Streptomyces* por Parera-Valadez (2015) (NCA 005 y NCA 008) *presentan* una diversidad de secuencias de adenilasas relacionadas con diversos tipos de productos naturales. Por ejemplo, NCA008 11_12, se encuentra relacionada con compuestos inhibidores de biofilm; NCA008 2_12 se encuentra relacionada filogenéticamente a compuestos biosurfactantes; NCA008 1_12 se encuentra relacionada con compuestos antivirales (HIV) y NCA008 11_12 con compuestos sideróforos (Fig. 11). (eSNaPD, base de datos). Cabe mencionar que

alrededor del ~50% de las secuencias pertenecientes a este género, están relacionadas filogenéticamente con compuestos de acción antitumoral y antibióticos potentes.

Como se puede observar en las figuras 10 y 11, la mayoría de las secuencias de adenilasas y cetosintasas que se identificaron en este trabajo presentan homología con secuencias involucradas en la síntesis de productos naturales reportados previamente, de acuerdo con la base de datos del eSNaPD y NaPDoS, los cuáles son producidos por actinomicetos que no necesariamente pertenece al mismo género al cuál pertenecen las secuencias amplificadas de actinomicetos de Yucatán. La gran diversidad de secuencias de adenilasas y cetosintasas que presentan estos actinomicetos puede ser un indicativo de la rapidez con la que evoluciona su genoma (Peter, et al., 2018). Su naturaleza de microorganismo degradador le requiere estar constantemente mutando y sintetizando compuestos de metabolismo secundario que le ayuden a adaptarse a las presiones a las que puede estar sometido en los diferentes ambientes en los que se encuentran para sobrevivir (Peter, et al., 2018), el hecho de encontrar la misma secuencia KS o A en dos géneros distintos de actinomicetos sugiere que éstas puedan ser transferidas lateralmente entre estos microorganismos (Jung, et al., 2010).

10. CONCLUSION

Los diferentes análisis filogenéticos demostraron la existencia de una gran diversidad de secuencias de cetosintasas y adenilasas en los actinomicetos aislados a partir de sedimentos costeros de la península de Yucatán e identificados como: *Streptomyces lusitanus*, *Streptomyces albogriseolus*, *Saccharopolyspora tripterygii*, *Saccharomonospora xinjiangensis*, *Nocardiopsis sp.*, *Nocardiopsis dassonvillei*, *Pseudonocardia alni* y *Pseudonocardia antitumoralis*.

La gran diversidad de secuencias KS y A indican un gran potencial de producción de metabolitos secundarios en las cepas estudiadas. A pesar de que varias de las secuencias de KS y A homólogas mostraron valores superiores al 85% de identidad con secuencias pertenecientes a rutas biosintéticas de productos naturales ya reportados (NaPDoS, eSNaPD), hubo 69 secuencias pertenecientes a NCA 005, NCA 008, NCA 023, NCA 025, NCA 034, NCA 044, NCA 045, y NCA 046 identificados como *Streptomyces lusitanus*, *Streptomyces albogriseolus*, *Saccharopolyspora tripterygii*, *Saccharomonospora xinjiangensis*, *Nocardiopsis sp.*, *Nocardiopsis dassonvillei*, *Pseudonocardia alni* y

Pseudonocardia antitumoralis respectivamente, que se agruparon en clados o ramas separadas en el análisis filogenético, lo cual indica que estos actinomicetos tienen el potencial de producir moléculas aún no descritas (Schorn, et al., 2016)

Los actinomicetos NCA 008 y NCA 046, previamente identificados por secuenciación del gen 16S ribosomal como *Streptomyces albogriseolus* y *Pseudonocardia antitumoralis* (Parera-Valadez, et al., 2018, en revisión), son de especial interés al haber mostrado la mayor diversidad de dominios cetosintasas relacionadas filogenéticamente a una gran variedad de metabolitos secundarios.

11. PERSPECTIVAS

Se pretende realizar un estudio minucioso de los genomas pertenecientes a cepas NCA008 y NCA046 de actinomicetos identificados como *Streptomyces albogriseolus* y *Pseudonocardia antitumoralis* para elucidar las rutas biosintéticas completas, así como el estudio químico de sus extractos orgánicos. Realizar estudios más profundos a nivel genoma, pruebas bioautográficas con mayor cantidad de patógenos, así como escalar su crecimiento para producción de extractos orgánicos que permitan elucidar moléculas de interés, podría ser una buena manera de confirmar el potencial total de la producción de compuestos bioactivos en los actinomicetos costeros de la península de Yucatán.

12. BIBLIOGRAFÍA

1. Berdy, J. Bioactive Microbial Metabolites. *The Journal of Antibiotics* (2005) 58, 1-26.
2. Jadón et al., *Bosco. Biotech. Res. Asia*, Vol. 11 (2) ,705-714 (2014).
3. Fenical W, Jensen PR. Strategies for the discovery of secondary metabolites from marine bacteria: Ecological perspectives. *Ann Rev Microbiol.* 1994; 48: 559-84.
4. Fenical W. New Pharmaceuticals form marine organisms. *Trends Biotechnol.* 1997; 5(9): 339-41.
5. Ellaiha, P. and Reddy, A.P.C.1987. Isolation of actinomycetes from marine sediments of Visakhapatnam, East Coast of India.*Ind.J. Marine Sci.*16 :134-135.
6. Ramesh S, Narayanasamy M (2009). Screening of marine actinomycetes isolated from the Bay of Bengal, India for antimicrobial activity and industrial enzymes. *World J Microbiol Biotechnol* 25 : 2103-2111
7. Mahajan, G.B. "Antibiotics from Microorganisms from Hot Springs/Geysers." *Antibiotics : Current Innovations and Future Trends*. Eds. Sergio Sánchez and Arnold L. Demain. Norfolk, U.K.: Caister Academic Press, 2015. 207-212. Print
8. Robinson JA (1991). "Polyketide synthase complexes : their structure and function in antibiotic biosynthesis". *Philos Trans R Soc Lond B Biol. Sci.* 332: 107-114.
9. Moffitt MC, Neilan BA (2003) Evolutionary affiliations within the superfamily of Ketosynthases reflect complex pathway associations. *J Mol Evol* 56 :446-457.
10. Zhao J, Yang N, Zeng R (2008) Phylogenetic analysis of type I polyketide synthase and nonribosomal peptide synthetase genes in Antarctic sediment. *Extremophiles* 12 :97–105
11. Parera- Valadez, Y. 2015. *Aislamiento e identificación de actinomicetos asociados a sedimentos marinos de la península de Yucatán*. (Tesis de maestría inédita). Instituto de Ciencias del Mar y Limnología. Universidad Nacional Autónoma de México. México.
12. Subramani, R., Aalbersberg, W. Marine Actinomycetes : an ongoing source of novel bioactive metabolites. *Microbiol. Res.*, 2012 ; 167 :571–580
13. Gomez-Escribano, J. P., Alt, S., and Bibb, M. J. (2016). Next Generation sequencing of Actinobacteria for the discovery of novel natural products. *Mar. Drugs* 14: E78. doi: 10.3390/md14040078.
14. Ayuso-Sacido, A., and Genilloud, O. (2005). New PCR primers for the screening of NRPS and PKS-I systems in actinomycetes : detection and distribution of these

- biosynthetic gene sequences in major taxonomic groups. *Microb. Ecol.* 49, 10–24.
doi: 10.1007/s00248-004-0249-6
15. Bull AT, Ward AC, Goodfellow M. Search and discovery strategies for biotechnology : the paradigm shift. *Microbial Mol Biol Rev* 2000; 64:573- 606.
 16. Das S, Lyla PS, Khan SA. Marine microbial diversity and ecology : importance and future perspective. *Curr Sci* 2006; 90:1325-35.
 17. Khosla C, Gokhale RS, Jacobsen JR, Cane DE 1999. Tolerance and specificity of polyketide synthases. *Annu. Rev. Biochem.* **68**, 219- 253.
 18. Hertweck C (2009) The Biosynthetic Logic of Polyketide Diversity. *Angew Chem Int Ed* 48 :4688
 19. Holger, J-K., A. Sandmann, R. Müller and E. Dittmann, 2005. Evolutionary implications of bacterial polyketide synthase. *Molecular Biology and Evolution* 22 (10): 2027-2039.
 20. Shen, B. Polyketide biosynthesis beyond the type I, II and III polyketide synthase paradigms. *Current Opinion in Chemical Biology* 2003, 7 :285–295.
 21. Yolande A. Chan, Angela M. Podevels, Brian M. Kevanya and Michael G. Thomas. "Biosynthesis of polyketide synthase extender units". *Nat. Prod. Rep.* (2009) 26, 90-114.
 22. Salomon, C.E., N.A. Magarvey, y D.H. Sherman. Merging the potential of microbial genetics with biological and chemical diversity: an even brighter future for marine natural product drug discovery. *Nat. Prod. Rep.*, 2004, 21, 105-121.
 23. Hochmuth T, Piel J. (2009). Polyketide synthases of bacterial symbionts in sponges—evolution-based applications in natural products research. *Phytochemistry (Oxf)* 70: 1841–1849.
 24. Gokhale RS, Tsuji SY, Cane DE, Khosla C. Dissecting and exploiting intermodular communication in polyketide synthases. *Science* 1999 ; 284 :482-485.
 25. McDaniel R, Thamchaipenet A, Gustafsson C, Fu H, Betlach M, Ashley G. Multiple genetic modifications of the erythromycin polyketide synthase to produce a library of novel "unnatural" natural products. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999 ; 96 :1846-1851.
 26. Dewick, Paul M. *Medicinal Natural Products : A Biosynthetic Approach*. Chichester, West Sussex, England : Wiley, 2002. Print
 27. Ansari, M.Z., G. Yadav, y R.S. Gokale. NRPS-PKS : A knowledge- based resource for analysis of NRPS/PKS megasynthases. *Nucl. Acids Res.* (2004) 32 (suppl 2): 405-413.

28. Woithe K, Geib N, Zerbe K *et al.* (2007) Oxidative phenol coupling reactions catalyzed by OxyB : a cytochrome P450 from the vancomycin producing organism. *Implications for vancomycin biosynthesis.* J Am Chem Soc **129**: 6887–6895.
29. Gulder, A. M. G. and Moore, B.S. (2009). Chasing the treasures of the sea-bacterial marine natural products. *Curr Opin. Microb.* 12, 252-260.
30. Meyer V., Wu B., Ram A. F. J. (2011). *Aspergillus* as a multi-purpose cell factory : current status and perspectives. *Biotechnol. Lett.* 33 469–476 10.1007/s10529-010-0473-8
31. Berdy, J. “Microorganisms Producing Antibiotics.” *Antibiotics : Current Innovations and Future Trends.* Eds. Sergio Sánchez and Arnold L. Demain. Norfolk, U.K. : Caister Academic Press, 2015. 49-64. Print.
32. De la Rosa García, Susana; Gamboa Angulo, M. Marcela Microorganismos acuáticos: una farmacia por visitar *Ciencia Ergo Sum*, vol. 11, núm. 2, julio-octubre, 2004, pp. 186-190
33. Maldonado L, Fragoso-Yáñez D, Pérez-García A, Rosellón-Druker J, Quintana E. 2009. Actinobacterial diversity from marine sediments collected in Mexico. *Antonie Van Leeuwenhoek.* (95):111–120.
34. Becerril-Espinosa, A, Freel, K.C., Jensen, P.R., Soria-Mercado, I.E. 2013. Marine actinobacteria from the Gulf of California: diversity, abundance and secondary metabolite biosynthetic potential. *Antonie van Leeuwenhoek.* (103):809–819.
35. Marfil-Santana, Miguel & O'Connor, Aileen & Ramírez-Prado, Jorge & Santos-Briones, César & López-Aguilar & Lluvia, Korynthia & Rafael, Rojas & Lago-Lestón, Asunción & Prieto, Alejandra. (2016). A computationally simplistic poly-phasic approach to explore microbial communities from the Yucatan aquifer as a potential sources of novel natural products. *Journal of Microbiology.* 54. 774-781. 10.1007/s12275-016-6092-x
36. Colorado J, Galeano E & Martinez A M. (2007). Desarrollo de la bioautografía directa como método de referencia para evaluar la actividad antimicrobiana de la gentamicina contra *Escherichia coli*. *Revista De La Facultad De Química Farmacéutica* 14, 67-71.
37. Rioja-Nieto R., J. A. Moreno-Ruíz y J. Gómez-Valdés. 2015. Efecto del manejo de un Área Natural Protegida en el paisaje del bosque de manglar en la Península de Yucatán. *Hidrobiológica* 25 (2): 203-211.
38. Ruíz- Hernández, 2018. Tesis en proceso.

39. Parsley L. C., et al. 2011. Polyketide synthase pathways identified from a metagenomic library are derived from soil acidobacteria. *FEMS Microbiol. Ecol.* 78:176–187
40. Moffitt, M. C., and B. A. Neilan. 2001. On the presence of peptide synthetase and polyketide synthase genes in the cyanobacterial genus *Nodularia*. *FEMS Microbiol. Lett.* 196:207-214.
41. Schirmer, A. ; Gadkari, R. ; Reeves, C.D. ; Ibrahim, F. ; DeLong, E.F. ; Hutchinson, C.R. (2005). Metagenomic analysis reveals diverse polyketide synthase gene clusters in microorganisms associated with the marine sponge *Discodermia dissoluta*. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 4840–4849.
42. P.R. Jensen, R. Dwight, W. Fenical. Distribution of actinomycetes in near-shore tropical marine sediments. *Appl. Envir. Microbiol.*, 57 (1991), pp. 1102-1108
43. Prieto-Davó, A., Fenical, W., and Jensen, P.R. (2008) Comparative actinomycete Diversity in marine sediments. *Aquatic Microbial Ecology* 52, 1-11.
44. Charlop-Powers Z, Pregitzer CC, Lemetre C, Ternei MA, Maniko J, Hover BM, Calle PY, McGuire KL, Garbarino J, Forgione HM, Charlop-Powers S, Brady SF. Urban park soil microbiomes are a rich reservoir of natural product biosynthetic diversity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2016 Dec 20;113(51) :14811-14816. doi: 10.1073/pnas.1615581113. Epub 2016 Nov 28.
45. Fadrosch DW, Ma B, Gajer P, Sengamalay N, Ott S, Brotman RM, Ravel J (2014). An improved dual- indexing approach for multiplexed 16S rRNA gene sequencing on the Illumina MiSeq platform. *Microbiome* 2 :6.
46. Ziemert, N, Podell S, Penn K, Badger JH, Allen E, Jensen PR. 2012. The Natural Product Domain Seeker NaPDoS : A Phylogeny Based Bioinformatic Tool to Classify Secondary Metabolite Gene Diversity. *Plos One.* 7
47. Reddy, Boojala Vijay B. et al. “eSNaPD : A Versatile, Web-Based Bioinformatics Platform for Surveying and Mining Natural Product Biosynthetic Diversity from Metagenomes.” *Chemistry & biology* 21.8 (2014): 1023–1033. *PMC.* Web. 25 May 2018.
48. Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ (1990). Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* 215:403–410
49. Santiago-Sotelo P, Ramirez-Prado JH. pfectBLAST: a platform-independent portable front end for the command terminal BLAST+ stand-alone suite. *BioTechniques.* 2012;53(5):299–300. <https://doi.org/10.2144/000113953>.

50. Price MN, Dehal PS, Arkin AP : Fasttree: computing large minimum evolution trees with profiles instead of a distance matrix. *Mol Biol Evol.* 2009 ; **26**(7) : 1641–1650.
51. Kluepfel D, Kudelski A, Bagli J (1975) Myriocin and process of preparation. US Patent 3,928,572.
52. Guojun, Yang et al. "A New Medium for Improving Spinosad Production by *Saccharopolyspora Spinosa*." *Jundishapur Journal of Microbiology* 9.6 (2016): e16765. *PMC*. Web. 25 May 2018.
53. Endre A. Balazs, Roger W. Jeanloz (2013). *Distribution and Biological Role : The Chemistry and Biology of Compounds Containing Amino Sugars*. Academic Press. ISBN 1-4832-5764-9.
54. Sun, H. H., White, C. B., Dedinas, J., Cooper, R. & Sedlock, D. M. (1991). Methylpendolmycin, an indolactam from a *Nocardiosis* sp. *J Nat Prod* 54, 1440–1443.
55. Kim, J. W., Adachi, H., Shin-ya, K., Hayakawa, Y. & Seto, H. (1997). Apoptolidin, a new apoptosis inducer in transformed cells from *Nocardiosis* sp. *J Antibiot (Tokyo)* 50, 628–630.
56. Li, Y. Q., Li, M. G., Li, W., Zhao, J. Y., Ding, Z. G., Cui, X. L. & Wen, M. L. (2007). Griseusin D, a new pyranonaphthoquinone derivative from an alkaliphilic *Nocardiosis* sp. *J Antibiot (Tokyo)* 60, 757–761.
57. R. Gandhimathi, K.G. Seghal, T.A. Hema, J. Selvin, R.T. Rajeetha, S. Shanmugharriya. Production and characterization of lipopeptide biosurfactant by a sponge-associated marine actinomycetes *Nocardiosis alba*MSA10. *Bioprocess Biosyst Eng*, 32 (2009), pp. 825-835
58. K. Engelhardt, K.F. Degnes, S.B. Zotchev | Isolation and characterization of the gene cluster for biosynthesis of the thiopeptide antibiotic TP-1161. *Appl Environ Microbiol*, 76 (2010), pp. 7093-7101
59. Z.G. Ding, M.G. Li, J.Y. Zhao, J. Ren, R. Huang, M.J. Xie, et al. Naphthospirozone A: an unprecedented and highly functionalized polycyclic metabolite from an alkaline mine waste extremophile. *Chem Eur J*, 16 (2010), pp. 3902-3905
60. P. Fu, P. Liu, H. Qu, Y. Wang, D. Chen, H. Wang, et al. A-pyrone and diketopiperazine derivatives from the marine-derived actinomycete *Nocardiosis dassonvillei* HR10-5J *Nat Prod*, 74 (2011), pp. 2219-2223

61. S. Jiang, W. Sun, M. Chen, S. Dai, L. Zhang, Y. Liu, *et al.* Diversity of culturable actinobacteria isolated from marine sponge *Haliclona* sp. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 92 (2007), pp. 405-416
62. Pei J, Yuan Y and Yue T. 2013. Primary characterization of bacteriocin paracin C e A novel bacteriocin produced by *Lactobacillus paracasei*. *Food Control* 34: 168-176.
63. Peter, J., De Chiara, M., Friedrich, A., Yue, J., Pflieger, D., Bergström, A., Sigwalt, A., Barre, B., Freel, K., Llored, A., Cruaud, C., Labadie, K., Aury, JM., Istace, B., Lebrigand, K., Barbry, P., Engelen, S., Lemainque, A., Wincker, P., Liti, G., Schacherer, J. Genome evolution across 1,011 *Saccharomyces cerevisiae* isolates. *Nature*. 556, pages339–344 (2018)
64. Jung CM, Crocker FH, Everly JO, Indest KJ (2011). Horizontal gene transfer (HGT) as a mechanism of disseminating RDX- degrading activity among Actinomycete bacteria. *J Appl Microbiol* 110 : 1449- 1459.
65. Schorn MA, Alanjary MM, Aguinaldo K, Korobeynikov A, Podell S, Patin N *et al.* (2016). Sequencing rare marine actinomycete genomes reveals high density of unique natural product biosynthetic gene clusters. *Microbiology* 162 : 2075–2086.