



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

CARACTERIZACIÓN *IN SILICO* Y QUÍMICA DE SIDERÓFOROS NOVEDOSOS IDENTIFICADOS POR MINERÍA GENÓMICA APLICADA A *Embleya* sp. NF3 Y CONSTRUCCIÓN DE SU BIBLIOTECA GENÓMICA

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
Maestra en Ciencias

PRESENTA:
MARIA PAULA GOMEZ ROMAN

TUTOR PRINCIPAL
DR. SERGIO SÁNCHEZ ESQUIVEL
Instituto de Investigaciones Biomédicas

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR
Dra. Amelia Farrés González-Saravia
Facultad de Química

Dr. Horacio Reyes Vivas
Instituto Nacional de Pediatría

Ciudad de México. Noviembre, 2021



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.

Agradecimientos

Al CONACYT (Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología) por la beca número 749456 otorgada para la realización de la maestría.

Al PAEP (Programa de Apoyo a los Estudios del Posgrado) por el apoyo económico para realizar el curso de bioestadística en la Universidad de San Diego durante la maestría.

Al Dr. Sergio Sánchez por darme la gran oportunidad de pertenecer a su grupo de trabajo y por su tutoría durante el desarrollo de este proyecto.

A la Dra. Beatriz Ruiz Villafán por su asesoría técnica y comentarios durante el desarrollo del proyecto, así como por su apoyo en la discusión de este trabajo.

A la Dra. Silvia Ivonne Mora Herrera por su ayuda con los ensayos de UPLC-MS, desarrollados en la Unidad de Metabolómica y Proteómica del Instituto de Investigaciones Biomédicas, así como por la ayuda en el análisis de los resultados aquí presentados.

A mi comité tutor, la Dra. Amelia Farrés González Sarabia y el Dr. Horacio Reyes Vivas, por sus comentarios y aportes durante el desarrollo de este proyecto.

A mi jurado, los doctores Silvia Andrea Moreno Mendieta, José Adelfo Escalante, José Guillermo Aguilar Osorio, Armando Mejía Alvarez y Daniel Genaro Segura González, por la revisión, comentarios y recomendaciones a este trabajo.

A Sarai, Luisa y Susana por su apoyo durante la construcción y caracterización de la biblioteca genómica.

A mis amigos y compañeros, Karen, Dani, Monse, Carlos Andrés, Luisa, Dulce, Carlos, Susana, Rodrigo, Alma, Sarai, Ajit, Betty y Rocio porque de todos he aprendido cosas valiosas y me llevo muy buenos recuerdos de mi estancia en México.

DEDICATORIA

Al Dr. Sergio Sánchez Esquivel, para quien sólo tengo palabras de agradecimiento por la orientación, la amistad, los consejos y el conocimiento que me ha brindado tanto en la parte profesional como en la parte personal durante estos años de trabajo.

A mis padres, Emma y Hugo, por enseñarme que con esfuerzo y dedicación se pueden cumplir todas las metas y sueños propuestos.

A mis abuelos, Cristina, Maruja y Héctor, por siempre ser mi apoyo, mis alcahuetas, y por siempre tener las palabras de aliento necesarias para todo momento en que las necesito.

A Ricardo por ser mi soporte durante estos años e impulsarme siempre a ser mejor y alcanzar todos mis sueños.

Tabla de contenido

1. Introducción.....	15
1.1 Productos naturales	17
1.1.1 Productos naturales bioactivos.....	17
1.1.2 Fuentes de productos naturales bioactivos	18
1.2 Actinobacterias: bacterias con gran potencial para la síntesis de productos naturales	18
1.2.1 Actinobacterias endófitas	20
1.2.2 Actinobacterias de suelos salinos	21
1.3 Minería genómica como estrategia para identificar productos naturales novedosos.....	22
1.3.1 Herramientas bioinformáticas para minería genómica	24
1.4 Metabolitos secundarios de actinobacterias.....	25
1.4.1 Sideróforos: metabolitos secundarios bioactivos con gran potencial biotecnológico	25
1.4.1.1 Clasificación de los sideróforos	28
1.4.1.2 Biosíntesis de los sideróforos.....	30
1.4.1.3 Aplicaciones de los sideróforos	32
1.4.1.4 Sideróforos utilizados actualmente en la medicina.....	32
2. Justificación.....	35
3. Hipótesis.....	35
4. Objetivos	36
5. Metodología.....	37
5.1 Análisis bioinformático.....	37
5.1.1 Búsqueda de CGB de sideróforo y selección de la cepa a trabajar	37
5.1.2 Análisis <i>in silico</i> de los clústeres putativos de sideróforo codificados por <i>Embleya</i> sp. NF3.....	38
5.1.2.1 Función sugerida de los genes contenidos en los clústeres de sideróforo	38
5.1.2.2 Identidad y cobertura de los clústeres de sideróforo con clústeres de sideróforo reportados en el MIBiG.....	38
5.1.2.3 Alineamiento de secuencia múltiple	38
5.1.2.4 Análisis de la regulación de los clústeres putativos de sideróforo	39
5.1.2.5 Búsqueda de transportadores de sideróforo putativos	39

5.2 Detección de producción de sideróforo por <i>Embleya</i> sp. NF3 en condiciones de laboratorio	40
5.2.1 Detección de la producción de sideróforo en placas de agar cas	40
5.2.2 Caracterización de la naturaleza química de sideróforos por ensayos colorimétricos	41
5.2.2.1 Obtención del extracto orgánico a analizar	41
5.2.2.2 Ensayo de sal de tetrazolio para detectar sideróforos de naturaleza hidroxamato.....	41
5.2.2.3 Ensayo de arnow para detectar sideróforos de naturaleza catecolato	41
5.2.3 Detección de sideróforos por cromatografía en capa fina (CCF)	42
5.2.4 Detección de sideróforos por cromatografía líquida de ultra rendimiento con detector de espectrómetro de masas en tándem (UPLC-MS).....	42
5.3 Biblioteca genómica de <i>Embleya</i> sp. NF3	44
5.3.1 Construcción de la biblioteca genómica	44
5.3.1.1 Extracción del ADN genómico de <i>Embleya</i> sp. NF3	44
5.3.1.2 Determinación de la concentración y pureza del ADN	45
5.3.1.3 Fragmentación del ADN	45
5.3.1.4 Reparación	46
5.3.1.5 Ligación	46
5.3.1.6 Empaquetamiento	47
5.3.1.7 Infección de <i>Escherichia coli</i> EPI300-T1 ^r	47
5.3.1.8 Selección y almacenamiento de las clonas que conforman la biblioteca genómica.....	48
5.3.2 Caracterización de la biblioteca genómica	49
5.3.2.1 Estimación de la cobertura de la biblioteca genómica.....	49
5.3.2.2 Búsqueda de genes de interés en la biblioteca genómica.....	49
6. Resultados y discusión.....	53
6.1 Análisis bioinformático.....	53
6.1.1 Búsqueda de CGB de sideróforo y selección de la cepa a trabajar	53
6.1.2 Análisis <i>in silico</i> de los CGB de sideróforo codificados por <i>Embleya</i> sp. NF3	54
6.1.2.1 Análisis <i>in silico</i> de clústeres NIS	56
6.1.2.2 Análisis <i>in silico</i> de clústeres NRPS	65
6.1.3 Búsqueda de transportadores de sideróforo de tipo ABC	75

6.2 Detección de la producción de sideróforos por <i>Embleya</i> sp. NF3 en condiciones de laboratorio	78
6.2.1 Detección de sideróforos por medio de placas de agar CAS	78
6.2.2 Detección de la producción y caracterización de la naturaleza química de sideróforos.....	79
6.2.3 Detección de sideróforos por cromatografía en capa fina (CCF)	81
6.2.4 Determinación de producción de sideróforos por UPLC-MS	84
6.3 Construcción y caracterización de la biblioteca genómica de <i>Embleya</i> sp. NF3	89
6.3.1 Construcción de la biblioteca genómica	89
6.3.1.1 Extracción del ADN genómico de <i>Embleya</i> sp. NF3	90
6.3.1.2 Fragmentación del ADN genómico.....	90
6.3.1.3 Reparación de los fragmentos de ADN genómico y su ligación al vector..	91
6.3.1.4 Infección y selección de las clonas que tienen el vector recombinante.....	92
6.3.1.5 Almacenamiento de la biblioteca genómica	93
6.3.2 Caracterización de la biblioteca genómica	93
6.3.2.1 Cobertura de la biblioteca genómica	93
6.3.2.2 Búsqueda de los genes de interés en la biblioteca genómica	94
7. Conclusiones.....	96
8. Perspectivas.....	97
9. Referencias	98
10. Anexos	111

Índice de figuras

Figura 1. A). Predicción de muertes anuales atribuibles a la resistencia antimicrobiana para el año 2050 comparado con otras causas mayores de muerte. B). Estimación de la distribución de muertes atribuibles a la resistencia antimicrobiana para el año 2050. Tomado de: O'Neill, 2014.....	16
Figura 2. Estructura de algunos productos naturales sintetizados por bacterias del filo actinobacteria utilizados actualmente en la clínica. Elaboración propia.	19
Figura 3. Minería genómica y técnicas que la apoyan. Elaboración propia.....	23
Figura 4. A) Esquema de la captación de hierro en bacterias gram negativas. B) Esquema de la captación de hierro en bacterias gram positivas. Tomado y modificado de Seyoum <i>et al.</i> , 2021.	26
Figura 5. Clasificación de los sideróforos según su denticidad y naturaleza química. Tomado y modificado de Su <i>et al.</i> , 2016.	29
Figura 6. Fármacos utilizados en la medicina actual que tienen un sideróforo como compuesto activo. A) Estructura del Desferal®. B) Estructura del Cefiderocol (Fetroja®). Tomado y modificado de: Bogdan <i>et al.</i> , 2016; Fetroja (Cefiderocol), s.f.	33
Figura 7. Estrategia metodológica.....	37
Figura 8. Fórmula para calcular el porcentaje de cobertura de una biblioteca genómica. Tomada de Rosengarten <i>et al.</i> , 2015.....	49
Figura 9. Alineamiento múltiple de secuencias de aminoácidos de sintetetas de sideróforo realizado con Clustal omega. Las flechas negras señalan los 9 aminoácidos conservados del sitio catalítico reportados en la literatura. lucC, sintetasa de sideróforo lucC de <i>Klebsiella pneumoniae</i> ; NIS1426, gen 1426 del clúster 1.9 de <i>Embleya</i> sp. NF3; DfoC, sintetasa de sideróforo <i>Erwinia amylovora</i> ; DesD, sintetasa de sideróforo de <i>Streptomyces coelicolor</i> ; NIS49, gen 49 del clúster 2.2 de <i>Embleya</i> sp. NF3; lucA, sintetasa de sideróforo lucA de <i>Klebsiella pneumoniae</i> ; NIS48, gen 48 del clúster 2.2 de <i>Embleya</i> sp. NF3; NIS1302, gen 1302 del clúster 1.8 de <i>Embleya</i> sp. NF3; NIS1429, gen 1429 del clúster 1.9 de <i>Embleya</i> sp. NF3.	62
Figura 10. Alineamiento múltiple de secuencias de aminoácidos del dominio de condensación (C) de enzimas NRPS realizado con Clustal omega. Las flechas negras señalan los aminoácidos conservados del sitio catalítico reportados en la literatura para la proteína VibH de <i>Vibrio cholerae</i> . a) Alineamiento de la proteína VibH, el gen 158 del clúster 3.2 de <i>Embleya</i> sp. NF3 y el gen 5242 del clúster 1.16 de <i>Embleya</i> sp. NF3. b) Alineamiento de la proteína VibH y el gen 159 del clúster 3.2 de <i>Embleya</i> sp. NF3.....	71
Figura 11. Alineamiento múltiple de secuencias de aminoácidos del dominio de adenilación (A) de enzimas NRPS realizado con Clustal omega. Las flechas negras señalan los aminoácidos conservados del sitio catalítico reportados en la literatura para la proteína DhbE de <i>Bacillus subtilis</i> . 161, gen 161 del clúster 3.2 de <i>Embleya</i> sp. NF3; 5242, Gen 5242 del clúster 1.16 de <i>Embleya</i> sp. NF3; 159, gen 159 del	

clúster 3.2 de *Embleya* sp. NF3; 158, gen 158 del clúster 3.2 de *Embleya* sp. NF3.
..... 72

Figura 12. Alineamiento múltiple de secuencias de aminoácidos del dominio de proteína transportadora de péptido (PCP) de enzimas NRPS realizado con Clustal omega. Las flechas negras señalan el aminoácido conservado del sitio catalítico reportado en la literatura para la proteína Blm1 de *Streptomyces verticillus* y EntB de *Escherichia coli*. 161, gen 161 del clúster 3.2 de *Embleya* sp. NF3; 159, gen 159 del clúster 3.2 de *Embleya* sp. NF3; 158, gen 158 del clúster 3.2 de *Embleya* sp. NF3; 5242, Gen 5242 del clúster 1.16 de *Embleya* sp. NF3. 73

Figura 13. Alineamiento múltiple de secuencias de aminoácidos del dominio tioesterasa (TE) de enzimas NRPS realizado con Clustal omega. Las flechas negras señalan los aminoácidos conservados del sitio catalítico reportados en la literatura para la proteína EntF de *Escherichia coli*. 159, gen 159 del clúster 3.2 de *Embleya* sp. NF3; 5242, Gen 5242 del clúster 1.16 de *Embleya* sp. NF3..... 73

Figura 14. Evaluación de la producción de sideróforos utilizando el ensayo CAS en placas de agar. A) Placas de agar CAS tras 66 h de incubación con trozos de agar de los medios NMMP, CMM y YMG en los cuales creció previamente *Embleya* sp. NF3 por 4 días. B) Diámetro de los halos alrededor de los trozos de agar de 0.85 cm tras 19 y 66 h de incubación en el agar CAS. La producción de sideróforo fue clasificada cualitativamente por cruces. 79

Figura 15. Resultados del ensayo de sal de tetrazolium. CH, cloruro de hidroxilamina [0.05 mg/mL]; NF3, extracto de *Embleya* sp. NF3; NMMP, extracto del medio NMMP. 80

Figura 16. Resultados del ensayo de Arnow. CA, catecol [0.05 mg/mL]; 2,3, ácido 2,3 dihidrobenzoico [0.05 mg/mL]; NF3, extracto de *Embleya* sp. NF3; NMMP, extracto del medio NMMP. 81

Figura 17. CCF revelada con FeCl₃ 0,1 M en HCl 0,1 N. 1, agua; 2, metanol; 3, 5 µL de extracto del medio NMMP; 4, 5 µL de extracto de *Embleya* sp. NF3; 5, 0.1 mg/mL de desferroxamina; 6, 0.003 mg/mL catecol; 7, 0.016 mg/mL ácido 2,3 dihidrobenzoico; 8, 0.1 mg/mL cloruro de hidroxilamina; 9, 10 µL de extracto de *Embleya* sp. NF3; 10, 10 µL de extracto del medio NMMP; 11, 2 µL de extracto de *Embleya* sp. NF3; 12, 2 µL de extracto del medio NMMP. Los controles positivos catecol y ácido 2,3 dihidrobenzoico presentaron tonalidad gris oscura/morada. El control positivo desferroxamina presentó tonalidad naranja. La escala de los valores de R_f se muestra a la izquierda de la figura..... 82

Figura 18. CCF revelada con el reactivo de Arnow. 1, agua; 2, metanol; 3, 5 µL de extracto del medio NMMP; 4, 5 µL de extracto de *Embleya* sp. NF3; 5, 0.1 mg/mL de desferroxamina; 6, 0.003 mg/mL catecol; 7, 0.016 mg/mL ácido 2,3 dihidrobenzoico; 8, 0.1 mg/mL cloruro de hidroxilamina; 9, 10 µL de extracto de *Embleya* sp. NF3; 10, 10 µL de extracto del medio NMMP; 11, 2 µL de extracto de *Embleya* sp. NF3; 12, 2 µL de extracto del medio NMMP. Los controles positivos catecol, ácido 2,3 dihidrobenzoico y desferroxamina presentaron tonalidad amarilla. La escala de los valores de R_f se muestra a la izquierda de la figura. 83

Figura 19. A) Cromatograma del UPLC-MS del control con desferroxamina. La flecha negra indica el tiempo de retención de este compuesto (3.35 min). B) Análisis de masas del pico del tiempo de retención de 3.35 min. Masa de 561.3612 Da con error de 1.1 ppm. La composición química del pico sugerida por el programa corresponde con la composición química de la desferroxamina ionizada positivamente ([M+H] ⁺).	86
Figura 20. Cromatograma de iones extraídos de la muestra del sobrenadante (MS) donde se identificaron isotopos que sugieren la presencia de la griseobactina en la muestra. A) Cromatograma del isotopo [M+3H] ³⁺ en m/z 394.1652. B) Cromatograma del isotopo [M+2H] ²⁺ en m/z 590.7409.	88
Figura 21. ADN genómico de <i>Embleya</i> sp. NF3. Carril 1, Marcador de peso molecular “Generuler 1kb ADN lader” de THERMO; Carril 2, ADN genómico de <i>Embleya</i> sp. NF3.	90
Figura 22. Fragmentación del ADN genómico de <i>Embleya</i> sp. NF3 utilizando jeringa para insulina con aguja. Carril 1, fragmentación 500 veces; carril 2, 400 veces; carril 3, 300 veces; carril 4, 200 veces; carril 5, 150 veces; carril 6, 100 veces; carril 7, 50 veces. Marcador de peso molecular: ADN control del fósido de 42 kb.	91
Figura 23. Reparación de los fragmentos de ADN y ligación al vector pCC2FOS. Carril 1, ADN de 40 kb aproximadamente tras la reparación de sus extremos; carril 2, ligación de los fragmentos reparados al vector pCC2FOS. Marcadores de peso molecular: ADN control del fósido de 42 kb y vector pCC2FOS de 8 kb.	92
Figura 24. Cálculo de la cobertura de la biblioteca genómica de <i>Embleya</i> sp. NF3 utilizando la fórmula de Rosengarten <i>et al.</i> , 2015).	94
Figura 25. Extracción de los fósidos de los <i>pools</i> A1 al A5 de la caja #11 de 24 pozos. Fósido recombinante marcado con un recuadro negro.....	94

Índice de tablas

Tabla 1. Potenciales aplicaciones de los sideróforos.....	32
Tabla 2. Gradiente de solvente y flujo utilizado para determinar la presencia de sideróforos en las muestras analizada por UPLC-MS.....	44
Tabla 3. Volúmenes de reactivo para la reparación de los fragmentos de ADN...	46
Tabla 4. Volúmenes de reactivo para la ligación utilizando la enzima T4 ADN ligasa de NEB.	47
Tabla 5. Cebadores utilizados para la amplificación por PCR de los genes de interés.	50
Tabla 6. Volúmenes de reactivo para la PCR utilizando concentraciones de DMSO al 5% y 10%.	52
Tabla 7. Clústeres de genes biosintéticos para la síntesis de sideróforos vía NIS y vía NRPS identificados en el genoma de las 4 actinobacterias estudiadas por medio del programa antiSMASH v 6.0. El porcentaje de similitud entre los clústeres codificados por cada cepa con clústeres descritos en la literatura se encuentra dentro de los recuadros verdes.	54
Tabla 8. Características reportadas por el programa antiSMASH v.6.0 para los cinco CGB de sideróforo identificados en el genoma de <i>Embleya</i> sp. NF3. Genes biosintéticos mínimos en color rojo, genes biosintéticos adicionales en color rosado, genes no relacionados con el clúster en color gris, genes reguladores en color verde y genes para transporte en color gris.	55
Tabla 9. Función sugerida de los genes que conforman los tres clústeres NIS codificados en el genoma de <i>Embleya</i> sp. NF3.	56
Tabla 10. Composición de los tres clústeres NIS codificados en el genoma de <i>Embleya</i> sp. NF3 teniendo en cuenta la función sugerida de los genes y los reportes de la literatura. Los genes que podrían participar en la biosíntesis y transporte de sideróforos se encuentran marcados con números que indican su posición en el genoma.	58
Tabla 11. Porcentaje de identidad y cobertura de los genes que conforman tres los clústeres NIS codificados en el genoma de <i>Embleya</i> sp. NF3 con clústeres de sideróforos conocidos.	60
Tabla 12. Secuencias consenso de la secuencia operadora a las que se une el regulador DtxR/IdeR. La secuencia palindrómica se encuentra subrayada. La guanina o citosina que interrumpe el palíndromo se encuentra en rojo	63
Tabla 13. Secuencias operadoras putativas para la unión del regulador DtxR/IdeR identificadas en los clústeres NIS. La secuencia palindrómica se encuentra subrayada. La guanina o citosina que interrumpe el palíndromo se encuentra en rojo.	64

Tabla 14. Secuencias consenso de la región operadora a las que se une el regulador FUR. La secuencia palindrómica se encuentra subrayada. La adenina que interrumpe el palíndromo se encuentra en rojo	64
Tabla 15. Características de los tres clústeres NIS identificadas por los análisis <i>in silico</i> . Los genes biosintéticos agrupan los genes biosintéticos mínimos y los genes biosintéticos adicionales.....	65
Tabla 16. Función sugerida de los genes que conforman los dos clústeres NRPS codificados en el genoma de <i>Embleya</i> sp. NF3..	66
Tabla 17. Esquema de la organización de dos los clústeres NRPS codificados en el genoma de <i>Embleya</i> sp. NF3. Los genes que según la literatura pueden participar en la biosíntesis y transporte de sideróforos se encuentran marcados con números que indican su posición en el genoma.	68
Tabla 18. Porcentaje de identidad y cobertura de los genes que conforman los dos clústeres NRPS codificados en el genoma de <i>Embleya</i> sp. NF3 con clústeres de sideróforos conocidos.	69
Tabla 19. Secuencias operadoras putativas para la unión del regulador DtxR/IdeR identificadas en el clúster NRPS. La secuencia palindrómica se encuentra subrayada. La guanina o citosina que interrumpe el palíndromo se encuentra en rojo.	74
Tabla 20. Características de los dos clústeres NRPS identificadas por los análisis <i>in silico</i> . Los genes biosintéticos agrupan los genes biosintéticos mínimos y los genes biosintéticos adicionales.....	75
Tabla 21. Transportadores de sideróforo de tipo ABC identificados en el genoma de <i>Embleya</i> sp. NF3 por medio del programa PATRIC. No se midió la distancia entre los transportadores y los clústeres ubicados en diferentes contigs. La secuencia palindrómica se encuentra subrayada. La guanina o citosina que interrumpe el palíndromo se encuentra en rojo.....	77
Tabla 22. Resultados del monitoreo de la producción de sideróforos durante el procesamiento de las muestras previo al análisis de UPLC-MS por medio del agar CAS. La producción de sideróforo fue clasificada cualitativamente por cruces.....	84
Tabla 23. Muestras analizadas por UPLC-MS y organización para su análisis	85
Tabla 24. Masa molecular teórica de los sideróforos buscados manualmente en las muestras del extracto metanólico del sobrenadante de de <i>Embleya</i> sp. NF3 con y sin adición de hierro.	86
Tabla 25. Características de las dos rondas de infecciones realizadas.....	93
Tabla 26. Resultados de la búsqueda de los genes de interés en los 87 <i>pools</i> de la biblioteca genómica.....	95

TABLA DE ABREVIATURAS

Abreviatura	Significado
Å	Ángstrom
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ARN	Ácido ribonucleico
°C	Grados Celsius
µg	Microgramo
µL	Microlitro
µm	Micrómetro
Abs	Absorbancia
BAGEL	Herramienta de minería genómica para bacteriocinas
BLAST	Herramienta básica de búsqueda de alineación local
CGB	Clúster de genes biosintéticos
G+C	Guanina y Citosina
cm	Centímetro
DMSO	Dimetilsulfóxido
dNTP	Deoxinucleósido trifosfato
H ₂ O	AguaB
FeCl ₃	Cloruro férrico
kb	Kilobase
kDa	Kilodalton
LB	Caldo de Lisogenia
M ⁺	Ion molecular
Mb	Megabase
mg	Miligramo
min	Minuto
mL	Mililitro
mm	Milímetro
m/z	Unidades de masa carga
nm	Nanómetros
NIS	Sideróforo independiente de NRPS
NMMP	Medio mínimo líquido
NRPS	Sintasa de péptidos no ribosomales
O/N	Toda la noche
pb	Pares de bases
PFAM	Base de datos de familias y dominios de proteínas
pH	Potencial de hidrógeno
pM	Picomolar
ppm	Partes por millón
rpm	Revoluciones por minuto
SMART	Herramienta de investigación de arquitectura modular simple
TIGRFAM	Base de datos de familias de proteínas
YEME	Medio extracto de levadura y extracto de malta
YMG	Medio glucosa, maltosa y extracto de levadura

RESUMEN

El aumento de la resistencia a agentes antibacterianos es un problema de salud pública mundial que requiere acciones y medidas urgentes. Una alternativa es la búsqueda de moléculas antimicrobianas novedosas a partir de microorganismos aislados de ambientes poco explorados, como las actinobacterias endófitas, ya que representan una fuente atractiva de compuestos bioactivos no conocidos. Por otra parte, los sideróforos son metabolitos secundarios que poseen un gran potencial para el desarrollo de nuevos compuestos farmacéuticos, sin embargo, poco se conoce sobre la capacidad de las actinobacterias de producir estos metabolitos y sus posibles aplicaciones. Por esto, resulta relevante la identificación, mediante minería genómica, de clústeres que codifiquen para sideróforos con potencial para el desarrollo de un compuesto antimicrobiano a partir de actinobacterias endófitas. En el presente trabajo se analizó el genoma de 4 actinobacterias poco estudiadas, encontrándose que la bacteria endófito *Embleya* sp. NF3 tiene la mayor capacidad biosintética para la producción de sideróforos potencialmente novedosos. Esta cepa contiene 5 clústeres putativos de sideróforos, de los cuales el clúster 1.16 codifica para la estreptobactina, los clústeres 1.9, 2.2 y 3.2 codifican para sideróforos novedosos y el clúster 1.8 sugiere no ser funcional debido a su composición. En las condiciones de cultivo evaluadas para la cepa NF3, se evidenció sólo la producción de un sideróforo de naturaleza catecolato que puede ser la estreptobactina o un compuesto con estructura química similar. Por tanto, se sugiere estudiar el potencial de los clústeres 1.9, 2.2. y 3.2 por medio de expresión heteróloga con el fin de lograr que su expresión no dependa del sistema de regulación de la cepa NF3. Teniendo en cuenta el gran potencial de la cepa NF3 para el estudio de sideróforos, se construyó su biblioteca genómica utilizando el kit CopyControl™ HTP Fosmid Library Production de Lucigen para de facilitar la clonación y expresión de los clústeres de interés. La caracterización de la biblioteca sugiere que es funcional no sólo para la búsqueda de clústeres de sideróforos sino para la búsqueda de clústeres de genes biosintéticos con potencial para codificar metabolitos bioactivos.

ABSTRACT

Resistance to antibacterial agents is a public health problem that requires urgent action and measures. An alternative to face the problem is the search for novel antimicrobial molecules from microorganisms isolated from unexplored environments such as endophytic actinobacteria since they represent an attractive source of unknown bioactive compounds. On the other hand, siderophores are secondary metabolites with great potential for developing new pharmaceutical compounds. However, little is known about the ability of actinobacteria to produce siderophores and their applications. Thus, the use of genome mining to identify clusters from endophytic actinobacteria coding for siderophores with the potential to develop an antimicrobial compound is relevant. In the present work, we analyze the genome of four actinobacteria utilizing bioinformatics programs, identifying that the endophytic bacterium *Embleya* sp. NF3 has the highest biosynthetic capacity to produce potentially novel siderophores. Strain NF3 contains five putative clusters of siderophores. Cluster 1.16 encodes for streptobactin, clusters 1.9, 2.2, and 3.2 encode novel siderophores, and cluster 1.8 suggests not being functional because of its composition. Only a catecholate siderophore was produced in the culture conditions evaluated for strain NF3. This compound could be the siderophore streptobactin or a compound with a similar chemical structure. Thus, we suggest exploring the potential of clusters 1.9, 2.2, and 3.2 by heterologous expression to ensure that the cluster expression does not depend on the strain NF3 regulatory system. Considering the great potential of strain NF3 to produce siderophores, a genomic library of this strain was constructed to facilitate the cloning and expression of clusters of interest. The genomic library was built using the CopyControl™ HTP Fosmid Library Production Kit from Lucigen. The characterization of the library suggests that it is a functional library where you will find most of the biosynthetic gene clusters of interest encoded by strain NF3.

1. INTRODUCCIÓN

Desde la introducción de los antibióticos en el mercado farmacéutico mundial en la década de 1940, se ha logrado salvar millones de personas cada año y aumentar la esperanza de vida de la población, gracias al control efectivo logrado para muchas enfermedades infecciosas. Sin embargo, en los últimos años se ha llegado a una crisis debido al drástico aumento en el número de infecciones provocadas por bacterias resistentes a los antibióticos (Hutchings *et al.*, 2019; Ventola, 2015). La resistencia antibacteriana se define como la capacidad de una bacteria para sobrevivir a un antibiótico que inhibe el crecimiento o mata a otras cepas de la misma especie (Alós, 2015). Aunque existe la resistencia natural dada por la diversidad genética de los microorganismos, la cual ha surgido a la par del descubrimiento de los antibióticos; factores como el uso masivo e innecesario de antibióticos para el tratamiento de enfermedades no infecciosas en humanos, así como para la cría de ganado y pescado, el control inadecuado de las infecciones en los hospitales y, la falta de higiene y saneamiento han conllevado a la selección de cepas resistentes (Guzmán-Trampe *et al.*, 2017; Ventola, 2015). Este aumento en la resistencia ha generado a su vez el fracaso de los tratamientos existentes, la propagación y persistencia de microorganismos resistentes y el aumento de muertes asociadas a infecciones resistentes (Ventola, 2015; Martens & Demain, 2017).

Para abril de 2019, la Organización Mundial de la Salud reportó que al menos 700,000 personas mueren anualmente en el mundo debido a enfermedades causadas por microorganismos resistentes a los antibióticos (WHO, 2019). En caso de no tomar medidas de contención pronto, esta cifra podría aumentar de forma exponencial hasta llegar a 10 millones de muertes anuales en todo el mundo para el año 2050, siendo África y Asia los continentes más afectados (Figura 1) (O'Neill, 2014).

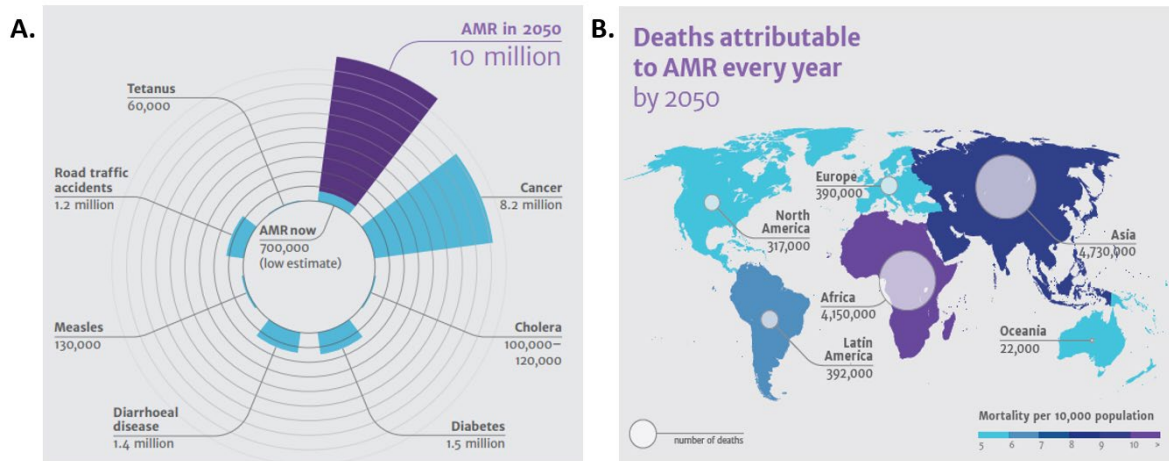


Figura 1. A). Predicción de muertes anuales atribuibles a la resistencia antimicrobiana para el año 2050 comparado con otras causas mayores de muerte. B). Estimación de la distribución de muertes atribuibles a la resistencia antimicrobiana para el año 2050. Tomado de: O'Neill, 2014.

Sumado a esta problemática, se encuentra la falta de investigación y desarrollo de nuevos antibióticos por: 1) el poco apoyo de los gobiernos y 2) el abandono de este campo de investigación por parte de las compañías farmacéuticas, al no ser rentable por la alta probabilidad de redescubrir compuestos bioactivos y por el aumento en los costos y tiempos de desarrollo de antibióticos (Cooper & Shlaes, 2011; Martens & Demain, 2017). Por lo anterior, las farmacéuticas han optado por dedicarse al estudio de moléculas sintéticas, a la reducción de la toxicidad de compuestos ya conocidos y al desarrollo de medicamentos para enfermedades crónicas, las cuales generan mayor retorno de inversión (Ventola, 2015; Martens & Demain, 2017).

En consecuencia, existe una gran necesidad de buscar compuestos antimicrobianos con mecanismos de acción diferentes que combatan de manera eficiente a los microorganismos resistentes. En los últimos años esta búsqueda se ha impulsado gracias a la implementación de las ciencias ómicas y al avance de la bioinformática, herramientas que han facilitado la exploración de la diversidad microbiana y la identificación de vías crípticas para la biosíntesis de productos naturales potencialmente novedosos, evitando así el redescubrimiento de compuestos ya descritos (Martens & Demain, 2017).

1.1 Productos naturales

Los productos naturales se definen como compuestos o sustancias químicas producidas por organismos vivos. En este trabajo nos enfocaremos sólo en los productos naturales que son sintetizados las por plantas y los microorganismos (Krause & Tobin, 2013). En ocasiones, los productos naturales son metabolitos secundarios (MS) sintetizados en la fase tardía del crecimiento exponencial y durante la fase estacionaria de crecimiento (Ruiz *et al.*, 2010; Thirumurugan *et al.*, 2018). Los MS tienen la característica de no ser esenciales para el crecimiento; sin embargo, brindan ventajas evolutivas y ayudan a la supervivencia de los organismos que los producen (Madigan *et al.*, 2015).

1.1.1 Productos naturales bioactivos

Dado que un gran porcentaje de productos naturales poseen actividad biológica de interés farmacológico de tipo antimicrobiana, antitumoral, antiviral, antiparasitaria, entre otras, han sido la principal fuente para la obtención de fármacos desde hace casi 100 años (Demain & Sánchez, 2009). Si bien, para el año 2015 se habían reportado entre 38,000 y 75,000 productos naturales bioactivos producidos por microorganismos (actinobacterias, eubacterias y hongos) así como por plantas y organismos marinos, se estima que sólo una pequeña parte de las especies identificadas han sido probadas para determinar su actividad biológica y que sólo el 1% de los microorganismos han sido cultivados, por lo que se espera que el identificar microorganismos no caracterizados conlleve al descubrimiento de productos naturales bioactivos novedosos (Bérdy, 2012; Bérdy, 2015).

Por otra parte, algunos productos naturales han sido modificados químicamente para la síntesis de compuestos análogos o novedosos, así como han servido de plataforma para el desarrollo de compuestos sintéticos que posean mayor eficacia y/o menor toxicidad que el producto original. Estos productos naturales modificados representan entre el 50% y 60% de los medicamentos farmacéuticos actuales (Bérdy, 2015; Butler *et al.*, 2013; Patridge *et al.*, 2016). Por lo tanto, los productos

naturales continúan sobresaliendo como una fuente para el desarrollo de fármacos o como andamio para la síntesis química de fármacos.

1.1.2 Fuentes de productos naturales bioactivos

Las plantas han sido la principal fuente para la obtención de productos naturales utilizados en la medicina tradicional. Algunos de los compuestos más conocidos son los analgésicos morfina y codeína obtenidos de la planta *Papaver somniferum* (amapola), y los antimaláricos quinina y artemisinina obtenidos de las plantas *Cinchona* (quina) y *Artemisia annua* (ajenjo dulce), respectivamente. Tras el descubrimiento de la penicilina por Alexander Fleming a partir del hongo *Penicillium chrysogenum* en 1929, se inició la búsqueda de productos naturales bioactivos en bacterias y hongos aislados de suelos. A partir de estos microorganismos se han identificado y desarrollado una gran cantidad de compuestos antibacterianos, antitumorales, antifúngicos, agentes inmunosupresores, agentes reductores del colesterol, y antiparasitarios, entre otros (Cragg & Newman, 2013). Cerca del 16% y 12% de productos naturales aprobados por la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA) y/o la Agencia Médica Europea (EMA) se basan en bacterias y hongos, respectivamente. De forma destacable se encuentran los fármacos antibacterianos, ya que para el año 2016, el 77% de los antibióticos aprobados por la FDA provenían de productos naturales obtenidos de microorganismos (Patridge *et al.*, 2016). Dentro de estos microorganismos sobresalen las actinobacterias, las cuales constituyen un filo bacteriano ampliamente conocido y estudiado por su gran potencial para la biosíntesis de productos naturales bioactivos (van Bergeijk *et al.*, 2020).

1.2 Actinobacterias: bacterias con gran potencial para la síntesis de productos naturales

El filo actinobacteria está conformado por bacterias gram positivas con genomas ricos en G+C (69 – 73%), de forma bacilar a filamentosa, principalmente aerobios que crecen en el suelo terrestre y marino; sin embargo, también pueden encontrarse como parte de la rizosfera, la endosfera, los ambientes marinos, endófitos de

plantas y en ambientes con condiciones extremas (Madigan *et al.*, 2015; Behie *et al.*, 2016; Bérdy, 2012). La mayoría de las actinobacterias tienen un crecimiento ramificado dado por hifas y pueden producir esporas resistentes a la desecación (Madigan *et al.*, 2015).

Dentro de las actinobacterias podemos encontrar una amplia diversidad de géneros bacterianos que incluyen géneros patógenos (*Mycobacterium* y *Nocardia*), así como géneros con gran capacidad metabólica para la síntesis de productos naturales bioactivos, algunos de ellos utilizados actualmente en la clínica (*Streptomyces*, *Micromonospora* y *Actinoplanes*) (Guzmán-Trampe *et al.*, 2017) (Figura 2). Dentro de los productos naturales utilizados en la clínica se encuentran compuestos con actividad antibacteriana, anticancerígena, inmunosupresora, antihelmíntica, herbicida y antiviral.

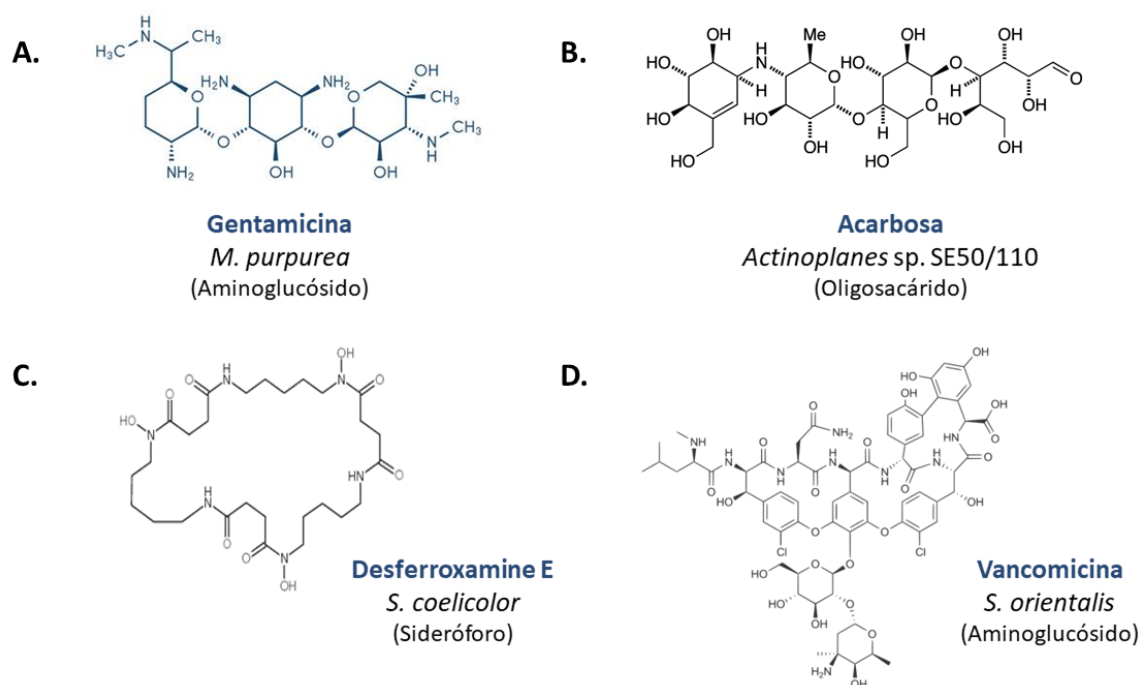


Figura 2. Estructura de algunos productos naturales sintetizados por bacterias del filo actinobacteria utilizados actualmente en la clínica. Elaboración propia.

Cabe resaltar el gran potencial de este filo para producir antibacterianos puesto que dos tercios de estos fármacos utilizados actualmente en la clínica son producidos

por actinobacterias (van Bergeijk *et al.*, 2020). Por lo tanto, estas bacterias constituyen una fuente de gran interés para la búsqueda de nuevos fármacos.

Debido a que la mayoría de los productos naturales identificados hasta el momento provienen de actinobacterias aisladas de suelos terrestres, en los últimos años se ha optado por el estudio de actinobacterias que habitan ambientes ecológicos poco estudiados ya que representan una fuente prometedora para la identificación de productos naturales novedosos. Dentro de estos ambientes ecológicos se encuentran los endófitos de plantas y los ambientes con características extremas (pH, salinidad, temperatura, presión, ambientes tóxicos) (Bérdy, 2015; Hug *et al.*, 2018).

1.2.1 Actinobacterias endófitas

Los microorganismos endófitos son bacterias y hongos que habitan dentro de una planta sin generar algún daño o síntoma de enfermedad aparente (Guzmán-Trampe *et al.*, 2015). Los endófitos se clasifican obligados, facultativos y pasivos según la estrategia que utilizan para colonizar y vivir dentro de la planta. Los endófitos obligados cumplen todo su ciclo de vida dentro de la planta y se transmiten a través de semillas, los endófitos facultativos pueden vivir en el suelo y colonizar la planta en alguna etapa de su ciclo de vida, mientras que los endófitos pasivos no son colonizadores de plantas originalmente, pero lo hacen por accidente cuando hay heridas en los pelos radiculares de la planta (Fadiji & Babalola, 2020; Haroim *et al.*, 2008). En la relación simbiote o de mutualismo establecida entre los microorganismos endófitos y las plantas se producen gran cantidad de compuestos que ayudan en procesos como la absorción de nutrientes, la promoción del crecimiento, la protección contra patógenos y la degradación de xenobióticos (Ceapa *et al.*, 2018; Sharma, 2018). Así mismo, las interacciones físicas y químicas entre los endófitos y las plantas han contribuido a la riqueza metabólica de estos microorganismos, los cuales tienen la capacidad de producir gran variedad de compuestos bioactivos con actividades de tipo antimicrobiana, anticancerígena e insecticida (Kusari *et al.*, 2012; Joseph & Priya, 2011; Martinez-Klimova *et al.*, 2017).

El principal ejemplo de producto natural bioactivo sintetizado por un endófito es el taxol (paclitaxel), un antitumoral utilizado ampliamente en la medicina (Bérdy, 2012). Aunque en los años 1971 y 1993 se detectó su presencia en la planta *Taxus brevifolia* (tejo del pacífico) y en el hongo endófito *Taxomyces andreanae*, no fue sino hasta 1996 que se comprobó su producción por los hongos endófitos del género *Taxus* (Nikolic *et al.*, 2011).

Por tanto, gracias a la co-evolución con sus hospederos, las actinobacterias endófitas representan una fuente atractiva para la identificación de nuevos compuestos con importancia médica (Matsumoto & Takahashi, 2017; Dinesh *et al.*, 2017; Singh & Dubey, 2018).

1.2.2 Actinobacterias de suelos salinos

Se denominan suelos salinos a aquellos que contienen exceso de sales solubles con sodio, calcio, potasio, cloruro, magnesio, carbonato, sulfato, bicarbonato o nitrato. La alta concentración de sales afecta el crecimiento de los microorganismos que habitan estos suelos; sin embargo, se han reportado microorganismos que tienen la capacidad de crecer en estas condiciones, los cuales han sido poco estudiados para determinar su potencial biosintético (Yan *et al.*, 2015).

Diversos investigadores han reportado el aislamiento de actinobacterias, principalmente del género *Streptomyces* a partir de suelos salinos y suelos alcalinos con capacidad de inhibir el crecimiento de otras bacterias gram positivas, gram negativas y hongos (Nishat & Alam, 2017; Vasavada *et al.*, 2006; Messaoudi *et al.*, 2020; Basilio *et al.*, 2003). Por lo tanto, los suelos salinos se postulan como un ambiente atractivo para la búsqueda de microorganismos productores de metabolitos secundarios novedosos.

En el laboratorio de Microbiología Industrial del Departamento de Biología Molecular y Biotecnología del Dr. Sergio Sánchez Esquivel en el Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM, se secuenció el genoma de cuatro actinobacterias aisladas de

ambientes poco explorados para la búsqueda de productos naturales novedosos con actividad biológica de interés farmacéutico. Tres de estas bacterias, *Streptomyces* sp. L06, *Embleya* sp. NF3 y *Actinoplanes* sp. TFC3, son endófitos aislados del árbol *Amphypterygium adstringens* (cuachalalate) a partir de una muestra de tronco obtenida en el poblado de Barranca Honda en Yautepec, Morelos (Rodríguez-Peña *et al.*, 2018). Por otra parte, *Streptomyces thermocarboxydus* K155 fue aislado de suelo salitroso de un jardín de Valle de Chalco en el estado de México (Avalos, 2010). Estas cuatro actinobacterias han sido previamente estudiadas por medio de la minería genómica, una estrategia que hace menos probable el redescubrimiento de compuestos conocidos, demostrando así su gran potencial para la síntesis de productos naturales (Vázquez-Hernández *et al.*, 2017; Rodríguez-Peña *et al.*, 2018; Guzmán-Trampe *et al.*, 2019; Centeno-Lejía *et al.*, 2016).

1.3 Minería genómica como estrategia para identificar productos naturales novedosos

Los avances en la secuenciación de genomas y la bioinformática han permitido el desarrollo de la minería genómica, una estrategia que ha mostrado ser de utilidad en el descubrimiento del gran potencial biosintético de los microorganismos (Singh *et al.*, 2021; Lee *et al.*, 2020). La minería genómica se basa en el análisis de la secuencia de ADN de microorganismos por medio de programas bioinformáticos para buscar e identificar genes de interés. En el caso de las bacterias y hongos, la minería genómica se usa preferencialmente para la identificación de genes que participan en la síntesis de MS. Generalmente, los MS se producen a partir de genes que se encuentran organizados como grupos de genes denominados clúster de genes biosintéticos (CGB). Estos CGB pueden contener genes que codifican para enzimas que sintetizan la estructura central del compuesto, enzimas que modifican dicha estructura central, proteínas reguladoras, genes de resistencia y transportadores (Kjærboelling *et al.*, 2019). Los CGB identificados por la minería genómica incluyen clústeres caracterizados experimentalmente y clústeres crípticos, siendo este último tipo de clúster una fuente con gran potencial para

identificar MS novedosos. Adicionalmente, las herramientas bioinformáticas utilizadas en la minería genómica pueden llegar a sugerir funciones e interacciones químicas del compuesto identificado (Albarano *et al.*, 2020).

Debido a que la minería genómica se centra en la genómica, es necesario que se apoye de otras técnicas como lo son la biología sintética, la biología molecular, la proteómica, metabolómica y técnicas químicas para lograr la identificación expresión, y caracterización del compuesto codificado por el CGB de interés (Albarano *et al.*, 2020; Ziemert *et al.*, 2019; Lee *et al.*, 2020) (Figura 3).

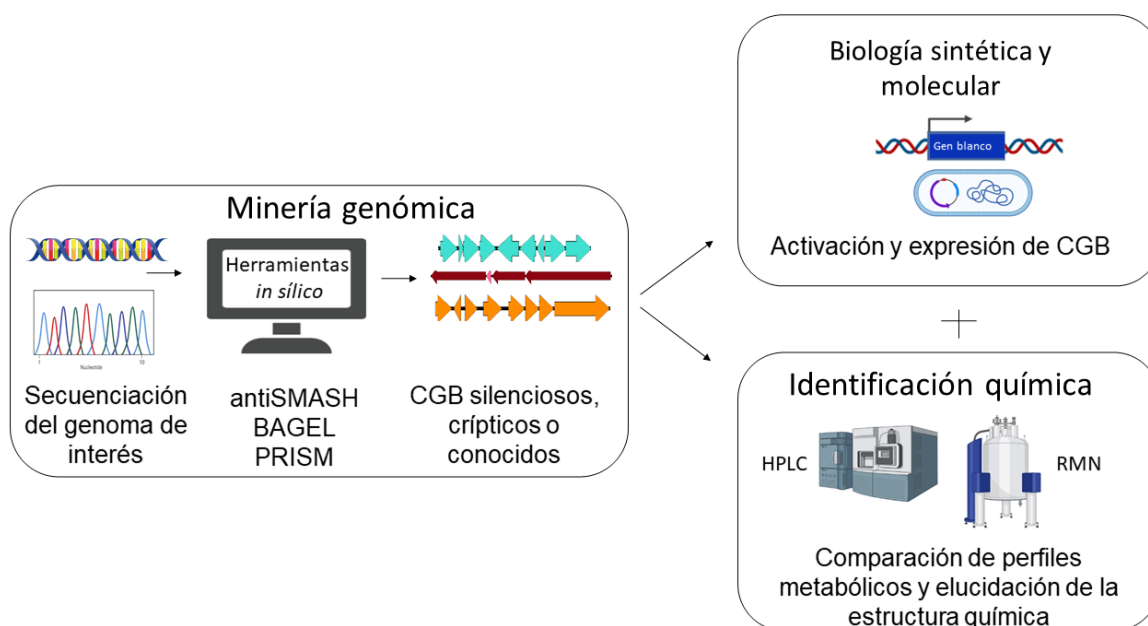


Figura 3. Minería genómica y técnicas que la apoyan. Elaboración propia.

De forma importante, la minería genómica ha permitido contrarrestar los problemas más comunes que tienen las técnicas convencionales para identificar productos naturales como son la dependencia de las condiciones de cultivo y el redescubrimiento de compuestos ya caracterizados (Baltz, 2017). Así mismo, la minería genómica tiene la ventaja de poder ser aplicada a una gran diversidad de microorganismos no cultivables, los cuales han demostrado ser una fuente rica en CGB novedosos (Rutledge & Challis, 2015; Bérdy, 2012).

1.3.1 Herramientas bioinformáticas para minería genómica

Las herramientas bioinformáticas utilizadas en la minería genómica para identificar CGB se basan principalmente en la búsqueda de secuencias de aminoácidos de enzimas conservadas que participan en la biosíntesis de MS conocidos (Ziemert *et al.*, 2020). La herramienta bioinformática más utilizada hasta el momento para la identificación de CGB es el programa antiSMASH (The antibiotics and secondary metabolite analysis Shell - <https://antismash.secondarymetabolites.org/>) que para el 2021 publicó en su versión 6.0 (Blin *et al.*, 2021). antiSMASH v.6.0 permite identificar 71 clases de CGB conocidos a partir de reglas de identificación curadas y validadas manualmente, que definen las enzimas mínimas que deben estar presentes para constituir un CGB. Estas reglas fueron diseñadas utilizando modelos de perfiles ocultos de Markov (pHMM) de PFAM, TIGRFAM, SMART, BAGEL o modelos personalizados. Así mismo, el programa antiSMASH cuenta con una gran cantidad de análisis integrados que ayudan a interpretar la función tanto del CGB completo como de los genes que lo componen, así como evaluar su contexto evolutivo (Medema *et al.*, 2011; Blin *et al.*, 2021).

Dentro de las desventajas de estos programas bioinformáticos se encuentra que sólo permiten identificar clústeres basados en CGB conocidos, por lo que clústeres que codifiquen para compuestos de clases novedosas no pueden ser identificados. Así mismo, la confiabilidad de la predicción de CGB depende de la calidad de la secuencia de los genomas analizados (Wohlleben *et al.*, 2016; Ziemert *et al.*, 2019).

Diversos autores han demostrado el gran potencial biosintético que tienen las actinobacterias utilizando la minería genómica y han logrado identificar productos naturales bioactivos novedosos (Lee *et al.*, 2020; Sing *et al.*, 2021). Por tanto, aplicar esta estrategia a los 4 genomas de actinobacterias aisladas de ambientes poco estudiados, nos permitirá conocer su verdadero potencial biosintético y en combinación con técnicas de ingeniería metabólica, se puede aumentar la probabilidad de descubrir metabolitos secundarios novedosos.

1.4 Metabolitos secundarios de actinobacterias

Las actinobacterias codifican para una gran variedad de metabolitos secundarios que se clasifican según su estructura química. Las clases más abundantes son los terpenos, policétidos, aminoglucósidos, péptidos sintetizados ribosómicamente y modificados postraduccionalmente (RiPP's), y los péptidos no ribosomales (NRPS) (Tyc *et al.*, 2017; Nair & Abraham, 2020). Sin embargo, poca atención se ha prestado a los sideróforos codificados por este filo bacteriano.

Los sideróforos son metabolitos secundarios que se encargan de quelar el hierro férrico (Fe^{3+}). El sideróforo más importante aislado de actinobacterias es la desferroxamina, identificado en 1960 a partir de *Streptomyces pilosus*. En la actualidad, la desferroxamina se utiliza para tratar la intoxicación aguda por hierro y la sobrecarga crónica de hierro relacionada con la transfusión sanguínea en pacientes con talasemia, anemia de células falciformes, síndromes mielodisplásicos, hematopoyesis ineficaz y otros trastornos anémicos hereditarios. También se puede utilizar para tratar la toxicidad crónica por aluminio en pacientes con enfermedad renal crónica y la toxicidad aguda por aluminio (Velásquez & Wray, 2021). Si bien en los últimos 10 años han aumentado los reportes de sideróforos producidos por *Streptomyces*, poco se sabe sobre sideróforos producidos por otras actinobacterias y sus posibles actividades biológicas. Por otra parte, los avances en la química analítica y la biología de sistemas han permitido realizar una identificación molecular y caracterización funcional más detallada de los sideróforos (Su *et al.*, 2016). Por tanto, se hace relevante explorar el potencial de sideróforos novedosos codificados por actinobacterias utilizando técnicas que permitan realizar una caracterización extensiva.

1.4.1 Sideróforos: metabolitos secundarios bioactivos con gran potencial biotecnológico

Los sideróforos son metabolitos secundarios de bajo peso molecular (<10 kDa) producidos por bacterias, hongos y plantas que se encargan de quelar el hierro férrico (Fe^{3+}). Los sideróforos se secretan al medio cuando el microorganismo o la

planta crece en condiciones de limitación de hierro ferroso (Fe^{2+}), soluble a pH fisiológico, pero con altas concentraciones de hierro férrico (Fe^{3+}). El sideróforo secretado captura el Fe^{3+} , insoluble a pH fisiológico, formando un complejo sideróforo- Fe^{3+} que es capturado y transportado al interior de la célula por medio de mecanismos que en bacterias varían dependiendo de si es gram negativa o gram positiva (Figura 4).

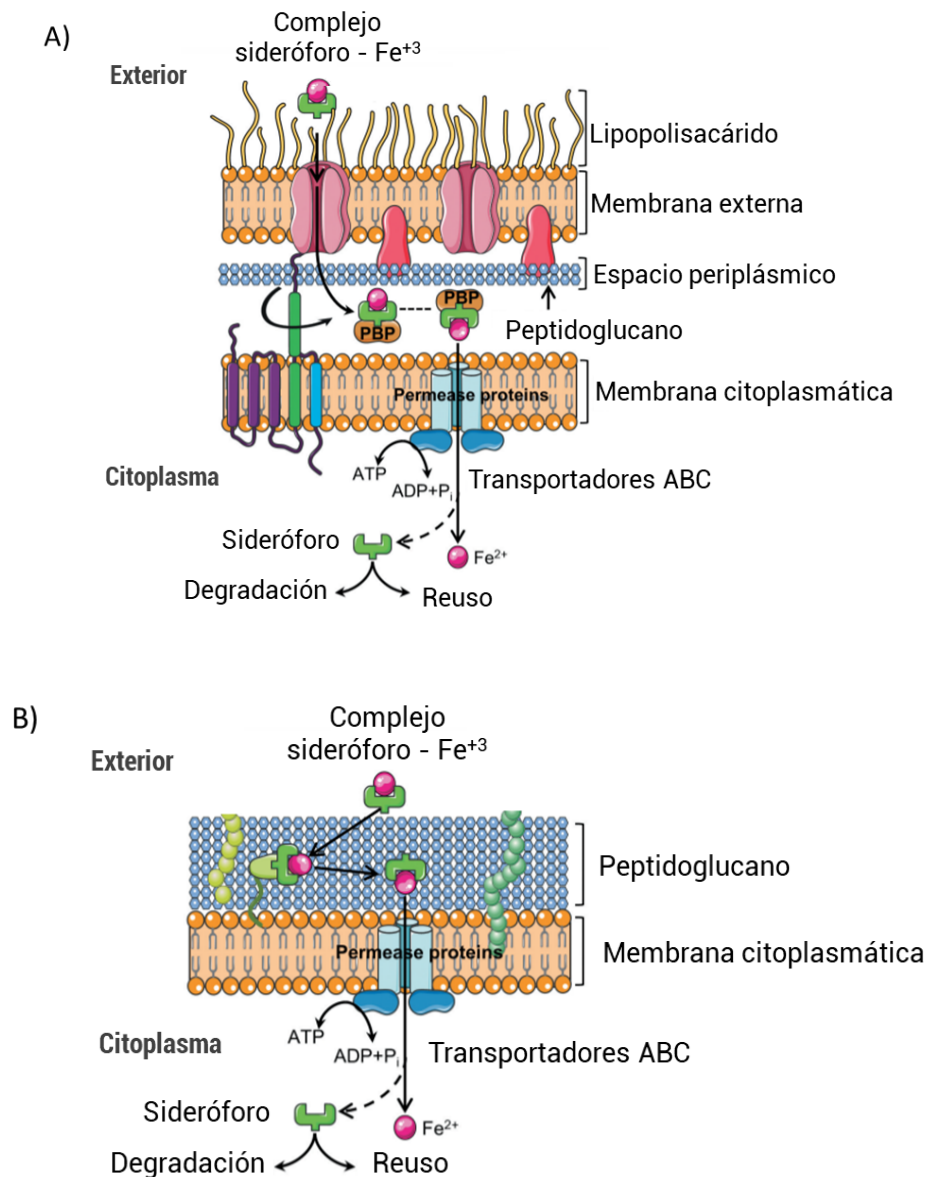


Figura 4. A) Esquema de la captación de hierro en bacterias gram negativas. B) Esquema de la captación de hierro en bacterias gram positivas. Tomado y modificado de Seyoum et al., 2021.

En el caso de las bacterias gram negativas, el complejo sideróforo-Fe³⁺ requiere pasar dos membranas para llegar al citoplasma. Por tanto, estas bacterias contienen un receptor de membrana externa inducido por la deficiencia de hierro y acoplado al complejo transductor de energía TonB, ExbB y ExbD. Ya en el espacio periplásmico, el complejo sideróforo-Fe³⁺ se moviliza por una proteína de unión periplásmica hasta los transportadores tipo ABC presentes en la membrana interna los cuales transportan activamente el complejo al citoplasma (Seyoum *et al.*, 2021; Krewulak & Vogel, 2008) (Figura 4A). Para el caso de bacterias gram positivas, el complejo es reconocido con gran afinidad por una proteína de unión que se encuentra anclada a la membrana citoplasmática y posteriormente se transporta activamente al citoplasma a través de transportadores de tipo ABC (Figura 4B). Una vez el complejo sideróforo-Fe³⁺ ingresa al citosol, el hierro es reducido a Fe²⁺, el cual es menos afín al sideróforo, por lo que se libera del complejo y puede ser utilizado en diversos procesos metabólicos (biosíntesis de ATP, síntesis de ADN y ARN, metabolismo del oxígeno, formación de bio películas, entre otros). Finalmente, los sideróforos pueden ser reutilizados o degradados según las necesidades metabólicas de hierro en la célula (Saha *et al.*, 2016; Khan *et al.*, 2018; Seyoum *et al.*, 2021; Krewulak & Vogel, 2008).

Con el fin de evitar la toxicidad causada por exceso de hierro, las bacterias cuentan con sistemas que regulan finamente la captación y transporte de este metal. En la literatura se ha reportado que la expresión de genes que participan en la biosíntesis y transporte de sideróforos en bacterias puede estar controlada por la proteína reguladora ferric uptake regulator (FUR), presente tanto en bacterias gram positivas como en gram negativas, o por la proteína reguladora iron-dependent regulatory protein/diphtheria toxin repressor (DtxR/IdeR), presente solo en bacterias gram positivas y encargada de la regulación global del hierro en el filo Actinobacteria. Ambas proteínas reguladoras, FUR y DtxR/IdeR, funcionan como represores transcripcionales. Cuando la bacteria tiene altos niveles de Fe²⁺ intracelular, este ion actúa como correpresor formando un complejo con la proteína reguladora (FUR o DtxR/IdeR) que posteriormente se une a una secuencia operadora conservada

denominada *iron box*, la cual se ubica dentro de la región promotora de los genes blanco, inhibiendo así su transcripción. Por el contrario, cuando hay bajos niveles de Fe^{2+} intracelularmente, la proteína reguladora (FUR o DtxR/IdeR) libera al correpresor (Fe^{2+}) volviéndose una proteína inactiva que se separa del *iron box*, lo que permite el reconocimiento de la región de promotora de los genes blanco por parte de la RNA polimerasa y su posterior expresión (Tierrafría, 2010; Tunca *et al.*, 2007; Tanui *et al.*, 2017; Marcos-Torres *et al.*, 2021). Aunque el mecanismo de acción de las dos proteínas reguladoras es similar, la secuencia operadora a la que se une el regulador DtxR/IdeR es un palíndromo de 19 pb interrumpido por una guanina o citosina con muy poca o ninguna similitud con la secuencia operadora a la que se une el regulador FUR, que es un palíndromo de 19 pb interrumpido por una adenina, por lo cual estos reguladores no sustituyen sus funciones entre sí (Schmitt *et al.*, 1995; Qian *et al.*, 2002; Lee & Holmes, 2000; Escolar *et al.*, 1999).

1.4.1.1 Clasificación de los sideróforos

Los sideróforos se pueden clasificar según su denticidad y según su naturaleza química.

- Clasificación según la denticidad

La denticidad se refiere al número de átomos de un sideróforo (ligando) que se unen al hierro (metal) en la formación del complejo sideróforo-hierro. Debido a que los sideróforos se unen al hierro por dos o más sitios (denticidad igual o mayor a dos) toman el nombre de quelantes (Stumm & Morgan, 1995). La afinidad de los sideróforos hacia el hierro es directamente proporcional a la denticidad (a mayor denticidad, mayor afinidad al hierro). Los sideróforos pueden ser bidentados, tridentados, tetradentados y hexadentados, siendo estos últimos los más comunes (Su *et al.*, 2016; Khan *et al.*, 2018) (Figura 5).

- Clasificación según la naturaleza química

Por otra parte, los sideróforos se clasifican según su naturaleza química y los grupos utilizados para unir el hierro en tres tipos: hidroxamato, catecolato y carboxilato.

También podemos encontrar sideróforos mixtos que pueden tener dos o más naturalezas químicas a la vez (Cassandra & Moore, 2018; Khan *et al.*, 2018; Saha *et al.*, 2016) (Figura 5).

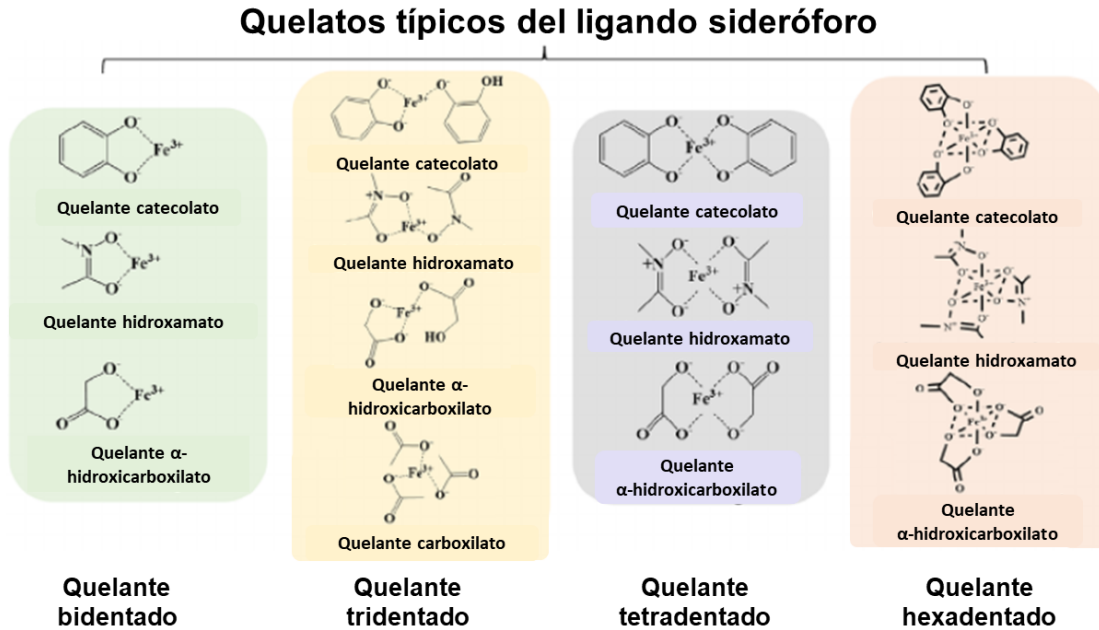


Figura 5. Clasificación de los sideróforos según su denticidad y naturaleza química. Tomado y modificado de Su *et al.*, 2016.

1. Hidroxamato

Los sideróforos de naturaleza hidroxamato son los más comunes y son producidos tanto por bacterias como por hongos. Estos sideróforos tienen grupos hidroxamato donde dos moléculas de oxígeno de cada grupo forman un enlace bidentado con el hierro. Estos sideróforos tienen una unión muy fuerte con el hierro lo que hace que sean resistente a la hidrólisis y a la degradación enzimática (Khan *et al.*, 2018; Saha *et al.*, 2016).

2. Catecolato

Los sideróforos de naturaleza catecolato son producidos sólo por bacterias. Estos sideróforos generalmente derivan del ácido 2,3 dihidrobenzoico y unen al hierro por medio de los oxígenos disponibles de los grupos hidroxilo y grupos catecolato. Tienen como característica el ser lipofílicos y resistentes a cambios de pH externos.

En los sideróforos mixtos al menos uno de los grupos presentes es un catecolato (Khan *et al.*, 2018; Saha *et al.*, 2016; Su *et al.*, 2016).

3. Carboxilato

Los sideróforos de naturaleza carboxilato son producidos por bacterias y hongos. Estos metabolitos pueden dividirse en complejos carboxilato y en α -hidroxicarboxilato, que se componen de aniones carboxilatos y aniones carboxilato y aniones hidroxilo, respectivamente. El hierro se une a través de los oxígenos de los grupos carboxilato e hidroxilo (Khan *et al.*, 2018; Su *et al.*, 2016).

Hasta la fecha sólo se ha reportado en la literatura la producción de sideróforos de naturaleza hidroxamato y catecolato en actinobacterias.

1.4.1.2 Biosíntesis de los sideróforos

Los sideróforos pueden ser sintetizados por dos vías metabólicas: una vía dependiente de sintetetasas de péptidos no ribosomales (*NRPS*, por sus siglas en inglés) y una vía de sideróforo independiente de *NRPS* (*NIS*, por sus siglas en inglés).

Los sideróforos producidos por la vía *NRPS* son los más comunes y como su nombre lo indica, su síntesis depende de enzimas *NRPS*. Las *NRPS* son enzimas modulares y multidominio que trabajan de forma secuencial para unir aminoácidos, ácidos carboxílicos e hidroxiácidos a través de intermediarios tiol. Estas enzimas están conformadas por un módulo de iniciación, un módulo de alargamiento y un módulo final. El módulo de iniciación, el cual es el módulo mínimo que debe contener una enzima *NRPS*, está conformado por un dominio de adenilación (A) y un dominio de proteína portadora de peptidilo (PCP o T). Los módulos de alargamiento están conformados por los dominios A, PCP y un dominio de condensación (C). Los sustratos son reconocidos específicamente por el dominio A y adenilados en el grupo carboxilo para formar aminoacil-adenilato. El aminoácido activado es transferido por el dominio PCP a través de un enlace tioéster a un dominio C, donde

se produce la formación del enlace peptídico. Por último, el módulo final contiene un dominio tioesterasa (TE) o un dominio reductasa (R) que se encarga de la hidrólisis o ciclación de la cadena peptídica ensamblada por el módulo de alargamiento, permitiendo su liberación. Adicionalmente, estas enzimas pueden tener dominios de epimerización, N-metilación y heterociclización que modifican la cadena peptídica unida al dominio PCP (Carroll & Moore, 2018; Lautru & Challis, 2004; Kadi & Challis, 2009). El tamaño y la secuencia de los péptidos no ribosomales puede llegar determinarse a partir del número y el orden de módulos en las enzimas NRPS que catalizan su ensamblaje (Kadi & Challis, 2009).

Por otra parte, los sideróforos producidos por la vía NIS han sido menos estudiados. La enzima biosintética mínima para la producción de NIS es la sintetasa de sideróforo, una enzima que pertenece a la superfamilia de sintetasas de sideróforo y que se encarga principalmente de condensar un ácido cítrico o un derivado con un grupo amino o un grupo alcohol (Cassandra & Moore, 2018). Las sintetasas de sideróforo se pueden clasificar en tipo A, B o C según su afinidad a los sustratos. Las sintetasas tipo A tienen especificidad por ácido cítrico y mono aminas o sustratos con amidas. Las sintetasas tipo B son específicas para α -cetoglutarato e intermediarios con aminas. Las sintetasas tipo C tienen especificidad por monoaminas, amidas y derivados del ácido cítrico o el ácido succínico (Cassandra & Moore, 2018; Kadi & Challis, 2009). Los clústeres NIS pueden contener entre una a tres enzimas sintetasas de sideróforo. Adicionalmente, la mayoría de los clústeres NIS descritos en la literatura contienen enzimas biosintéticas adicionales que varían en número y función según el tipo de sideróforo del que se esté hablando. Las enzimas biosintéticas adicionales más comunes son la mono oxigenasa, acetil o acil-CoA transferasa, descarboxilasa dependiente de piridoxal fosfato (PLP) y aminotransferasa. Así mismo, es común encontrar dentro del clúster genes que codifican para transportadores o reguladores (Challis *et al.*, 2005; Burrell *et al.*, 2012).

Se ha reportado una asociación entre la naturaleza química y la vía de síntesis de los sideróforos donde los sideróforos de naturaleza hidroxamato y catecolato se sintetizan principalmente a partir de la vía NRPS mientras que los sideróforos de naturaleza carboxilato y otros sideróforos de naturaleza hidroxamato son ensamblados por la vía NIS (Kadi & Challis, 2009; Gubbens *et al.*, 2017).

1.4.1.3 Aplicaciones de los sideróforos

Diversos estudios han reportado que los sideróforos pueden tener aplicaciones en el campo de la medicina, la agricultura y la biorremediación (Tabla 1) (Fan & Fang, 2021; Saha *et al.*, 2016; De serrano 2017; Kurth *et al.*, 2016; Ribeiro & Simões, 2019; Terra *et al.*, 2021; de Carvalho & Fernandes, 2014; Mike *et al.*, 2016). Aunque es de nuestro interés la búsqueda de aplicaciones farmacéuticas, no se descarta que los sideróforos potencialmente novedosos identificados en este estudio tengan actividad en otro campo de acción.

Tabla 1. Potenciales aplicaciones de los sideróforos.

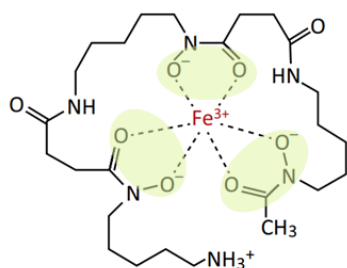
Campo de acción	Actividad
Medicina	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Antibacteriano utilizando la estrategia de caballo de Troya ✓ Enfermedades por sobrecarga de hierro ✓ Inhibición de biopelículas ✓ Antitumoral ✓ Antimalárico ✓ Vacunas – hapteno ✓ Imágenes para detección de infecciones y cáncer
Agricultura	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Promueve el crecimiento de plantas ✓ Bio control de patógenos
Biorremediación	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Remoción de metales como Co^{3+}, Ni^{3+}, Cu^{2+}, As^{3+}, Zn^{2+}

1.4.1.4 Sideróforos utilizados actualmente en la medicina

En la actualidad se encuentra disponible comercialmente dos fármacos que contienen sideróforos como compuesto activo.

El primer fármaco desarrollado y aprobado que utiliza un sideróforo es el Desferal® (Novartis), un quelante de hierro que tiene como compuesto activo el sideróforo desferoxamina (Figura 6A). Este fármaco se utiliza como tratamiento para la intoxicación aguda por hierro y para la sobrecarga crónica de hierro causada por anemias dependientes de transfusiones. El Desferal® se encarga de quelar el hierro libre, el hierro unido a la ferritina y a la hemosiderina, pero no quela el hierro de la transferrina. El Desferal® también promueve la degradación de la ferritina en los lisosomas induciendo su autofagia. Finalmente, el complejo Desferal-hierro es eliminado a través de la orina y/o las heces fecales vía sales biliares (Desferal®, s.f; Temraz *et al.*, 2014).

A) Desferal® unido al hierro



Sideróforo hidroxamato

B) Cefiderocol (Fetroja®)

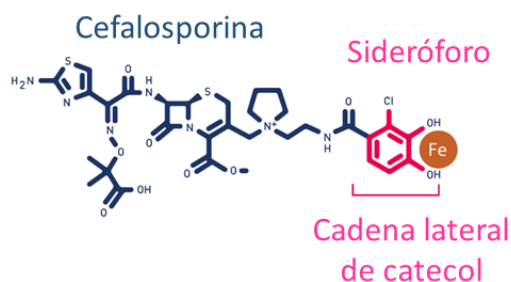


Figura 6. Fármacos utilizados en la medicina actual que tienen un sideróforo como compuesto activo. A) Estructura del Desferal®. B) Estructura del Cefiderocol (Fetroja®). Tomado y modificado de: Bogdan *et al.*, 2016; Fetroja (Cefiderocol), s.f.

El segundo fármaco es el cefiderocol (Fetroja®), aprobado por la FDA en noviembre de 2019. Este es el primer fármaco aprobado que utiliza la estrategia de caballo de troya para desarrollar un compuesto bactericida. La estrategia de caballo de troya aprovecha la capacidad de los sideróforos de transportar el hierro al interior de las células bacterianas. El compuesto con actividad bactericida se compone de un conjugado Fe^{3+} -sideróforo-enlazador-antibiótico, donde el antibiótico utilizado tiene la característica de no poder cruzar la membrana bacteriana por sí sólo. El complejo Fe^{3+} -sideróforo es reconocido por los receptores de sideróforos ubicados en la

superficie celular bacteriana, los cuales ingresan el conjugado al citoplasma donde el antibiótico actúa en su sitio blanco (Ribeiro & Simões, 2019).

El Cefiderocol (Fetroja®) tiene una estructura química conformada por un sideróforo de naturaleza catecolato con un motivo de ácido 2-cloro3,4-dihidroxibenzoico junto con dos estructuras relacionadas con los antibióticos ceftazidima y cefepima (Zhanel *et al.*, 2019 (Figura 6B). Zhanel *et al.* reportan que la Fetroja® tiene actividad frente a bacilos gram negativos multidrogoresistentes (MDR), incluyendo Enterobacteriales, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii* y *Stenotrophomonas maltophilia*. Por el momento, la Fetroja® está indicado para el tratamiento de enfermedades infecciosas complicadas del tracto urinario y para el tratamiento de neumonía bacteriana adquirida en el hospital y neumonía bacteriana asociada al ventilador (Fetroja®, s.f).

2. JUSTIFICACIÓN

El aumento de la resistencia a compuestos antimicrobianos es un problema de salud pública que genera alrededor de 700.000 muertes al año y que requiere medidas inmediatas para evitar que llegue a causar 10 millones de muertes al año en el 2050. Una de las acciones a tomar es el desarrollo de nuevos fármacos contra microorganismos resistentes utilizando sideróforos, que son metabolitos secundarios con un amplio rango de aplicaciones de interés médico e industrial, mediante la estrategia de caballo de troya la cual facilita la llegada del fármaco al sitio blanco y genera menor resistencia. Por otra parte, las actinobacterias son conocidas por su gran potencial biosintético, pero poco se sabe sobre su capacidad para producir sideróforos y sus posibles aplicaciones, especialmente si se trata de actinobacterias aisladas de ambientes poco explorados. Por lo tanto, resulta relevante identificar en este tipo de actinobacterias, por medio de minería genómica, clústeres que codifiquen para sideróforos potencialmente novedosos que puedan ser estudiados para el desarrollo de compuestos de interés para la industria farmacéutica.

3. HIPÓTESIS

Mediante minería genómica aplicada a una actinobacteria aislada de un ambiente poco común se identificará al menos un sideróforo novedoso con potencial para el desarrollo de un compuesto antimicrobiano.

4. OBJETIVOS

General

Caracterizar *in silico* y químicamente clústeres para la producción de sideróforos potencialmente novedosos a partir de una actinobacteria aislada de un ambiente poco estudiado.

Particulares

- ✓ Analizar con bioinformática el genoma de 4 actinobacterias poco estudiadas y seleccionar una cepa que tenga potencial para producir sideróforos potencialmente novedosos.
- ✓ Analizar *in silico* los clústeres de sideróforos codificados en el genoma de la cepa a estudiar.
- ✓ Evaluar la producción de sideróforos en condiciones de laboratorio y caracterizar la naturaleza química del o de los sideróforos producidos por la actinobacteria seleccionada.
- ✓ Construir y caracterizar una biblioteca genómica de ADN de la cepa seleccionada.

5. METODOLOGÍA

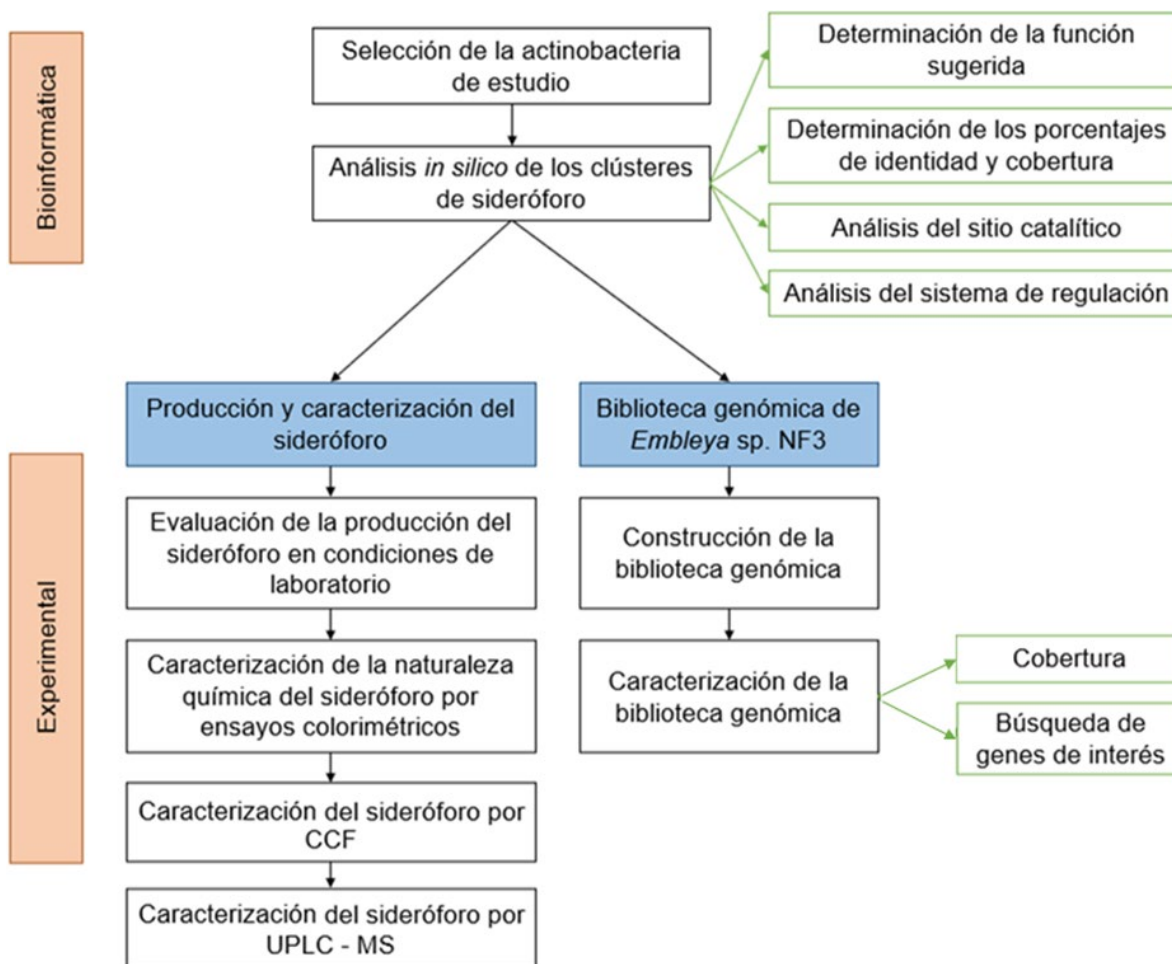


Figura 7. Estrategia metodológica.

5.1 Análisis bioinformático

5.1.1 Búsqueda de CGB de sideróforo y selección de la cepa a trabajar

La búsqueda de CGB de sideróforos en los genomas de *Streptomyces sp. L06* (13 contigs), *Embleya sp. NF3* (8 contigs), *Actinoplanes sp. TFC3* (24 contigs) y *S. thermocarboxydus K155* (8 contigs) se realizó utilizando el programa bioinformático antiSMASH v. 6.0 (Blin *et al.*, 2021). Para esto, se introdujo en la plataforma la secuencia de cada genoma bacteriano en formato FASTA y se ajustaron los parámetros así: 1) Rigurosidad de detección: “Relajado” y, 2) Características adicionales: todas activadas. La cepa de estudio definitiva se seleccionó teniendo

en cuenta el número y la similitud de los clústeres de sideróforo codificados por las 4 cepas estudiadas.

5.1.2 Análisis *in silico* de los clústeres putativos de sideróforo codificados por *Embleya* sp. NF3

5.1.2.1 Función sugerida de los genes contenidos en los clústeres de sideróforo

Para predecir la función de los genes contenidos en los clústeres de sideróforo identificados en *Embleya* sp. NF3 por el programa antiSMASH v. 6.0, se realizó una búsqueda a través de un BLAST de la secuencia de aminoácidos de cada gen en los programas UniProt e InterPro, y la base de datos no redundante del NCBI.

5.1.2.2 Identidad y cobertura de los clústeres de sideróforo con clúster de sideróforos reportados en el MIBiG

Se determinó el porcentaje de identidad y cobertura de los genes que conforman los CGB putativos identificados en *Embleya* sp. NF3 con los genes de CGB de sideróforos conocidos disponibles en el repositorio MIBiG (Minimum Information about a Biosynthetic Gene cluster) (<https://mibig.secondarymetabolites.org/>), el cual es una base de datos de referencia central para CGB de función conocida (Kautsar *et al.*, 2020). Estos porcentajes se determinaron a través de un BLAST de la secuencia de aminoácidos de los genes de interés utilizando la sección “MIBiG hits” disponible en el programa antiSMASH v. 6.0.

5.1.2.3 Alineamiento de secuencia múltiple

Se realizó un alineamiento múltiple entre la secuencia de aminoácidos de las enzimas centrales de cada clúster putativo de sideróforo identificado en *Embleya* sp. NF3 y la secuencia de enzimas que participan en la síntesis de sideróforos conocidos utilizando el programa Clustal Omega (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>). A partir de los reportes en la literatura, se identificaron los aminoácidos del sitio catalítico de los genes que codifican para

las enzimas centrales de los clústeres putativos de sideróforo con el fin de sugerir su funcionalidad.

5.1.2.4 Análisis de la regulación de los clústeres putativos de sideróforo

Debido a que la mayoría de las bacterias regula la síntesis de sideróforos por medio de la proteína FUR o DtxR/IdeR, se decidió analizar los CGB de sideróforos identificados en *Embleya* sp. NF3 con el fin de sugerir si conservan el sistema de regulación descrito en la literatura. Lo primero que se realizó fue determinar por medio del programa PATRIC v. 3.6.12 (<https://patricbrc.org/>) si la cepa NF3 codifica para la proteína FUR y/o DtxR/IdeR. Posteriormente, a partir de una búsqueda en la literatura, se seleccionaron 30 secuencias operadoras de actinobacterias confirmadas experimentalmente a las que se une el regulador DtxR/IdeR y 10 secuencias operadoras identificadas experimentalmente en el genoma de bacterias gram positivas a las que se une el regulador FUR (Cruz-Morales *et al.*, 2017; Prakash *et al.*, 2005; Lee & Holmes, 2000; Ueki *et al.*, 2009; Tunca *et al.*, 2007; Rodriguez *et al.*, 2002; Li *et al.*, 2018; Baichoo & Helmann, 2002; Fuangthong & Helmann, 2003). Utilizando el programa Unipro UGENE v.40.0 (<http://ugene.net/>) (Okonechnikov *et al.*, 2012) se realizó un alineamiento múltiple de las secuencias operadoras con Clustal Omega y se construyó un pHMM para cada secuencia operadora utilizando HMMER2. Con este perfil se realizó la búsqueda de secuencias operadoras 500 pb río arriba del inicio de los CGB putativos de sideróforo.

5.1.2.5 Búsqueda de transportadores de sideróforo putativos

Teniendo en cuenta que en la literatura se ha reportado que cada clúster de sideróforo posee su propio transportador y, que las bacterias pueden codificar transportadores que captan sideróforos no sintetizados por ellas, se decidió analizar el genoma de *Embleya* sp. NF3 por medio de la herramienta bioinformática PATRIC v. 3.6.12 con el fin de identificar el número de transportadores de sideróforos putativos codificados por esta cepa. Adicionalmente, se realizó la búsqueda de secuencias operadoras a las que se pudiera unir la proteína FUR o DtxR/IdeR en

los transportadores identificados con el fin de sugerir si conservan el sistema de regulación reportado en la literatura. Para esto se siguió la metodología descrita en la sección 5.1.2.4.

5.2 Detección de producción de sideróforo por *Embleya* sp. NF3 en condiciones de laboratorio

Para los ensayos de producción de sideróforo toda la cristalería se limpió con HCl 6M y se enjuagó con agua destilada con el fin de remover los oligoelementos.

5.2.1 Detección de la producción de sideróforo en placas de agar CAS

La producción de sideróforos por *Embleya* sp. NF3 en condiciones de laboratorio se evaluó con el ensayo de placas de agar de Cromo Azurol S (CAS) descrito por Schwyn & Neilands (1987) y siguiendo el protocolo descrito por Cruz-Morales *et al.* (2017) con modificaciones. La detección de sideróforos por medio del ensayo CAS se basa en la competencia de estos MS por el hierro presente en el complejo Fe-CAS-Bromuro de hexadeciltrimetilamonio (HDTMA). Cuando la muestra contiene al menos un sideróforo, este metabolito quelata el hierro liberando el colorante CAS, lo que provoca un cambio de color de azul a naranja (Himpsl & Mobley, 2019; Schwyn & Neilands, 1987). Para este ensayo se inocularon 2 μ L de esporas de la cepa NF3 a una concentración de 3×10^{13} /mL en cajas de agar YMG, CMM y NMMP. Se utilizaron estos medios porque permitieron generar una condición de deficiencia de hierro, condición en la que se induce la producción de sideróforos. Las placas se incubaron por 96 h a 29 °C en oscuridad como se reporta en el protocolo. Posteriormente, se cortaron trozos de agar de los cultivos de 0.85 cm de diámetro, se pusieron sobre las cajas de agar CAS y se incubaron por 66 h a 29 °C en oscuridad. A las 19 h y 66 h de incubación se midió el tamaño del halo alrededor de los trozos de agar para determinar cualitativamente el medio en el que se produce mayor concentración de sideróforo. Como control se utilizaron trozos de agar sin crecimiento bacteriano.

5.2.2 Caracterización de la naturaleza química de sideróforos por ensayos colorimétricos

5.2.2.1 Obtención del extracto orgánico a analizar

Tras determinar las condiciones para obtener y detectar la producción de sideróforos en condiciones de laboratorio, se caracterizó la naturaleza del o de los sideróforos producidos por *Embleya* sp. NF3 a partir de los metabolitos obtenidos en un extracto metanólico del sobrenadante de un cultivo de la cepa en medio NMMP por 66 h. Para esto, se creció la cepa NF3 en medio NMMP por 66 h a 29°C. Posteriormente se separó la biomasa del sobrenadante por centrifugación a 12,000 rpm por 10 minutos. A partir de 50 mL del sobrenadante, previamente concentrado al vacío, se realizó una extracción con 50 mL de metanol. El extracto metanólico se concentró al vacío hasta 5 mL. Como control negativo se obtuvo el extracto metanólico de 50 mL medio NMMP siguiendo los pasos descritos previamente.

5.2.2.2 Ensayo de sal de tetrazolio para detectar sideróforos de naturaleza hidroxamato

Se utilizó el ensayo de sal de tetrazolio para detectar sideróforos de naturaleza hidroxamato (Schwyn & Neilands, 1987). Para esto se adicionaron dos gotas de NaOH 2 N a una pizca de idonitrotetrazolio (INT) y 1 mL de extracto metanólico del sobrenadante de *Embleya* sp. NF3, obtenido previamente. Como control negativo se utilizó 1 mL de extracto metanólico del medio NMMP y como control positivo se utilizó 1 mL de desferroxamina [0.01 mg/mL] y 1 mL de cloruro de hidroxilamina [0.01 mg/mL]. La aparición de un color oscuro determina la presencia de sideróforos de naturaleza hidroxamato en la muestra.

5.2.2.3 Ensayo de Arnow para detectar sideróforos de naturaleza catecolato

El ensayo de Arnow fue utilizado para detectar sideróforos de naturaleza catecolato (Arnow, 1937). A 200 µL de extracto metanólico del sobrenadante de *Embleya* sp. NF3, obtenido previamente, se adicionaron 200 µL de HCl 0.5 M, 200 µL de reactivo de nitrito/molibdato (10 g de NaNO₂, 10 g de Na₂MoO₄·2H₂O disueltos en 50 mL de agua destilada) y 200 µL de NaOH 1 N, mezclando vigorosamente entre la adición

de cada reactivo. Como control negativo se utilizaron 200 μ L de extracto metanólico del medio NMMP y como control positivo se utilizaron 200 μ L de ácido 2,3 dihidrobenzoico [0.05 mg/mL] y 200 μ L de catecol [0.05 mg/mL]. La aparición de color amarillo indica la presencia de sideróforos catecolato.

5.2.3 Detección de sideróforos por cromatografía en capa fina (CCF)

Se determinó la naturaleza y el número de sideróforos presentes en el extracto metanólico del sobrenadante de *Embleya* sp. NF3, obtenido previamente, por cromatografía de capa fina (CCF) utilizando placas de sílica de 20 x 20 cm. Como control negativo se utilizó el extracto metanólico del medio NMMP y como control positivo se utilizó ácido 2,3 dihidrobenzoico, catecol, desferroxamina y cloruro de hidroxilamina. Las placas se colocaron en una cámara de vidrio sellada en oscuridad con isopropanol:ácido acético:H₂O (12:3:5) como fase móvil. Posteriormente, las placas se revelaron con FeCl₃ 0.1 M en HCl 0.1 N, lo cual permite ver de color gris/morado oscuro los sideróforos de naturaleza catecol y de color naranja los sideróforos de naturaleza hidroxamato. También se usó como revelador el reactivo de Arnow para determinar la presencia de sideróforos de naturaleza catecolato, los cuales toman una tonalidad amarilla. El factor de retención (R_f) fue calculado dividiendo la distancia recorrida por cada compuesto sobre la distancia recorrida por el solvente.

5.2.4 Detección de sideróforos por cromatografía líquida de ultra rendimiento con detector de espectrómetro de masas en tándem (UPLC-MS)

5.2.4.1 Obtención del extracto orgánico a analizar

Para determinar si los sideróforos producidos por *Embleya* sp. NF3 en condiciones de laboratorio son compuestos conocidos, se evaluó por UPLC-MS los metabolitos obtenidos en el extracto metanólico del sobrenadante de un cultivo de la cepa. A partir de un cultivo de la cepa NF3 en medio NMMP incubado por 66 h a 29°C, se separó la biomasa del sobrenadante por medio de centrifugación a 12,000 rpm por 10 min. Se realizó la extracción de compuestos polares con metanol a partir de 35

mL de sobrenadante previamente concentrado al vacío. El extracto metanólico se concentró al vacío hasta remover la mayor cantidad de solvente y se resuspendió en 1 mL de acetonitrilo:H₂O (1:1) para formar un stock del extracto. Como control negativo se obtuvo el extracto metanólico de 35 mL de medio NMMP siguiendo los pasos descritos previamente.

5.2.2.2 Monitoreo de la producción de sideróforo en los extractos a analizar

La presencia de sideróforos durante la obtención de los extractos orgánicos a analizar fue monitoreada por medio de placas de agar CAS. Para esto, con ayuda de una punta de micropipeta estéril se realizaron pozos de 0.85 cm de diámetro en placas de agar CAS. Se adicionaron a los pozos 200 µL de las siguientes muestras: sobrenadante de *Embleya* sp. NF3 tras 66 h de cultivo, extracto metanólico del sobrenadante de *Embleya* sp. NF3, stock del extracto del sobrenadante de *Embleya* sp. NF3 en acetonitrilo:H₂O (1:1). Como control negativo se adicionaron a los pozos 200 µL de: medio NMMP, extracto metanólico del medio NMMP, stock del extracto del medio NMMP en acetonitrilo:H₂O (1:1) y, metanol y acetonitrilo:H₂O (1:1). Como control positivo se utilizó mesilato de desferroxamina (Sigma-Aldrich) disuelta en acetonitrilo:H₂O (1:1) a una concentración de 0.5 µg/mL.

5.2.2.3 Análisis de los extractos por UPLC-MS

A partir del stock del sobrenadante de *Embleya* sp. NF3 se realizó una dilución 1:20 con acetonitrilo:H₂O (1:1) y se filtró 1 mL de esta dilución con una membrana de 0.22 µm antes de ser inyectada al UPLC-MS. Adicionalmente, se evaluó la presencia de complejos sideróforo-Fe³⁺ para lo cual se adicionaron 16 µL de FeCl₃ 1M a 1 mL de la dilución 1:20 del sobrenadante de la cepa NF3 (FeCl₃ 0.016M). La muestra con hierro se centrifugó a 12,000 rpm por 10 min para separar las partículas insolubles formadas y se filtró con una membrana de 0.22 µm antes de ser inyectada al UPLC-MS. Como control negativo se utilizó 1 mL de la dilución 1:20 del medio NMMP con y sin adición de FeCl₃ 1M. Como control positivo se utilizó 1 mL de mesilato de desferroxamina (Sigma-Aldrich) disuelto en acetonitrilo:H₂O (1:1) a una concentración de 0.5 µg/mL con y sin adición de FeCl₃ 1M.

El análisis por UPLC-MS se llevó a cabo en el espectrofotómetro de masas Xevo G2-XS Tof (Waters) equipado con una columna ACQUITY UPLC BEH C-18 (2.1 x 50 mm, 1.7 μ m, 130 Å) (Waters). Las muestras se eluyeron con una mezcla de agua (solvente A) y acetonitrilo 100% (solvente B) con 0.1% de ácido fórmico en un tiempo de ensayo de 12 minutos utilizando las condiciones de gradiente de solvente y flujo desarrolladas en este trabajo (Tabla 2). El espectrómetro de masas se configuró para detectar masas entre 100–1.200 m/z. Los resultados se analizaron utilizando el programa online XCMS (<https://xcmsonline.scripps.edu>).

Tabla 2. Gradiente de solvente y flujo utilizado para determinar la presencia de sideróforos en las muestras analizadas por UPLC-MS.

Minutos	% de solvente A	% de solvente B	Flujo
0.05	95	5	0.2 mL/min
8	60	40	0.2 mL/min
8.5	5	95	0.3 mL/min
9	5	95	0.3 mL/min
10	95	5	0.3 mL/min
12	95	5	0.2 mL/min

5.3 Biblioteca genómica de *Embleya* sp. NF3

5.3.1 Construcción de la biblioteca genómica

Debido a que nuestro interés es estudiar CGB que codifiquen para sideróforos potencialmente novedosos hemos decidido construir una biblioteca genómica que facilite la clonación y expresión de los clústeres de interés. Para la construcción de la biblioteca genómica se utilizó el kit “CopyControl™ HTP Fosmid Library Production Kit” de Lucigen. Los vectores utilizados fueron los fósmidos pCC2FOS™ y pCC1FOS™ (Lucigen) que aceptan insertos de aproximadamente 40 kb.

5.3.1.1 Extracción del ADN genómico de *Embleya* sp. NF3

Se estableció el protocolo para la extracción del ADN genómico de *Embleya* sp. NF3 a partir de modificaciones a la metodología descrita por Vázquez-Hernandez (2017)

y el protocolo descrito por Marmur (1961). Se inocularon 10 μL de esporas de la cepa NF3 en 50 mL de medio YMG y se incubó por 24 h a 29°C. Se colectó el micelio, se lavó con solución salina estéril (SSE) al 0.85%, se resuspendió en 50 mL de medio YEME para preparar protoplastos y se incubó nuevamente por 24 h a 29°C. Se colectó el micelio y se lavó con SSE 0.85%. Se adicionaron 5 mL de buffer STE (Tris 25 mM – EDTA 25 mM pH 8.0, sacarosa 0.3 M) y lisozima a una concentración final de 20 mg/mL, y se dejó en agitación leve por 23 h. Se agregaron 600 μL de SDS al 10% y se incubó por 15 minutos a 60°C. Posteriormente, se adicionaron 140 μL de pronasa 20 mg/mL y se dejó incubando a 37°C en agitación por 1 h. Se realizaron dos lavados con fenol:cloroformo (1:1). Se colectó la fase acuosa y se agregó un volumen de isopropanol al 100% y cloruro de sodio 2.5 M en una proporción 1:10, y se dejó a 4°C O/N. Finalmente se realizaron dos lavados con etanol al 70% y se resuspendió el ADN en 50 μL de buffer TE (Tris 10 mM – EDTA 1 mM pH 8.0). Posteriormente, se adicionaron 2 μL de RNAsa (20 mg/mL) y se dejó incubando a 37 °C por 1 h. Se realizaron 2 lavados con fenol:cloroformo (1:1), se recolectó la fase acuosa a la cual se le adicionó NaCl 1 M en una proporción 1:10 y 2.1 volúmenes de etanol absoluto y se dejó a -20°C por 1 hora. Se realizaron dos lavados con etanol al 70% y se resuspendió el ADN en 50 μL de buffer TE.

5.3.1.2 Determinación de la concentración y pureza del ADN

La concentración y la pureza del ADN fueron determinadas en el equipo NanoDrop™ One/OneC Espectrofotómetro de micro volúmenes de UV-Vis. Para determinar la pureza se utilizó la relación de $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$ y $A_{260\text{nm}}/A_{230\text{nm}}$.

5.3.1.3 Fragmentación del ADN

El ADN genómico fue fragmentado aleatoriamente utilizando un método mecánico para obtener fragmentos de aproximadamente 40 kb, el cual es el tamaño medio de fragmento que aceptan los vectores utilizados. Para esto, 50 μL de ADN genómico a una concentración de 50 ng/ μL se pasaron por la aguja de una jeringa para insulina entre 50, 100, 200, 300, 400 y 500 veces de forma rápida y constante. Para verificar el tamaño de los fragmentos obtenidos se cargaron 10 μL de cada prueba

de fragmentación en un gel de agarosa al 0.5% (p/v). La electroforesis se corrió a 30V por 24 h a 4 °C, utilizando como buffer de corrida TAE 1X (Tris-acetato de 0.04 M, EDTA 1 mM, pH 8.0). Como marcador de peso molecular se utilizó el ADN control del fósido de 42 kb (Lucigen). El revelado de las bandas se hizo con bromuro de etidio 0.01%.

5.3.1.4 Reparación

Se repararon los extremos cohesivos de los fragmentos de ADN de aproximadamente 40 kb con el fin de generar extremos romos, necesarios para su ligación al vector. Para la reparación se preparó la mezcla de reacción descrita en la tabla 3. La reacción se incubó a temperatura ambiente por 1 h y pasado este tiempo se inactivó la enzima a 70°C por 10 min. Para verificar la reparación se cargaron 10 µL de la reacción en un gel de agarosa al 0.7% (p/v). La electroforesis se corrió a 90 V por 90 min utilizando TAE 1X. Como marcador de peso molecular se utilizó el Fago λ y el ADN control del fósido de 42 kb. El revelado de las bandas se hizo con bromuro de etidio 0.01%.

Tabla 3. Volúmenes de reactivo para la reparación de los fragmentos de ADN.

Reactivo	Volumen
Agua estéril	10 µL
Buffer de reparación de extremos 10x	8 µL
Mix de dNTP [2.5 mM]	8 µL
ATP [10 mM]	8 µL
ADN fragmentado [417 ng/µL]	42 µL
Mix de enzima de reparación de extremos	4 µL
Volumen total de la reacción	80 µL

5.3.1.5 Ligación

La ligación de los fragmentos de ADN de aproximadamente 40 kb, previamente reparados, con los vectores pCC1FOS™ y pCC2FOS™ se realizó con la enzima T4 ADN ligasa del laboratorio NEB, siguiendo los volúmenes de reacción descritos en la tabla 4. La reacción se incubó a 16°C por 36 h. Posteriormente, se inactivó la

enzima a 70°C por 10 min. Para verificar la ligación se cargaron 2 µL de la reacción en un gel de agarosa al 0.7% (p/v). La electroforesis se corrió a 90 V por 90 min utilizando TAE 1X. Como marcador de peso molecular se utilizó el Fago λ, el ADN control del fósido de 42kb y el vector pCC2FOS (25 ng/µL) (Lucigen). El revelado de las bandas se hizo con bromuro de etidio 0.01%.

Tabla 4. Volúmenes de reactivo para la ligación utilizando la enzima T4 ADN ligasa de NEB.

Reactivo	Volumen
Agua estéril	3.6 µL
Buffer 10x	1.8 µL
Vector pCC1FOS o pCC2FOS [25 ng/µL]	1.8 µL
Inserto [218 ng/µL]	4.8 µL
Ligasa T4 ADN (NEB)	6 µL
Volumen total de la reacción	18 µL

5.3.1.6 Empaquetamiento

Una vez que se verificó la ligación de los fragmentos de 40 kb al vector, se procedió con el empaquetamiento del vector recombinante. Para esto se utilizaron los extractos de empaquetamiento proporcionados por el kit y se siguió el protocolo sugerido por la casa comercial (Anexo 2).

5.3.1.7 Infección de *Escherichia coli* EPI300-T1^R

Una vez que los fagos se empaquetaron con el vector recombinante, se realizó la infección de las células *E. coli* EPI300-T1^R provista por el kit, las cuales son resistentes al fago T1 utilizado para el empaquetamiento. Estas células tuvieron un tratamiento previo a la infección que se describe a continuación.

Tratamiento de las células *E. coli* EPI300-T1^R:

Un día antes del empaquetamiento y la infección, se incubó O/N un pre-inóculo de células *E. coli* EPI300-T1^R en medio LB. El día del empaquetamiento se inocularon 0.5 mL de pre-inóculo en 50 mL de medio LB con 10 mM de MgSO₄ y maltosa al

0.2%. El cultivo se dejó en agitación a 37 °C hasta alcanzar una densidad D.O₆₀₀ 0.8 – 1.0. Las células se almacenaron a 4 °C hasta el proceso de infección.

Infección celular

El contenido obtenido en el paso del empaquetamiento (paso 5.3.1.6) (1 mL de reacción) se adicionó a 30 mL de células de *E. coli* EPI300-T1^R previamente tratadas y se incubó por 90 min a 37°C en agitación a 100 rpm.

5.3.1.8 Selección y almacenamiento de las clonas que conforman la biblioteca genómica

Tras la infección celular se sembraron los 30 mL de células de *E. coli* EPI300-T1^R infectadas en placas de agar LB con cloranfenicol (Cm) 12.5 µg/mL, isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido (IPTG) 0.05 mM y X-gal 40 µg/mL. Las placas se incubaron a 37°C por 20 h.

La selección de las clonas que constituyen la biblioteca genómica se realizó por resistencia a antibiótico y por α-complementación. El cloranfenicol permite la selección por la resistencia a antibiótico, donde sólo las clonas que contienen alguno de los vectores utilizados (pCC1FOS y pCC2FOS) crecen en el medio de cultivo. Por otra parte, el IPTG y el X-gal permiten la selección por α-complementación, con la cual se puede diferenciar las clonas que tienen el vector vacío de las que tienen el vector recombinante. Los vectores (pCC1FOS y pCC2FOS) contienen la región N-terminal del gen *lacZ* y un sitio múltiple de clonación integrado dentro de esta región, mientras que las células *E. coli* EPI300-T1^R tienen la región C-terminal del gen *lacZ*. Cuando el vector vacío ingresa a la célula huésped, ambos fragmentos se asocian produciendo la enzima β-galactosidasa (α-complementación), la cual es capaz de hidrolizar el sustrato X-gal disponible en el medio dando una coloración azul a las colonias. Por el contrario, cuando se inserta un fragmento de ADN en el sitio de clonación del vector, la región N-terminal del gen *lacZ* se interrumpe y no se sintetiza la enzima β-galactosidasa, por lo que el X-gal no es degradado y las colonias se observan de color blanco (Glazer & Nikaido, 2007).

A partir de las placas de agar LB en las que crecieron las células de *E. coli* EPI300-T1^R infectadas se seleccionaron y repicaron las clonas blancas, las cuales contienen el fósido recombinante, de forma individual en placas de 96 pozos con 100 µL medio LB y 12.5 µg/mL de Cm. También se conformaron *pools* de clonas blancas (10 a 30 clonas individuales por *pool*), las cuales se repicaron en placas de 24 pozos con 1 mL medio LB y 12.5 µg/mL de Cm. Tras 18 h de incubación a 37 °C en agitación, se adicionó 50 µL y 500 µL de glicerol al 100% a las placas de 96 y 24 pozos, respectivamente, y se almacenaron a -80°C.

5.3.2 Caracterización de la biblioteca genómica

5.3.2.1 Estimación de la cobertura de la biblioteca genómica

Se estimó la cobertura de la biblioteca genómica de *Embleya* sp. NF3 siguiendo la fórmula descrita por Rosengarten *et al.* (2015) con modificaciones (Figura 8). Como número de clonas independientes se tomó el 90% de las clonas obtenidas (90% de las clonas obtenidas contienen fragmentos sin repetir), como proporción de clonas con inserto se tomó el valor de 0.99 (99% de clonas obtenidas tienen inserto), y como tamaño medio del inserto se tomó 40 kb.

$$\frac{\text{Número de clonas independientes} \times \text{Proporción de clonas con insertos} \times \text{Tamaño medio del inserto}}{\text{Tamaño del DNA genómico}} = \text{Cobertura}$$

Figura 8. Fórmula para calcular el porcentaje de cobertura de una biblioteca genómica. Tomada de Rosengarten *et al.*, 2015.

5.3.2.2 Búsqueda de genes de interés en la biblioteca genómica

A) Extracción de los fósidos de la biblioteca genómica

Se realizó la extracción de los fósidos recombinantes a partir de los *pools* que conforman la biblioteca. Para esto se siguió el protocolo descrito por Sambrook *et al.* (1989). Se inocularon 15 µL de cada *pool* en un matraz con 15 mL con caldo

terrific (TB) y 12.5 µg/mL de Cm, y se dejó incubando a 37 °C en agitación por 16 h. Posteriormente se siguió el protocolo descrito en el anexo 3.

B) Identificación de las clonas que contienen los CGB putativos de sideróforos

Como una estrategia para sugerir la funcionalidad de la biblioteca genómica, se identificaron los *pools* que contienen los genes conservados *rpoB* (subunidad beta de la RNA polimerasa), *gyrB* (subunidad beta de la ADN girasa), *trpB* (cadena beta de la enzima triptófano sintasa), *recA* (recombinasa A) y *atpD* (subunidad beta de la ATP sintasa), así como los *pools* que contienen la región buscada de los clústeres de la estefimicina, de la nibomicina y de los 4 CGB putativos de sideróforo por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Los 5 genes conservados se amplificaron utilizando los cebadores descritos Guo *et al.* (2008) mientras que las regiones de la estefimicina, la nibomicina y los 4 CGB putativos de sideróforo se amplificaron por medio de cebadores diseñados en este estudio utilizando el programa OligoEvaluator de Sigma-Aldrich (<http://www.oligoevaluator.com/LoginServlet>). Los cebadores fueron sintetizados por Sigma-Aldrich (Tabla 5).

Tabla 5. Cebadores utilizados para la amplificación por PCR de los genes de interés.

Nombre	Secuencia 5' – 3'	Tm °C	Tamaño esperado	Objetivo
rpoB-F	GAGCGCATGACCACCCAGGACGTCGAGGC	65	994 pb	Gen <i>rpoB</i>
rpoB-R	CCTCGTAGTTGTGACCCTCCCACGGCATGA			
gyrB-F	GAGGTCGTGCTGACCGTGCTGCACGCGGGCG GCAAGTTCGGC	65	1305 pb	Gen <i>gyrB</i>
gyrB-R	GTTGATGTGCTGGCCGTCGACGTCGGCGTCCG CCAT			
trpB-F	GCGCGAGGACCTGAACCACACCGGCTCACACA AGATCAACA	66	822 pb	Gen <i>trpB</i>
trpB-R	TCGATGGCCGGGATGATGCCCTCGGTGCGCGA CAGCAGGC			
recA-F	CCGCRCTCGCACAGATTGAACGSCAATTC	65	913 pb	Gen <i>recA</i>
recA-R	GCSAGGTCGGGTTGTCCTTSAGGAAGTTGCG			
atpD-F	GTGGCGACTTCACCAAGGGCAAGGTGTTCAA CACC	63	998 pb	Gen <i>atpD</i>

atpD-R	GTGAACTGCTTGCGACGTGGGTGTTCTGGGA CAGGAA			
nybF	GACTGTGCTTTTTGCCCTCCGCGTTGCCGATCA C	85.9	1426 pb	Región del gen 1047 al gen 1048 de la Nibomicina
nybR	CGTTGACGTGGCTCATCGGCATGTAGTGCAGG AC	84.5		
SteF	GCATCGCCTACACGCCTGCCCCGAACGACATC	86.8	1691 pb	Región del gen 1788 al gen 1790 de la Estefimicina
SteR	GGTGAACAGGTCCGAAGCGAGGCTGTCGTGAC	83.6		
NRPS 116-F	GACTGGAGTTCACGTTGTCCGATTCGTCAGCA G	80.7	1126 pb	Clúster NRPS 1.16 Gen 5238 al 5239
NRPS 116-F	GTGGGTCAGCCGGGGTGGTCGAGATAGGAG	82.3		
NRPS 32-F	CGCCCGGAGCCCCACATGCCCACTTCTCTTCG	88.5	1182 pb	Clúster NRPS 3.2 Gen 157
NRPS 32-R	GCGCGTGCAGTATCGGGGTGTCCATGATGC	85.0		
NIS22-F	GAGCACCCGATGATCCCCCGCACATTCG	85.7	1423 pb	Clúster NIS 2.2 Gen 46 al 48
NIS22-R	CGCCGACGAACTCCTCGACCGCTTCCAGG	85.3		
NIS18-F	CGATCACGCGGCCATAGAAAATCTGCTGC	80.0	1806 pb	Clúster NIS 1.8 Gen 1302
NIS18-R	CGTCACCGATCCAAACCGCGTCCTCGTACTCG	84.5		

C) Amplificación de los genes de interés por PCR

La amplificación de los genes de interés se realizó a partir del ADN de los fósmidos recombinantes obtenidos de los *pools* que constituyen la biblioteca genómica. Para amplificar cada gen se siguió la mezcla de reacción descrita en la tabla 6 y las condiciones descritas en el anexo 4. Como control de la amplificación se utilizaron 180 ng de ADN genómico de *Embleya* sp. NF3 para cada 50 μ L de reacción. La PCR se realizó en el termociclador Veriti (Applied Biosystems®) con la enzima Invitrogen™ Platinum™ Taq ADN Polymerase (ThermoFisher). El producto de PCR se confirmó cargando 10 μ L de la reacción en gel de agarosa al 0.7% (p/v). La electroforesis se corrió a 90 V por 60 min utilizando TAE 1X. Como marcador de peso molecular se utilizó el marcador de ADN de 1 kb de NEB. El revelado de las bandas se hizo con bromuro de etidio 0.01%.

Tabla 6. Volúmenes de reactivo para la PCR utilizando concentraciones de DMSO al 5% y 10%.

Reactivo	Volumen - Reacción con DMSO al 5%	Volumen - Reacción con DMSO al 10%
Agua estéril	35.2 μ L	32.7 μ L
Buffer de PCR 10X, - Mg	5 μ L	5 μ L
MgCl ₂ [50 mM]	1.5 μ L	1.5 μ L
dNTP mix [10 mM]	1 μ L	1 μ L
DMSO 100%	2.5 μ L	5 μ L
Cebador forward [20 pM/ μ L]	1 μ L	1 μ L
Cebador reverso [20 pM/ μ L]	1 μ L	1 μ L
ADN fósido <i>pool</i> 1 [40 μ g/ μ L]	2.3 μ L	2.3 μ L
Platinum™ Taq ADN Polymerase	0.5 μ L	0.5 μ L
Volumen total de la reacción	50 μL	50 μL

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 Análisis bioinformático

6.1.1 Búsqueda de CGB de sideróforo y selección de la cepa a trabajar

Para determinar cuál de las cuatro actinobacterias disponibles en el laboratorio podría codificar CGB de sideróforos NRPS y/o NIS potencialmente novedosos se analizó el genoma de *Streptomyces* sp. L06, *Embleya* sp. NF3, *Actinoplanes* sp. TFC3 y *S. thermocarboxydus* K155 por medio del programa antiSMASH v. 6.0. AntiSMASH detecta CGB utilizando perfiles de modelos ocultos de Márkov (pHMM) específicos para las enzimas centrales de cada tipo de clúster. Para la detección de clústeres NIS utiliza un pHMM que identifica la enzima *lucA_iucC*. Por otra parte, la detección de clústeres NRPS se realiza a partir de pHMM que identifican el dominio de condensación y los dominios de unión a AMP o de adenilación con oxidasa integrada. Adicionalmente, el programa antiSMASH calcula el porcentaje de similitud del CBG identificado con CGB que codifican MS ya conocidos descritos en el repositorio MIBiG. Este porcentaje se calcula a partir del número de genes del CGB identificado que tienen alineamientos significativos con genes de un CGB conocido, y nos sugiere si el CGB identificado codifica para una molécula ya conocida.

AntiSMASH v. 6.0 detectó 2 CGB putativos de sideróforo de tipo NIS para las cepas K155 y L06, 1 CGB de tipo NIS y 2 CGB de tipo NRPS para la cepa TCF3, y 3 CGB de tipo NIS y 2 CGB de tipo NRPS para la cepa NF3 (Tabla 7). Uno de los clústeres de la cepa K155 y de la cepa L06 tienen más del 80% de similitud con el clúster de la desferroxamina sugiriendo que este compuesto es codificado por las dos cepas. Por otra parte, la cepa TFC3 codifica un clúster que tiene un porcentaje de similitud del 70% con el clúster de la albachelina sugiriendo la producción de este sideróforo. Finalmente, los cinco clústeres codificados por la cepa NF3 (3 CGB de tipo NIS y 2 CGB de tipo NRPS) tienen porcentajes de similitud relativamente bajos con clústeres caracterizados experimentalmente sugiriendo que esta cepa produce sideróforos potencialmente novedosos (Tabla 7).

Considerando estos resultados, se seleccionó a la cepa NF3 como nuestra cepa de estudio debido a que contiene el mayor número de CGB que pudieran codificar para sideróforos potencialmente novedosos. Por tanto, en este estudio se caracterizaron *in silico* los cinco clústeres putativos de sideróforos codificados en el genoma de la cepa NF3 para sugerir su función y se determinó la producción de sideróforos en condiciones de laboratorio.






Tabla 7. Clústeres de genes biosintéticos para la síntesis de sideróforos vía NIS y vía NRPS identificados en el genoma de las 4 actinobacterias estudiadas por medio del programa antiSMASH v 6.0. El porcentaje de similitud entre los clústeres codificados por cada cepa con clústeres descritos en la literatura se encuentra dentro de los recuadros verdes

Tipo de CGB	Clúster similar	<i>S. thermocarboxydus</i> K155	<i>Streptomyces</i> sp. L06	<i>Actinoplanes</i> sp. TFC3	<i>Embleya</i> sp. NF3
Clúster NIS	Desferroxamina B	Clúster 1 83% similitud	Clúster 1 80% similitud		Clúster 1 27% similitud
			Clúster 2 27% similitud		
	Vibrioferrina	Clúster 2 26% similitud		Clúster 1 35% similitud	Clúster 2 33% similitud
	Ocrobactina				Clúster 3 16% similitud
Clúster NRPS	Albachelina			Clúster 2 70% similitud	
	Ficelomicina			Clúster 3 27% similitud	
	Estreptobactina				Clúster 4 41% similitud
	Salinichelina				Clúster 5 30% similitud

6.1.2 Análisis *in silico* de los CGB de sideróforo codificados por *Embleya* sp. NF3

AntiSMASH v 6.0 identificó los 5 CGB putativos de sideróforo (3 CGB de tipo NIS y 2 CGB de tipo NRPS) en 3 de los 8 contigs en los que se encuentra ensamblado el genoma de la cepa NF3 con las características descritas en la tabla 8.

Tabla 8. Características reportadas por el programa antiSMASH v.6.0 para los cinco CGB de sideróforo identificados en el genoma de *Embleya* sp. NF3. Genes biosintéticos mínimos en color rojo, genes biosintéticos adicionales en color rosado, genes no relacionados con el clúster en color gris, genes reguladores en color verde y genes para transporte en color gris.

Tipo de clúster	Organización del clúster y posición en el genoma	Clúster similar/ % similitud	Genes mínimos	Genes adicionales	Genes no relacionados	Genes reguladores	Genes para transporte
NIS	Contig 1 – Clúster 1.8 	Ocrobactina 16%	1	0	8	0	1
	Contig 1 – Clúster 1.9 	Desferroxamina 27%	2	5	2	0	0
	Contig 2 – Clúster 2.2 	Vibrioferina 33%	2	2	7	0	1
NRPS	Contig 1 – Clúster 1.16 	Streptobactina 41%	1	4	2	1	2
	Contig 3 – Clúster 3.2 	Salinichelina 30%	3	7	8	1	5

Debido a que el programa antiSMASH identifica CGB a partir de las enzimas centrales y genera los límites del clúster utilizando un enfoque inclusivo en el que se predice en exceso los genes que lo componen, es necesario realizar análisis *in silico* adicionales para sugerir cuales genes podrían participar en la biosíntesis de sideróforos y si los CGB identificados podría codificar compuestos conocidos o una variante potencialmente nueva de una molécula conocida. Por tanto, como una aproximación para caracterizar y sugerir la función de los 5 CGB identificados, se determinó la función sugerida de los genes de cada clúster, los porcentajes de identidad y cobertura con genes de clústeres caracterizados, y se realizaron alineamientos múltiples de secuencias de aminoácidos para identificar el sitio catalítico de las enzimas centrales. Adicionalmente, se determinó si el sistema de regulación de los 5 CGB concuerda con lo descrito en la literatura. Los resultados de estos análisis se presentan en dos secciones, la primera sección se dedicada al análisis de los 3 clústeres de tipo NIS y la segunda sección al análisis de los 2 clústeres de tipo NRPS.

6.1.2.1 Análisis *in silico* de clústeres NIS

A) Función sugerida de los genes que conforman los clústeres NIS

Con el fin del establecer los genes que podrían participar en la biosíntesis de los 3 clústeres NIS se determinó la función sugerida de todos los genes identificados por el programa antiSMASH en estos clústeres. La función se sugirió a partir del análisis de la secuencia de aminoácidos de los genes de interés en UniProt, InterPro y la base de datos no redundante del NCBI. En la tabla 9 se enlista la o las funciones sugeridas por las 3 bases de datos utilizadas.

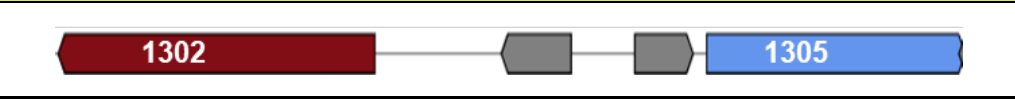


Tabla 9. Función sugerida de los genes que conforman los tres clústeres NIS codificados en el genoma de *Embleya* sp. NF3.

Clúster NIS	Posición del gen	Función putativa
1.8	1298	Metiltransferasa
	1299	Regulador transcripcional de la antitoxina AbiEi

	1300	Hidrolasa
	1301	Desconocida
	1302	Sintetasa de sideróforo
	1303	Desconocida
	1304	Proteína de unión a ATP
	1305	Transportador de la superfamilia de facilitadores mayores (MFS) – Transportador de resistencia a fármacos
	1306	Desconocida
	1307	Desconocida
1.9	1423	Helicasa de ADN dependiente de ATP
	1424	Hidrolasa
	1425	Nitrilasa
	1426	Sintetasa de sideróforo
	1427	L-lisina 6-monooxigenasa
	1428	N-Acetiltransferasa de la familia GNAT
	1429	Sintetasa de sideróforo
	1430	Aminoácido descarboxilasa / aspartato aminotransferasa
	1431	4-aminobutirato aminotransferasa (GAbT) / Acetil ornitina aminotransferasa
2.2	44	Desconocida
	45	Proteína de unión al periplasma de un sistema de transporte ABC
	46	Metiltransferasa
	47	Descarboxilasa dependiente de piridoxal / Ornitina descarboxilasa
	48	Sintetasa de sideróforo
	49	Sintetasa de sideróforo
	50	Proteína con dominio ATP-grasp
	51	Proteína de interacción a sideróforo / Reductasa férrica
	52	Desconocida
	53	Desconocida
	54	Deshidrogenasa
	55	Proteína ATPasa

Recordando que en la literatura se ha reportado que para la biosíntesis de sideróforos de tipo NIS: 1) se requiere como mínimo una enzima sintetasa de sideróforo, 2) no se ha determinado el número mínimo de genes biosintéticos adicionales requeridos, pero en los clústeres conocidos se han identificado genes que codifican para monooxigenasas, descarboxilasas, acil coenzima A transferasas, aminotransferasas, acetiltransferasas, dioxigenasas y ligasas de aminoácido dependientes de ATP, y 3) los clústeres pueden tener genes reguladores o de transporte, se señalan en la tabla 10 los genes que podrían participar en la biosíntesis y transporte de sideróforos en los 3 clústeres NIS identificados. A partir de ahora sólo se tendrán en cuenta estos genes para los análisis *in silico*.

Tabla 10. Composición de los tres clústeres NIS codificados en el genoma de *Embleya* sp. NF3 teniendo en cuenta la función sugerida de los genes y los reportes de la literatura. Los genes que podrían participar en la biosíntesis y transporte de sideróforos se encuentran marcados con números que indican su posición en el genoma.

Clúster NIS	Organización del clúster
1.8	
1.9	
2.2	

B) Identidad y cobertura de los clústeres NIS con clústeres descritos en MIBiG

Para sugerir si los clústeres NIS pudieran sintetizar sideróforos conocidos o una variante potencialmente nueva de un sideróforo conocido, se determinaron los porcentajes de identidad y cobertura de los genes que conforman los 3 clústeres NIS a partir de un BLAST de la secuencia de aminoácidos de estos genes contra las secuencias de clústeres de sideróforos conocidos disponibles en repositorio MIBiG. Así mismo, se determinó manualmente si la composición de los 3 clústeres NIS es semejante a la de clústeres conocidos.

Para el clúster 1.8 se identificó que la enzima sintetasa de sideróforo (gen 1302) tiene porcentajes de identidad menores del 46% con sus ortólogos codificados en los clústeres de los sideróforos petrobactina, ocrbactina, acinetoferrina y ficelomicina. En cuanto al gen que codifica para el transportador MFS (gen 1305), se observó un alto porcentaje de identidad con su ortólogo *griC* del clúster de la estreptobactina/griseobactina. Se ha reportado que el gen *griC* puede participar en la exportación de la estreptobactina/griseobactina del citoplasma al medio (Patzner & Braun, 2010). La composición de este clúster no es semejante a la de clústeres conocidos (Tabla 11).

Por otra parte, los genes 1426 al 1430 del clúster 1.9 tienen porcentajes de identidad menores al 56% con sus ortólogos de clústeres de sideróforos conocidos (Tabla 11). Es relevante destacar que la composición del clúster 1.9 es semejante a la de los clústeres para la síntesis de los sideróforos aerobactina, ocrbactina, petrobactina, xantoferrina, acinetoferrina, putrebactina, bisucaberina y desferroxamina; sin embargo, este clúster contiene un gen que codifica para una aminotransferasa (gen 1431) que no se ha reportado en ninguno de los clústeres mencionados previamente. Esto sugiere que el clúster 1.9 codifica un sideróforo con una estructura básica similar a la de alguno de los sideróforos mencionados, pero con una modificación novedosa que podría impactar mejorando o ampliando sus aplicaciones.

Finalmente, el clúster 2.2 tiene conservado los 4 genes biosintéticos (gen 47 al 50) requeridos para la síntesis de la vibrioferrina y la xantoferrina con porcentajes de identidad menor al 60% (Tabla 11). Sin embargo, no conserva los genes de transporte descritos en estos clústeres. Este resultado sugiere que el clúster 2.2 podría codificar un sideróforo novedoso con estructura básica similar a los sideróforos vibrioferrina y xantoferrina.

Tabla 11. Porcentaje de identidad y cobertura de los genes que conforman los tres clústeres NIS codificados en el genoma de *Embleya* sp. NF3 con clústeres de sideróforos conocidos.

Clúster NIS	Posición del gen	Porcentaje de identidad	Cobertura	Clúster de sideróforo
1.8	1302	32 – 46%	> 85%	Petrobactina, ocrobactina, acinetoferrina y ficelomicina
	1305	78%	77%	Estreptobactina/griseobactina
1.9	1426	35 – 40%	> 94%	Aerobactina, ocrobactina, acinetoferrina, desferroxamina, bisucaberina y putrebactina
	1427	34 – 56%	> 84%	Desferroxamina, acinetobactina, bisucaberina, acinetoferrina, putrebactina y albachelina
	1428	34 – 36%	> 70%	Aerobactina
	1429	33 – 34%	> 76%	Petrobactina, ocrobactina y acinetoferrina
	1430	38 – 43%	> 77%	Desferroxamina y putrebactina
	1431	-	-	-
2.2	45	-	-	-
	47	40 – 60%	> 95%	Xantoferrina, vibrioferrina y estafilobactina
	48	31 – 37%	> 80%	Xantoferrina, vibrioferrina y ficelomicina
	49	36 – 39%	> 76%	Xantoferrina y vibrioferrina
	50	35 – 42%	> 96%	Xantoferrina y vibrioferrina
	51	36 - 44%	> 97%	Desferroxamina y pioverdina

En resumen, se identificó que la mayoría de los genes biosintéticos que conforman los 3 clústeres identificados tienen ortólogos en clúster NIS conocidos con porcentajes de identidad entre el 30% - 60% y porcentajes de cobertura mayores al 70% (Tabla 11). Estos resultados sugieren que, a pesar de que los porcentajes de identidad y cobertura son relativamente altos, los clústeres 1.9 y 2.2 podrían codificar para sideróforos con estructura química potencialmente novedosa con modificaciones no descritas a cargo de las enzimas biosintéticas adicionales.

C) Alineamiento de las enzimas biosintéticas mínimas de los clústeres NIS

Teniendo en cuenta que los clústeres NIS podrían sintetizar sideróforos novedosos, se decidió analizar si los genes que codifican para las sintetasas de sideróforo

(enzima central o enzima biosintética mínima) conservan los aminoácidos del sitio catalítico reportados en la literatura, con el fin de sugerir si tendrán la función esperada. Para esto se realizó un alineamiento múltiple utilizando las secuencias de aminoácidos de las 5 sintetetas de sideróforo de los 3 clústeres NIS con las secuencias de aminoácidos de las sintetetas de sideróforo lucC e lucA de *Klebsiella pneumoniae* (biosíntesis de la aerobactina), DesD de *Streptomyces coelicolor* (biosíntesis de la desferroxamina) y DfoC de *Erwinia amylovora* (biosíntesis de la desferroxamina) reportadas en la literatura (Bailey *et al.*, 2018; Salomone-Stagni *et al.*, 2018; Hoffmann *et al.*, 2020). A partir de los alineamientos se identificaron en las 5 secuencias de sintetetas de sideróforo de *Embleya* sp. NF3 los aminoácidos del sitio catalítico conservados en las 4 sintetetas reportadas en la literatura.

En la figura 9 se presenta el alineamiento múltiple de secuencias de aminoácidos de las 5 sintetetas de sideróforo de la cepa NF3 y las 4 sintetetas de sideróforo reportadas en la literatura. Se encontró que los genes 1426 (clúster 1.9), 1429 (clúster 1.9) y 48 (clúster 2.2) conservan los 9 aminoácidos del sitio catalítico de las 4 enzimas reportadas en la literatura, sugiriendo que podrían codificar sintetetas de sideróforo funcionales. Por otra parte, el gen 1302 (clúster 1.8) tiene un reemplazo no conservativo en la posición 503 (D503G) y el gen 49 (clúster 2.2) no tiene la arginina conservada en la posición 352 en el gen lucC, por lo cual se deberá confirmar experimentalmente si estos dos genes codifican para enzimas funcionales.

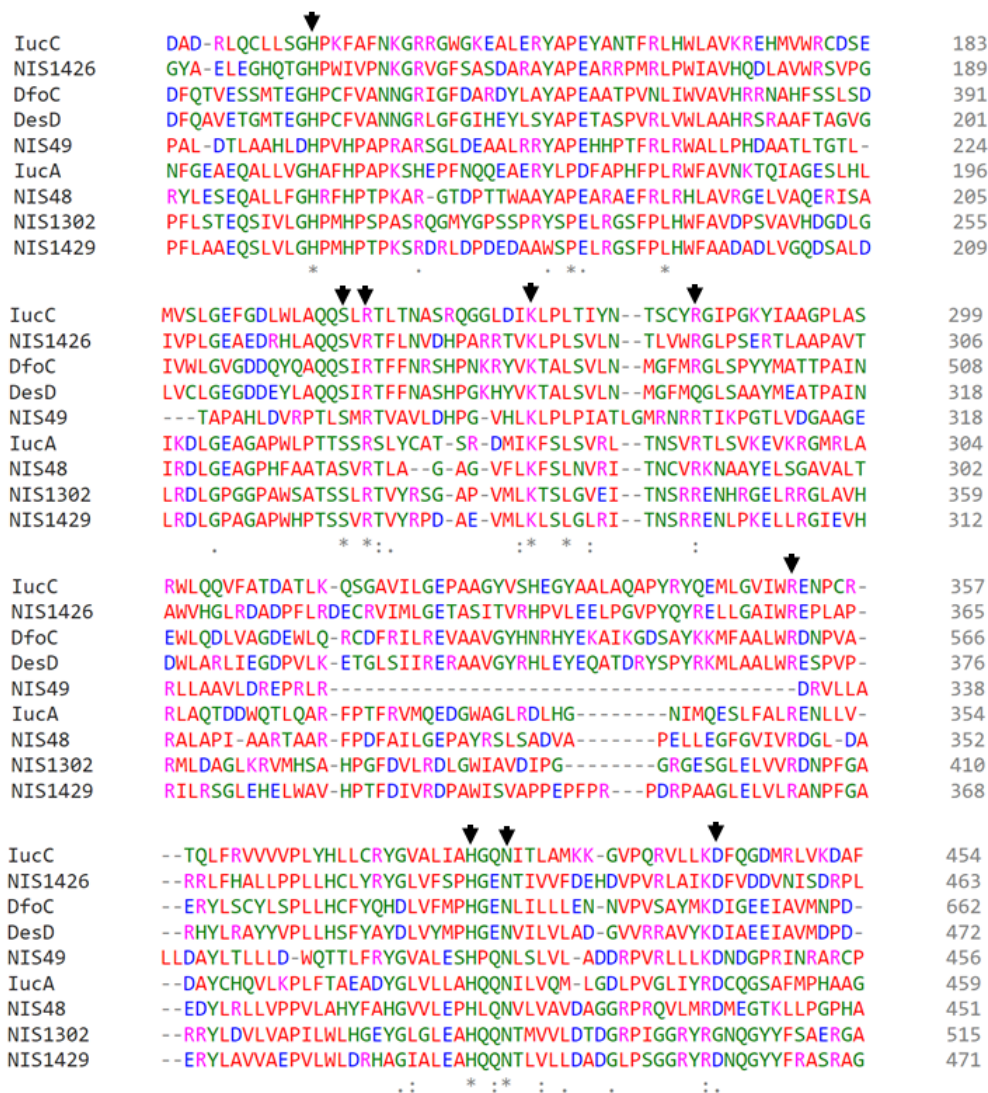


Figura 9. Alineamiento múltiple de secuencias de aminoácidos de sintetisas de sideróforo realizado con Clustal omega. Las flechas negras señalan los 9 aminoácidos conservados del sitio catalítico reportados en la literatura. IucC, sintetasa de sideróforo IucC de *Klebsiella pneumoniae*; NIS1426, gen 1426 del clúster 1.9 de *Embleya* sp. NF3; DfoC, sintetasa de sideróforo *Erwinia amylovora*; DesD, sintetasa de sideróforo de *Streptomyces coelicolor*; NIS49, gen 49 del clúster 2.2 de *Embleya* sp. NF3; IucA, sintetasa de sideróforo IucA de *Klebsiella pneumoniae*; NIS48, gen 48 del clúster 2.2 de *Embleya* sp. NF3; NIS1302, gen 1302 del clúster 1.8 de *Embleya* sp. NF3; NIS1429, gen 1429 del clúster 1.9 de *Embleya* sp. NF3.

D) Análisis de la regulación de la expresión de los clústeres NIS

Como una estrategia para determinar si los 3 clústeres NIS conservan alguno de los sistemas de regulación de la expresión de sideróforos descritos en la literatura, se buscó en el genoma de *Embleya* sp. NF3 la presencia de las proteínas reguladoras FUR y DtxR/IdeR por medio del programa PATRIC v. 3.6.12. Este análisis evidenció

que la cepa NF3 codifica para ambas proteínas reguladoras sugiriendo que los dos sistemas de regulación son funcionales. No obstante, con el fin de sugerir cuál de los sistemas controla la regulación de los 3 clústeres NIS se realizó una búsqueda de secuencias operadoras a las que se pueden unir estos reguladores en una región de 500 pb corriente arriba del inicio de los 3 clústeres.

A partir de las secuencias operadoras identificadas en la literatura, se obtuvo un pHMM de la secuencia operadora consenso a la que se puede unir el regulador DtxR/IdeR, como se menciona en la metodología. La secuencia obtenida en este trabajo concuerda con las secuencias operadoras consenso reportadas por otros autores y cumple con las características descritas en la literatura que son ser un palíndromo de 9 pb interrumpido por una guanina o citosina (Lee & Holmes, 2000) (Tabla 12).

Tabla 12. Secuencias consenso de la secuencia operadora a las que se une el regulador DtxR/IdeR. La secuencia palindrómica se encuentra subrayada. La guanina o citosina que interrumpe el palíndromo se encuentra en rojo

Secuencia consenso	Tamaño (pb)	Fuente
TTAGGTTAGCCTAACCTAA	19	Lee & Holmes, 2000
TNANGNNAGGCTNNCCT__	17	Cruz-Morales <i>et al.</i> , 2017
<u>TTAGGTTAG</u> G <u>CCTAACCTAA</u>	19	Este trabajo

Utilizando la secuencia operadora consenso a la que se puede unir el regulador DtxR/IdeR obtenida en este estudio (Tabla 12), se identificó una secuencia operadora putativa corriente arriba del clúster 1.9 y del clúster 2.2 con las características descritas en la tabla 13. Por el contrario, en el gen 1.8 no se identificaron secuencias operadoras para la unión del regulador DtxR/IdeR.

Tabla 13. Secuencias operadoras putativas para la unión del regulador DtxR/IdeR identificadas en los clústeres NIS. La secuencia palindrómica se encuentra subrayada. La guanina o citosina que interrumpe el palíndromo se encuentra en rojo.

Clúster NIS	Gen / Distancia del ATG	Genes putativos bajo su control	Secuencia	Valor E
1.8	-	-	-	-
1.9	Gen 1431 -32 pb	1426 al 1431	TTAGGTAAG <u>GCTTACCTTT</u>	0.00095
2.2	Gen 50 -229 pb	47 al 50	CTCGGTTAG <u>GCTAACCTAA</u>	0.00055

La búsqueda de secuencias operadoras a las que se pueda unir la proteína FUR se realizó utilizando un pHMM construido en este estudio, como se describe en la metodología. La secuencia del pHMM es similar a la reportada por otros autores y cumple con las características descritas en la literatura que son ser un palíndromo de 9 pb interrumpido por una adenina (Tabla 14).

Tabla 14. Secuencias consenso de la región operadora a las que se une el regulador FUR. La secuencia palindrómica se encuentra subrayada. La adenina que interrumpe el palíndromo se encuentra en rojo

Secuencia consenso	Tamaño (pb)	Fuente
__TGATAATNATTATCA__	17	Fuangthong & Helmann, 2003
GATAATGATAATCATTATC	19	Baichoo & Helmann, 2002
<u>ATTGAGAATAGTTCTCAAT</u>	19	Este trabajo

Utilizando el pHMM construido en este trabajo (Tabla 14) no se identificaron secuencias operadoras putativas a las que se pudiera unir el regulador FUR corriente arriba de ninguno de los 3 clústeres NIS.

En resumen, considerando los análisis realizados y los reportes en la literatura, sugerimos que los clústeres 1.9 y 2.2 codificarán sideróforos potencialmente novedosos debido a que: 1) la composición de los clústeres es semejante pero no idéntica a la de clústeres de sideróforos conocidos, 2) a pesar de que los

porcentajes de identidad de los genes que conforman los clústeres de la cepa NF3 con genes de clústeres de sideróforos conocidos son relativamente altos, las enzimas biosintéticas adicionales podrían realizar modificaciones no descritas a la estructura básica del sideróforo produciendo así compuestos novedosos, y 3) los alineamientos múltiples sugieren que las enzimas centrales de estos dos clústeres serán funcionales ya que conservan los aminoácidos del sitio catalítico reportados en la literatura. Por el contrario, se sugiere que el clúster 1.8 no será funcional debido a que el único gen que lo compone es una sintetasa de sideróforo que presenta un reemplazo no conservativo en su sitio catalítico. En cuanto al análisis de regulación, sugerimos que los clústeres 1.9 y 2.2 pueden estar regulados por la proteína DtxR/IdeR ya que contienen secuencias operadoras a la que se puede unir esta proteína; sin embargo, se debe confirmar experimentalmente esta hipótesis. Por otra parte, el clúster 1.8 podría estar regulado por proteínas no estudiadas en este trabajo. En la tabla 15 se enlistan las características de los 3 clústeres NIS determinadas a partir de los análisis *in silico* y la búsqueda bibliográfica realizada.

Tabla 15. Características de los tres clústeres NIS identificadas por los análisis *in silico*. Los genes biosintéticos agrupan los genes biosintéticos mínimos y los genes biosintéticos adicionales.

Clúster NIS	Genes biosintéticos	Sistema de transporte completo / tipo de transportador	Secuencia operadora / proteína reguladora	Clúster funcional
1.8	1	Si MFS	No	No
1.9	6	No	Si DtxR/IdeR	Si
2.2	4	No	Si DtxR/IdeR	Si

6.1.2.2 Análisis *in silico* de clústeres NRPS

A) Función sugerida de los genes de los clústeres NRPS

En la tabla 16 se enlistan las funciones sugeridas de los genes que conforman los dos clústeres de tipo NRPS identificados por el programa antiSMASH v. 6.0.

Tabla 16. Función sugerida de los genes que conforman los dos clústeres NRPS codificados en el genoma de *Embleya* sp. NF3.

Clúster NRPS	Posición del gen	Función putativa
1.16	5234	Regulador transcripcional de la familia TetR
	5235	Desconocida
	5236	Reductasa de hidroperóxido de alquilo / específica de tiol
	5237	Serina peptidasa
	5238	Proteína de unión al periplasma de un sistema de transporte ABC
	5239	Enterobactina esterasa férrica
	5240	Transportador de la superfamilia de facilitadores mayores / Transportador de resistencia a fármacos
	5241	Proteína con dominio MbtH
	5242	Sintetasa de péptido no ribosomal: dominio de condensación, dominio de adenilación, dominio de proteína transportadora de péptido y dominio esterasa.
	5243	Aminohidrolasa
	5244	Proteína con dominio de laminina G
	5245	Desconocida
	5246	Desconocida
	5247	Sistema accesorio Sec / Translocasa SecA2
	5248	Factor sigma de la RNA polimerasa
5249	Permeasa / Transportador tipo ABC	
3.2	151	Gamma-glutamyltranspeptidasa
	152	Isomerasa de la familia PhzF
	153	Oxidoreductasa
	154	Desconocida
	155	Gioxalasa / Dioxigenasa
	156	Metiltransferasa
	157	Amidotransferasa
	158	Sintetasa de péptido no ribosomal: dominio de condensación, dominio de adenilación y dominio de proteína transportadora de péptido



	159	Sintetasa de péptido no ribosomal: dominio de condensación, dominio de adenilación, dominio de proteína transportadora de péptido y dominio esterasa
	160	Asparagina sintasa
	161	Sintetasa de péptido no ribosomal: dominio de adenilación y dominio de proteína transportadora de péptido
	162	Proteína con dominio de condensación
	163	Racemasa de aminoácidos
	164	Acyl-CoA deshidrogenasa
	165	Desconocida
	166	Proteína de unión a ATP / Transportador de tipo ABC de sideróforo
	167	Permeasa / Transportador tipo ABC de sideróforo
	168	Permeasa / Transportador tipo ABC de sideróforo
	169	Proteína de interacción con sideróforo / Reductasa férrica
	170	Proteína periplásmica / Transportador tipo ABC de sideróforo
	171	Proteína relacionada con transportador de tipo ABC
	172	Proteína relacionada con transportador de tipo ABC
	173	Regulador transcripcional de la familia AraC
	174	Hidrolasa alfa/beta
	175	Proteína con dominio hélice-giro-hélice
	176	N-acetiltransferasa
	177	Desconocido
	178	Proteína con dominio de unión al ADN

En la literatura se ha reportado que la unidad mínima para la biosíntesis de sideróforos dependientes de NRPS es una o varias enzimas NRPS, que cuentan con un módulo de iniciación y/o un módulo de extensión y un módulo de finalización. El módulo de iniciación está conformado por un dominio de adenilación (A) y un dominio de proteína transportadora de péptido (PCP), mientras que el módulo de extensión está conformado por un dominio A, un dominio PCP y un dominio de condensación (C). Por otra parte, el módulo final contiene los dominios A, PCP, C y un dominio tioesterasa (TE) o reductasa (R). En algunos casos se ha reportado la presencia de dominios epimerasa (E) y metiltransferasa (MT) en los módulos de

extensión (Kadi & Challis, 2009). En cuanto a los genes biosintéticos adicionales, no se ha reportado un número mínimo, pero los clústeres de sideróforos NRPS caracterizados contienen genes que codifican para una proteína con dominio Mbth y/o para las enzimas isocorismatasa, ligasa, deshidrogenasa, amidohidrolasa, esterasa o reductasa. Adicionalmente, estos clústeres pueden o no contener genes que codifican para transportados de tipo ABC.

Teniendo en cuenta las características descritas en la literatura y las funciones sugeridas de los genes que conforman los dos clústeres NRPS, se proponen los genes que podrían estar participando en la biosíntesis y transporte de este tipo de sideróforos (Tabla 17). A partir de ahora sólo se tendrán en cuenta estos genes para los análisis *in silico*.

Tabla 17. Esquema de la organización de los dos clústeres NRPS codificados en el genoma de *Embleya* sp. NF3. Los genes que según la literatura pueden participar en la biosíntesis y transporte de sideróforos se encuentran marcados con números que indican su posición en el genoma.

Clúster NRPS	Organización del clúster
1.16	
3.2	

B) Identidad y cobertura de los clústeres NRPS con clústeres descritos en MIBiG

Utilizando la función de comparación con la base de datos del repositorio MIBiG disponible en el programa antiSMASH v. 6.0, se determinó el porcentaje de identidad y cobertura de los genes que componen los clústeres NRPS con sus ortólogos en los clústeres de sideróforos disponibles en la base de datos del MIBiG (Tabla 18). Así mismo, se determinó manualmente si la composición de los 2 clústeres NRPS es semejante a la de clústeres conocidos.

Los 7 genes que conforman el clúster 1.16 tienen altos porcentajes de identidad con sus ortólogos presentes en el clúster de la estreptobactina/griseobactina sugiriendo que podrían participar en la biosíntesis y transporte de este sideróforo (Tabla 18). No obstante, al clúster 1.16 le faltan 6 genes para ser idéntico en composición al clúster de la estreptobactina/griseobactina según lo reportado en la literatura (Patzner & Braun, 2010).

Con respecto al clúster 3.2, solo 8 de los 12 genes que lo componen tienen ortólogos en clústeres de sideróforos conocidos con porcentajes de identidad menores al 68% (Tabla 18). Aunque la composición de este clúster es semejante a la de los clústeres de los sideróforos salinichelina y quinichelina, codifica para enzimas biosintéticas adicionales no descritas en sideróforos conocidos. Esto sugiere que el clúster 3.2 podría codificar para un sideróforo con una estructura básica similar a la salinichelina o quinichelina, pero con modificaciones novedosas.

Tabla 18. Porcentaje de identidad y cobertura de los genes que conforman los dos clústeres NRPS codificados en el genoma de *Embleya* sp. NF3 con clústeres de sideróforos conocidos.

Clúster NRPS	Posición del gen	Porcentaje de identidad	Porcentaje de cobertura	Clúster de sideróforo similar
1.16	5238	72%	98%	Estreptobactina
	5239	64%	97.5%	Estreptobactina
	5240	76%	80%	Estreptobactina
	5241	56 – 69%	>82%	Estreptobactina, albachelina, coelichelina, gobichelina, escabichelina y micobactina
	5242	48 – 65%	>99.6%	Estreptobactina, paenibactina y bacilibactina
	5243	79%	94.8%	Estreptobactina
	5249	61%	100%	Estreptobactina
3.2	157	38%	96.5%	Ficelomicina
	158	45 - 46%	>98%	Paenibactina y bacilibactina
	159	45 - 47%	103%	Paenibactina y bacilibactina
	160	-	-	-

161	32 -36%	>90%	Estreptobactina, gobichelina y paenibactina
162	-	-	-
164	-	-	-
166	33 – 68%	>80%	Salinichelina, escabichelina, gobichelina, coelichelina, estreptobactina, putrebactina, vibrioferrina, ficelomicina, ornibactina, aerobactina y acinetobactina
167	31 – 51%	>80%	Salinichelina, quinichelina, albachelina, amichelina, gobichelina, coelichelina, escabichelina y ornibactina
168	31 – 53%	>80%	Quinichelina, albachelina, gobichelina, coelichelina, escabichelina y estreptobactina.
169	39%	82%	Heterobactina
170	-		-

C) Alineamiento de las enzimas biosintéticas mínimas de los clústeres NRPS

Se realizó un alineamiento múltiple entre las secuencias de aminoácidos de los genes que codifican para las enzimas NRPS de los clústeres 1.16 (gen 5242) y 3.2 (genes 158, 159 y 161), y las secuencias de genes que codifican para enzimas NRPS reportados en la literatura, con el fin de identificar los aminoácidos del sitio catalítico y sugerir la funcionalidad de los genes codificados por la cepa NF3. Debido a que los reportes en la literatura sobre enzimas NRPS analizan por separado cada uno de los dominios que conforman la enzima, se decidió analizar los dominios de los 4 genes de la cepa NF3 por separado.

El análisis del dominio de condensación (C) se realizó utilizando el dominio C de la proteína VibH de *Vibrio cholerae* reportada en la literatura (Keating et al., 2002). Se identificó la presencia de un dominio C en los genes 5242, 158 y 159 (Figura 10). Teniendo en cuenta los aminoácidos del sitio catalítico reportados para el dominio C de la proteína VibH, se sugiere que los 3 genes de la cepa NF3 tienen un dominio C funcional.

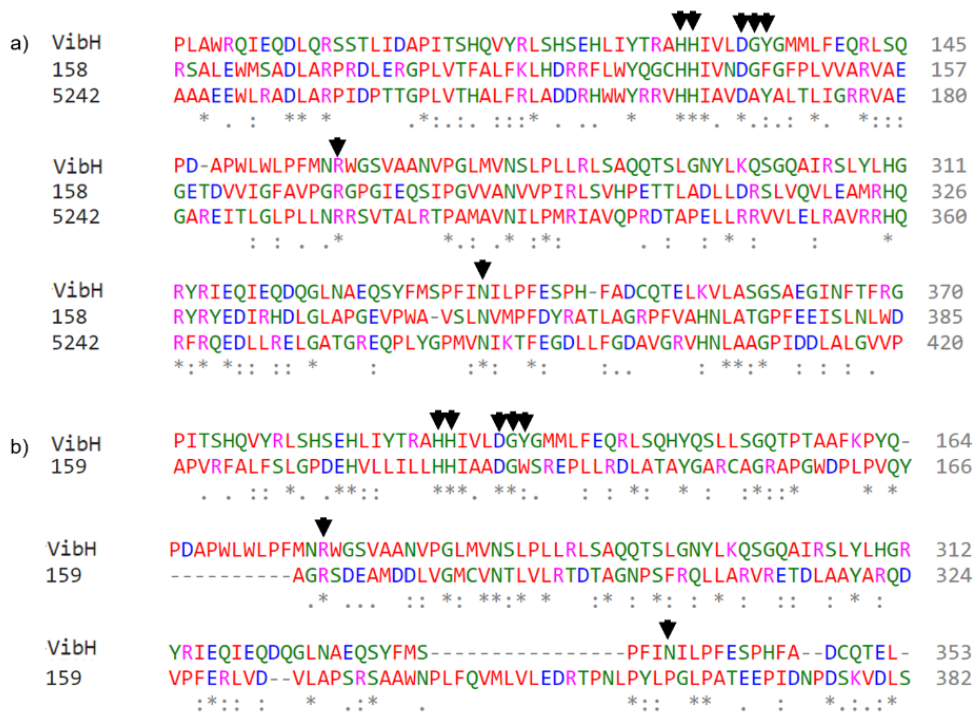


Figura 10. Alineamiento múltiple de secuencias de aminoácidos del dominio de condensación (C) de enzimas NRPS realizado con Clustal omega. Las flechas negras señalan los aminoácidos conservados del sitio catalítico reportados en la literatura para la proteína VibH de *Vibrio cholerae*. a) Alineamiento de la proteína VibH, el gen 158 del clúster 3.2 de *Embleya* sp. NF3 y el gen 5242 del clúster 1.16 de *Embleya* sp. NF3. b) Alineamiento de la proteína VibH y el gen 159 del clúster 3.2 de *Embleya* sp. NF3.

Para el análisis del dominio de adenilación (A) se usaron los dominios A de las proteínas DhbE de *Bacillus subtilis* y DhbF de *Geobacillus* sp. Y4.1MC1 reportadas en la literatura (May *et al.*, 2002; Tarry *et al.*, 2017). Se identificó un dominio A en los 4 genes de NRPS analizados (gen 5242, 158, 159 y 161), los cuales sugieren ser funcionales ya que conservan los aminoácidos del sitio catalítico reportados para DhbE y DhbF (Figura 11).

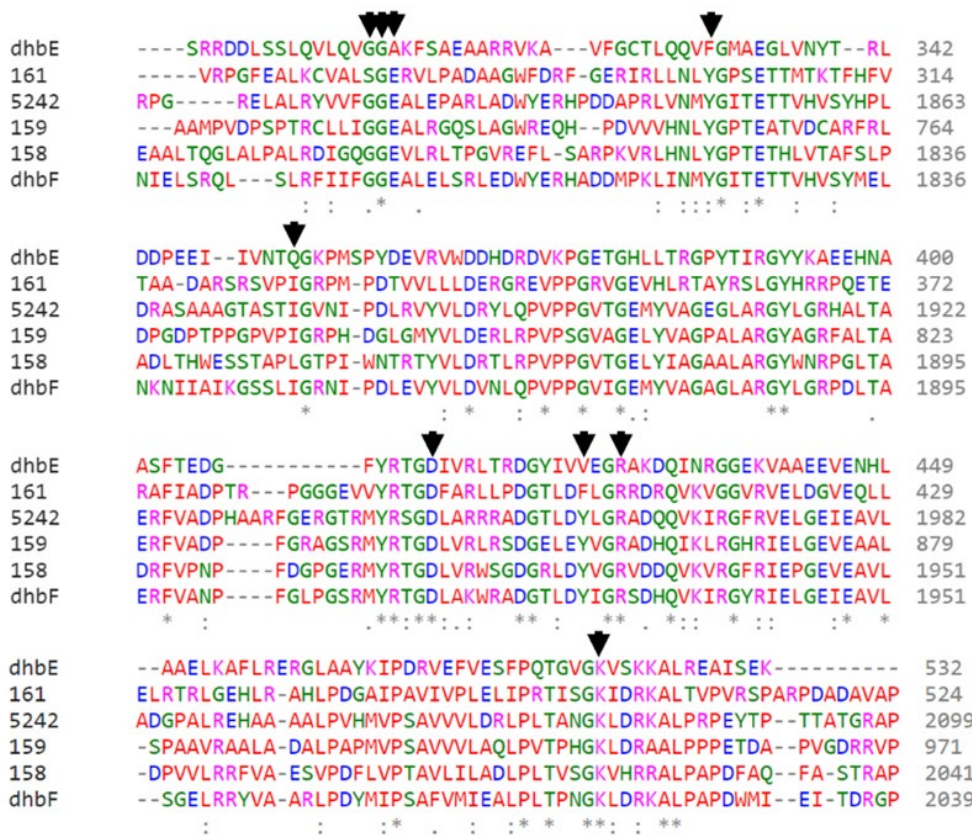


Figura 11. Alineamiento múltiple de secuencias de aminoácidos del dominio de adenilación (A) de enzimas NRPS realizado con Clustal omega. Las flechas negras señalan los aminoácidos conservados del sitio catalítico reportados en la literatura para la proteína DhbE de *Bacillus subtilis*. 161, gen 161 del clúster 3.2 de *Embleya* sp. NF3; 5242, Gen 5242 del clúster 1.16 de *Embleya* sp. NF3; 159, gen 159 del clúster 3.2 de *Embleya* sp. NF3; 158, gen 158 del clúster 3.2 de *Embleya* sp. NF3.

Por otra parte, se identificó un dominio de proteína transportadora de péptido (PCP) en los 4 genes de la cepa NF3 (gen 5242, 158, 159 y 161). El aminoácido serina reportado en el sitio catalítico del dominio PCP de la proteína Bml1 de *Streptomyces verticillus* y de la proteína EntB de *Escherichia coli* (Lohman *et al.*, 2014; Drake *et al.*, 2006) se encuentra conservado, sugiriendo que este dominio será funcional en los 4 genes analizados (Figura 12).

```

          ▼
EntB      E---SDEPFDDNLI DYGLDSVRMMALAARWRKVHG-DIDFVMLAKNPTIDAWKLLSRE 283
161      RTLPAPVDDVTRTFDFVG-TSLAVISVLARLTEEFVGSVPLADFLANQTI EGLSNLVERL 596
BlmI     ETLGRDSVGPHEdFAALGGNSIHAIKITNRVEELVDAELSIRVLL ETRTVAGMTDhVhAT 83
159     EVIGVDTVGIDDGFFELGGHSLMPRLLTRAREALGLELTLKQLFVRPTVAQLLRDQPAT 1044
158     DVLRLERVGPDDSFDFGGHSLLATRLTSRIRTVLGI DVEVGAVFEAPTAAALAAIKGT 2114
5242    EVLGVPRVGVDDNFFDLGGHSLLA VRLAGRIKAALGVDIGIGTVFQAPT AAGLDAALEAT 2172
          : * * : : * . . : . . *

```

Figura 12. Alineamiento múltiple de secuencias de aminoácidos del dominio de proteína transportadora de péptido (PCP) de enzimas NRPS realizado con Clustal omega. Las flechas negras señalan el aminoácido conservado del sitio catalítico reportado en la literatura para la proteína BlmI de *Streptomyces verticillus* y EntB de *Escherichia coli*. 161, gen 161 del clúster 3.2 de *Embleya* sp. NF3; 159, gen 159 del clúster 3.2 de *Embleya* sp. NF3; 158, gen 158 del clúster 3.2 de *Embleya* sp. NF3; 5242, Gen 5242 del clúster 1.16 de *Embleya* sp. NF3.

Adicionalmente, se identificó un dominio tioesterasa (TE) en los genes 159 y 5242 de la cepa NF3 a partir del dominio TE de la proteína EntF de *Escherichia coli* (Miller *et al.*, 2016). Los dos dominios identificados conservan los 3 aminoácidos del sitio catalítico reportados para la proteína EntF, lo que nos permite proponer que ambos genes contienen dominios TE funcionales (Figura 13).

```

          ▼          ▼
EntF      TAANLDEVCEAHLATLLEQQPHGPHYLLGYSLGGT LAQGI AARLRARGEQVAF LGLLDTW 1167
159      LAGSFPELVEDYCARIVDIQPNGPYLLAGWSFGGAAAHAVAVRLRASGHAVALLA AIDAW 1161
5242    LPATLEELAAHYVDRLREVDPSGPYRLLGWSTGGI IAHAMATRLQDLGLPVELLAILDAY 2297
          . . : * : : : : * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
          ▼
EntF      AHVDIISP GTFEKIGPIIRATLNR----- 1293
159      EHLRMMRPAALRVIGPVLARALRS---TTPLSPA IKERI 1293
5242    SHKDM TLP GPIARIARVVADRLSALESKTDEQP----- 2450
          * : * . : * . : : *

```

Figura 13. Alineamiento múltiple de secuencias de aminoácidos del dominio tioesterasa (TE) de enzimas NRPS realizado con Clustal omega. Las flechas negras señalan los aminoácidos conservados del sitio catalítico reportados en la literatura para la proteína EntF de *Escherichia coli*. 159, gen 159 del clúster 3.2 de *Embleya* sp. NF3; 5242, Gen 5242 del clúster 1.16 de *Embleya* sp. NF3.

En resumen, se sugiere que los dominios C, A, PCP y TE que conforman los genes 5242, 158, 159 y 161 serán funcionales, y por tanto las enzimas NRPS codificadas por estos genes podrían participar en la biosíntesis de sideróforos NRPS.

D) Análisis de la regulación de la expresión de los clústeres NRPS

Con el fin de sugerir el sistema que controla la regulación de la expresión de los 2 clústeres NRPS se realizó una búsqueda de secuencias operadoras a las que se pueden unir los reguladores DtxR/IdeR y FUR en una región de 500 pb corriente arriba del inicio de los 2 clústeres utilizando los pHMM construidos en este trabajo (Tabla 12 y Tabla 14).

En el clúster 1.16 se identificaron tres secuencias operadoras putativas a las que se puede unir la proteína reguladora DtxR/IdeR (Tabla 19), las cuales cumplen con las características descritas en la literatura (Lee & Holmes, 2000), sugiriendo que la expresión de este clúster podría estar regulado por esta proteína. Sin embargo, se requieren más experimentos para confirmar esta hipótesis. Por otra parte, para el clúster 3.2 no se identificaron secuencias operadoras a las que se pueda unir el regulador DtxR/IdeR ni el regulador FUR.

Tabla 19. Secuencias operadoras putativas para la unión del regulador DtxR/IdeR identificadas en el clúster NRPS. La secuencia palindrómica se encuentra subrayada. La guanina o citosina que interrumpe el palíndromo se encuentra en rojo.

Clúster NRPS	Gen / Distancia del ATG	Genes putativos bajo su control	Secuencia	Valor E
1.16	Gen 5238 -79 pb	5238 al 5239	CAAGGTAAG <u>GCTAACCTAA</u>	0.00095
	Gen 5243 -155	5240 al 5243	TTAGGTAAG <u>CCTAAGCTAT</u>	0.0011
	Gen 5249 0	5249	TTAGGTAAG <u>CCTAAGCTAT</u>	0.002
3.2	-	-	-	-

Considerando los resultados de los análisis anteriores y los reportes en la literatura sugerimos que el clúster 1.16 podría estar involucrado en la biosíntesis de la estreptobactina/griseobactina a pesar de que el clúster no está completo según los resultados del programa antiSMASH. Es probable que los genes faltantes para la síntesis de este sideróforo se encuentren codificados cerca del clúster o en otra

parte del genoma, pero el programa antiSMASH no los reconoció. Por tanto, se confirmará experimentalmente por medio de un análisis de UPLC-MS si esta cepa codifica la estreptobactina en condiciones de laboratorio. Por otra parte, considerando la composición y los análisis de identidad de los genes que conforman el clúster 3.2 sugerimos que codificará un sideróforo con estructura potencialmente novedosa. En cuanto al sistema de regulación, sugerimos que la expresión del clúster 1.16 puede estar regulada por la proteína DtxR/IdeR mientras que la expresión del clúster 3.2 puede estar regulada por proteínas no estudiadas en este trabajo (Tabla 20).

Tabla 20. Características de los dos clústeres NRPS identificadas por los análisis *in silico*. Los genes biosintéticos agrupan los genes biosintéticos mínimos y los genes biosintéticos adicionales.

Clúster NRPS	Genes biosintéticos	Sistema de transporte completo / tipo de transportador	Secuencia operadora / proteína reguladora	Clúster funcional
1.16	4	No	Si DtxR/IdeR	Si
3.2	7	Si Transportador tipo ABC	No	Si

6.1.3 Búsqueda de transportadores de sideróforo de tipo ABC

Considerando que en la literatura se ha reportado que la captación y transporte de sideróforos hacia el citoplasma bacteriano requiere transportadores específicos para cada tipo de sideróforo y, que en ocasiones las bacterias pueden codificar transportadores que captan sideróforos no sintetizados por ellas, se esperaba identificar al menos 5 transportadores putativos de sideróforos en el genoma de la cepa NF3 ya que el programa antiSMASH detectó 5 CGB putativos de sideróforo. No obstante, el programa antiSMASH solo identificó un transportador de sideróforo putativo. Por tanto, se decidió analizar el genoma de la cepa NF3 por medio del programa PATRIC v. 3.6.12 en busca de transportadores de sideróforos de tipo ABC que pudieran participar en el movimiento de estos compuestos. Adicionalmente, con el fin de sugerir si los transportadores identificados conservan el sistema de

regulación descrito en la literatura, se realizó una búsqueda de secuencias operadoras a las que se les pudiera unir el regulador DtxR/IdeR o FUR.

En la tabla 21 se enlistan las características de los 5 transportadores de tipo ABC, identificados en 3 de los 8 contigs del genoma de la cepa NF3, que podrían participar en el movimiento de sideróforos. Cabe resaltar que el transportador identificado en el contig 3 corresponde al transportador identificado por el programa antiSMASH en el clúster 3.2. Es interesante mencionar que los 5 transportadores contienen secuencias operadoras a las que se puede unir el regulador DtxR/IdeR sugiriendo que su expresión está controlada por este regulador; sin embargo, experimentos adicionales son requeridos para confirmar esta hipótesis.

Teniendo en cuenta que en la literatura se ha reportado que los transportadores de sideróforo tienen especificidad por la estructura química de cada compuesto (Schalk et al., 2012; Rudolf et al., 2016) sugerimos que *Embleya* sp. NF3 podría transportar 5 sideróforos con estructura química diferente. Así mismo, dado que los análisis *in silico* sugieren que los clústeres 1.9, 2.2, 1.16 y 3.2 son funcionales, hipotetizamos que 4 de los 5 transportadores identificados podrían participar en la captación de los sideróforos codificados por estos clústeres, y 1 transportador podría mediar la captación de un sideróforo producido por otro microorganismo (xenosideróforo) (Miethke et al., 2013; Zhu et al., 2020). No obstante, estudios experimentales son requeridos para confirmar si los 5 transportadores codificados por esta cepa captan 5 sideróforos diferentes o si, por el contrario, más de un transportador puede mediar la captación de un mismo sideróforo.

Tabla 21. Transportadores de sideróforo de tipo ABC identificados en el genoma de *Embleya* sp. NF3 por medio del programa PATRIC. No se midió la distancia entre los transportadores y los clústeres ubicados en diferentes contigs. La secuencia palindrómica se encuentra subrayada. La guanina o citosina que interrumpe el palíndromo se encuentra en rojo.

Posición en el genoma	Número de genes que conforman el transportador	Distancia del transportador con los clústeres NIS			Distancia del transportador con los clústeres NRPS		Regulación putativa			
		1.8	1.9	2.2	1.16	3.2	Regulador putativo	Distancia del ATG	Secuencia	Valor E
Contig 1 1.139.520 – 1.143.426	4	~ 320 kb	~ 480 kb	-	~ 4.7 Mb	-	DtxR/IdeR	-55	<u>TTAGGTCAG</u> C <u>CTAACCTGC</u>	0.0023
Contig 1 5.391.962 – 5.396.093	4	~ 3.9 Mb	~ 3.7 Mb	-	~ 500 kb	-	DtxR/IdeR	-42	<u>ATAGGTAAG</u> G <u>CTAACCTCA</u>	0.0011
Contig 1 6.889.939 – 6.894.067	4	~ 5.4 Mb	~ 5.2 Mb	-	~ 1.0 Mb	-	DtxR/IdeR	-100	<u>TTAGCTTAG</u> G <u>CTGTCCTAA</u>	0.0005
Contig 2 1.162.558 – 1.166.801	4	-	-	~ 1.1 Mb	-	-	DtxR/IdeR	-38	<u>ITAGGGCAG</u> G <u>CTTACCTTA</u>	0.00064
							DtxR/IdeR	- 136	<u>ITAGGTTAG</u> C <u>CTAAGCTGA</u>	0.00035
Contig 3 192.668 – 198.428	5	-	--	-	-	275 pb	DtxR/IdeR	-230	<u>TTAGGTAAG</u> C <u>CTTGCCTAT</u>	0.0012

6.2 Detección de la producción de sideróforos por *Embleya* sp. NF3 en condiciones de laboratorio

Con el fin de determinar si *Embleya* sp. NF3 expresa en condiciones de laboratorio los clústeres 1.9, 2.2 y 1.16 como se predijo en los análisis *in silico*, se evaluó la producción de sideróforos por la cepa NF3 utilizando: 1) el ensayo de agar CAS para detectar sideróforos independientemente de su naturaleza química, 2) el ensayo de sal de tetrazolium y el ensayo de Arnow para identificar la naturaleza química de los sideróforos producidos, 3) CCF para determinar el número de sideróforos producidos y su naturaleza química y, 4) UPLC-MS para determinar si los sideróforos producidos por *Embleya* sp. NF3 son compuestos conocidos. En las secciones posteriores se describe con detalle los resultados de cada ensayo.

6.2.1 Detección de sideróforos por medio de placas de agar CAS

El ensayo Cromo Azurol S (CAS) es un método colorimétrico que permite detectar cualitativamente la producción de sideróforos independientemente de su naturaleza química. El reactivo CAS está conformado por un complejo Fe-CAS-HDTMA que produce una tonalidad azul. Cuando la muestra a analizar tiene un quelante de hierro fuerte como un sideróforo, el hierro es removido del complejo liberándose el colorante CAS, lo que da como resultado el cambio de color azul a naranja o rosa (Himpsl & Mobley, 2019; Schwyn & Neilands, 1987).

Se evaluó la producción de sideróforos por parte de *Embleya* sp. NF3 al crecer en los medios YMG, CMM Y NMMP, los cuales permiten generar una condición de deficiencia de hierro que induce la expresión de sideróforos. Estos medios fueron seleccionados teniendo en cuenta que: 1) el medio YMG es el medio en el que la bacteria tiene un mejor crecimiento (Rodríguez-Peña, 2020), aunque contiene trazas de hierro por ser un medio complejo, 2) el medio CMM es un medio químicamente definido que ha sido utilizado por otros autores para evaluar la producción de sideróforos, y 3) el medio NMMP es un medio mínimo químicamente definido en el que crecen gran cantidad de bacterias del género *Streptomyces*.

Se detectó actividad de sideróforo en placas de agar CAS sólo cuando la cepa NF3 creció por 4 días en medio NMMP, por lo que se seleccionó como el medio de cultivo a utilizar para la obtención y detección de al menos un sideróforo (Figura 14).

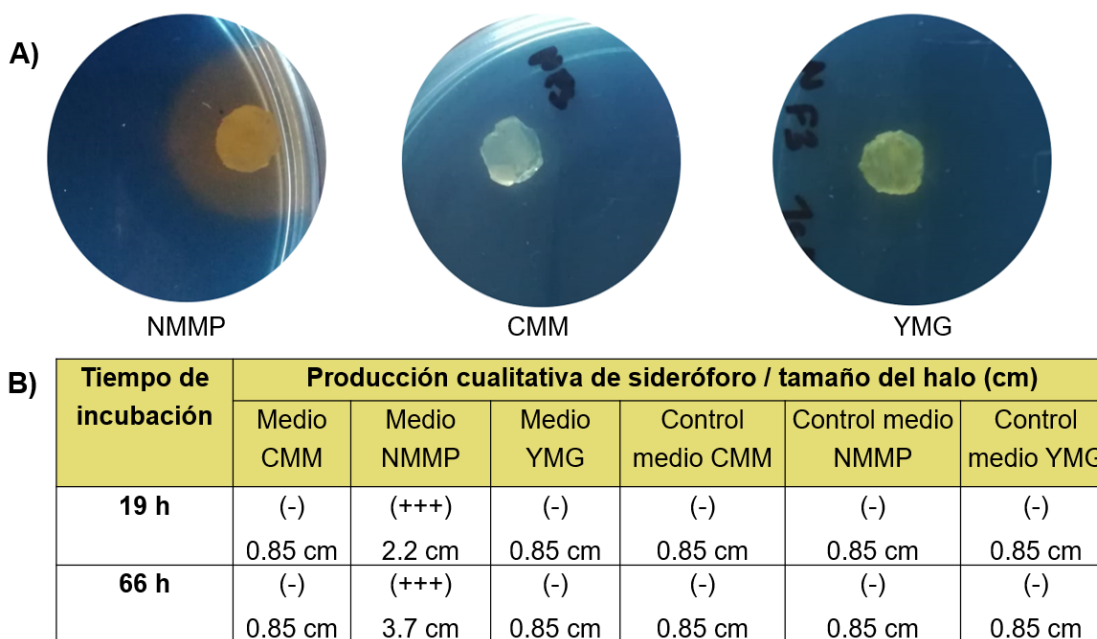


Figura 14. Evaluación de la producción de sideróforos utilizando el ensayo CAS en placas de agar. A) Placas de agar CAS tras 66 h de incubación con trozos de agar de los medios NMMP, CMM y YMG en los cuales creció previamente *Embleya* sp. NF3 por 4 días. B) Diámetro de los halos alrededor de los trozos de agar de 0.85 cm tras 19 y 66 h de incubación en el agar CAS. La producción de sideróforo fue clasificada cualitativamente por cruces.

6.2.2 Detección de la producción y caracterización de la naturaleza química de sideróforos

Tras identificar que *Embleya* sp. NF3 produce al menos un sideróforo al crecer en el medio NMMP, se determinó la naturaleza de los sideróforos producidos en esta condición de cultivo. Para esto se analizó por medio del ensayo de sal de tetrazolium y del ensayo de Arnow, el extracto metanólico del sobrenadante de un cultivo de la cepa NF3 en medio NMMP por 66 h.

El ensayo de tetrazolium detecta sideróforos de naturaleza hidroxamato basándose en la capacidad del ácido hidroxámico para reducir la sal de tetrazolio por hidrólisis

de grupos hidroxamato usando un álcali fuerte. La aparición inmediata de un color intenso u oscuro evidencia la presencia de sideróforos hidroxamato. Como se observa en la figura 15, se obtuvo una tonalidad verde oscura para el cloruro de hidroxilamina (control positivo) y una tonalidad gris para el extracto del medio NMMP (control negativo). Por otra parte, el extracto de la cepa NF3 tomó una tonalidad roja oscura que, como se ha reportado en la literatura, indica la presencia de sideróforos de naturaleza hidroxamato en la muestra. No obstante, este ensayo no se pudo validar ya que el control negativo tomó una tonalidad oscura y no roja clara como se ha reportado por otros autores (Kong *et al.*, 2020, Osman *et al.*, 2019). Se sugiere confirmar la presencia de sideróforos de esta naturaleza por medio de la prueba de Csáky o de la prueba del ácido perclórico (Ishimaru & Loper, 1993).

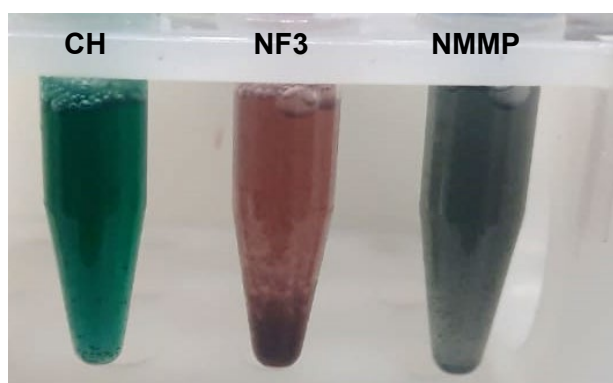


Figura 15. Resultados del ensayo de sal de tetrazolium. CH, cloruro de hidroxilamina [0.05 mg/mL]; NF3, extracto de *Embleya* sp. NF3; NMMP, extracto del medio NMMP.

Por otra parte, el ensayo de Arnow permite identificar sideróforos de naturaleza catecolato a partir de la detección de los grupos hidroxilo que contienen los fenoles de los grupos catecolato. Los resultados de este ensayo se muestran en la figura 16. Se evidenció la presencia de al menos un sideróforo catecolato en la muestra de la cepa NF3, ya que tomó una tonalidad amarilla similar a la tonalidad adquirida por los compuestos catecol y ácido 2,3 dihidrobenzoico utilizados como control positivo.

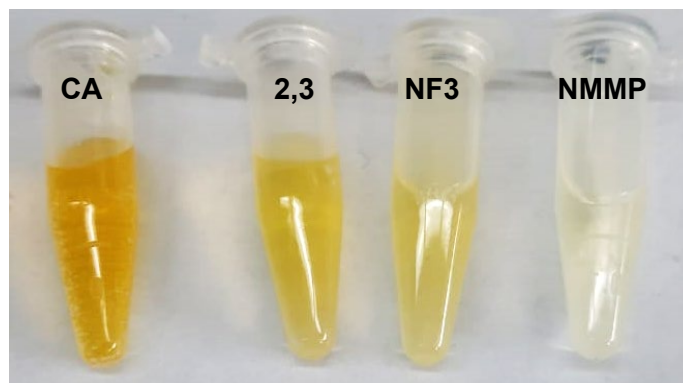


Figura 16. Resultados del ensayo de Arnow. CA, catecol [0.05 mg/mL]; 2,3, ácido 2,3 dihidrobenzoico [0.05 mg/mL]; NF3, extracto de *Embleya* sp. NF3; NMMP, extracto del medio NMMP.

6.2.3 Detección de sideróforos por cromatografía en capa fina (CCF)

Ya que aparentemente sólo se encontraron sideróforos de naturaleza catecolato en el extracto metanólico de *Embleya* sp. NF3, se quiso corroborar si sólo se producen sideróforos de esta naturaleza y determinar cuántos sideróforos se están produciendo en las condiciones de cultivo evaluadas. Para esto se utilizó la CCF, un ensayo que permite separar moléculas basados en su polaridad. Por tanto, si la cepa NF3 está expresando más de un sideróforo se encontrará más de una mancha en la placa. Así mismo, por medio de reveladores específicos la CCF permitirá identificar la naturaleza de los sideróforos producidos por esta cepa.

En la figura 17 se muestra el resultado de la CCF revelada con FeCl_3 0,1 M en HCl 0,1 N y el factor de retención (R_f) para cada compuesto. Con este revelador los sideróforos de naturaleza catecolato se ven de color gris oscuro/morado y los sideróforos de naturaleza hidroxamato se ven de color naranja. Los controles catecol ($R_f = 1$; carril 6) y ácido 2,3 dihidrobenzoico ($R_f = 0.92$; carril 7) de naturaleza catecolato y el control desferroxamina ($R_f = 0.78$; carril 5) de naturaleza hidroxamato dieron la tonalidad esperada. El control cloruro de hidroxilamina de naturaleza hidroxamato no evidenció cambio de color con este revelador (carril 8). La muestra del extracto de la cepa NF3 (carriles 4, 9 y 11) contiene sólo un sideróforo de naturaleza catecolato dado que sólo se separó un compuesto de tonalidad morada. Por otra parte, la muestra del extracto de la cepa NF3 no contiene desferroxamina

ni sideróforos de naturaleza hidroxamato debido a que no se detectaron compuestos con el valor de R_f de la desferroxamina ni con tonalidad naranja. La presencia de manchas blancas tanto en la muestra del extracto del medio NMMP (carriles 3, 10 y 12) como en la muestra del extracto de la cepa NF3 (carriles 4, 9 y 11) indican que la extracción con metanol permitió obtener compuestos polares del medio NMMP que interfirieron con la corrida. Las 3 muestras del extracto de la cepa NF3 analizadas (carriles 4, 9 y 11) dieron valores de R_f diferentes ($R_{f4} = 0.39$, $R_{f9} = 0.22$ y $R_{f11} = 0.34$) probablemente debido a la concentración de compuestos polares del medio NMMP que afectaron la corrida (Figura 17).

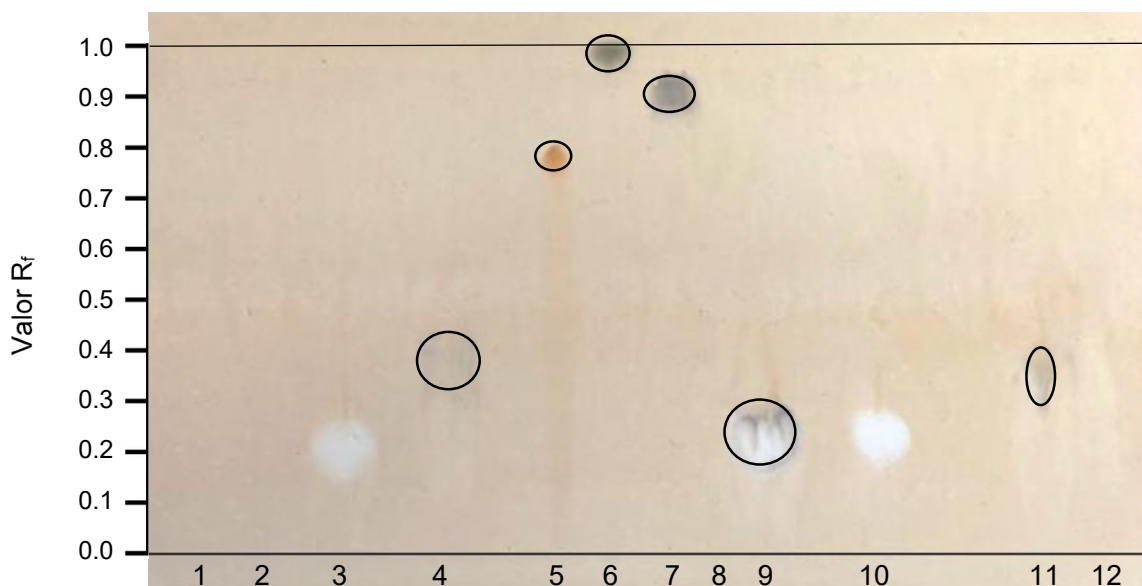


Figura 17. CCF revelada con FeCl_3 0,1 M en HCl 0,1 N. 1, agua; 2, metanol; 3, 5 μL de extracto del medio NMMP; 4, 5 μL de extracto de *Embleya* sp. NF3; 5, 0.1 mg/mL de desferroxamina; 6, 0.003 mg/mL catecol; 7, 0.016 mg/mL ácido 2,3 dihidrobenzoico; 8, 0.1 mg/mL cloruro de hidroxilamina; 9, 10 μL de extracto de *Embleya* sp. NF3; 10, 10 μL de extracto del medio NMMP; 11, 2 μL de extracto de *Embleya* sp. NF3; 12, 2 μL de extracto del medio NMMP. Los controles positivos catecol y ácido 2,3 dihidrobenzoico presentaron tonalidad gris oscura/morada. El control positivo desferroxamina presentó tonalidad naranja. La escala de los valores de R_f se muestra a la izquierda de la figura.

En la figura 18 se muestra el resultado de la CCF revelada con el reactivo de Arnow y el factor de retención (R_f) para cada compuesto. Con este revelador los sideróforos de naturaleza catecolato toman una tonalidad amarilla. Los controles catecol ($R_f = 0.96$; carril 6) y ácido 2,3 dihidrobenzoico ($R_f = 0.95$; carril 7) de naturaleza catecolato se observaron con una tonalidad amarilla como se esperaba. Es

importante mencionar que, aunque la desferroxamina es un sideróforo de naturaleza hidroxamato, se observó que el compuesto tomó una tonalidad ligeramente amarilla ($R_f = 0.80$; carril 5). A pesar de que el ensayo de Arnow detecta los grupos hidroxilo que tienen los fenoles presentes en los grupos catecolato, la desferroxamina pudo haber adquirido una tonalidad amarilla por la presencia de grupos hidroxilamonio en los grupos hidroxamato que unen al hierro (Arnow, 1937). Se observó en las 3 muestras del extracto de la cepa NF3 (carriles 4, 9 y 11) un compuesto de tonalidad amarilla confirmando la presencia de un sideróforo de naturaleza catecolato. A diferencia que la placa revelada con $FeCl_3$ 0,1 M en HCl 0,1 N, en esta placa no se observaron manchas de color blanco en las muestras del extracto del medio NMMP (carriles 3, 10, 12); sin embargo, las 3 muestras del extracto de la cepa NF3 analizadas (carriles 4, 9 y 11) dieron valores de R_f diferentes ($R_{f4} = 0.33$, $R_{f9} = 0.24$ y $R_{f11} = 0.33$) probablemente debido a la concentración de compuestos polares del medio NMMP que interfirieron con la corrida (Figura 18).

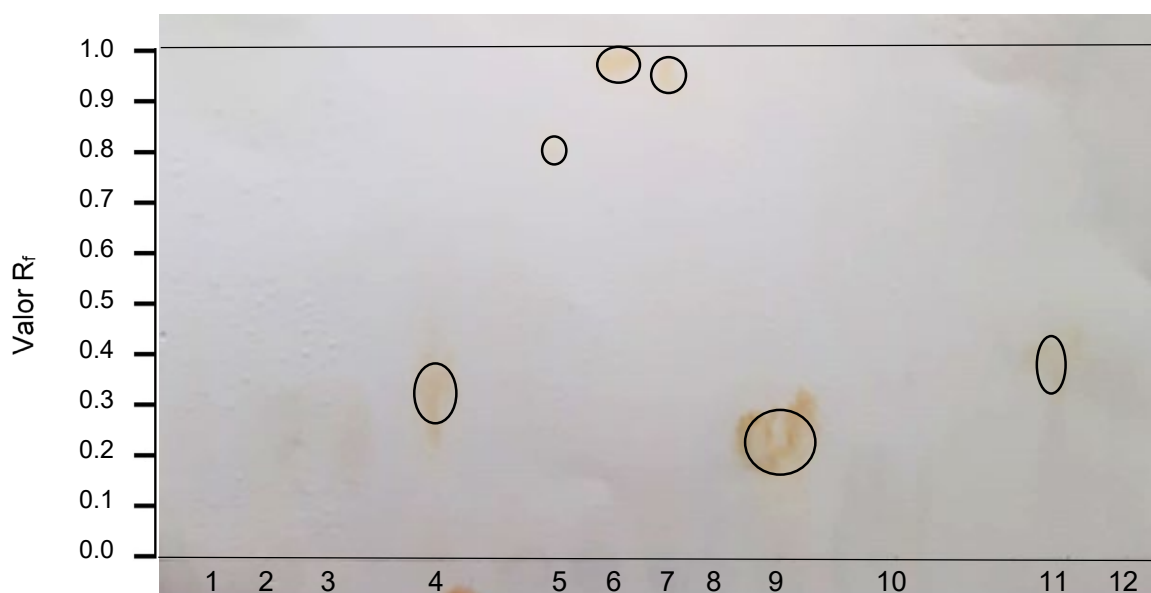


Figura 18. CCF revelada con el reactivo de Arnow. 1, agua; 2, metanol; 3, 5 μ L de extracto del medio NMMP; 4, 5 μ L de extracto de *Embleya* sp. NF3; 5, 0.1 mg/mL de desferroxamina; 6, 0.003 mg/mL catecol; 7, 0.016 mg/mL ácido 2,3 dihidrobenzoico; 8, 0.1 mg/mL cloruro de hidroxilamina; 9, 10 μ L de extracto de *Embleya* sp. NF3; 10, 10 μ L de extracto del medio NMMP; 11, 2 μ L de extracto de *Embleya* sp. NF3; 12, 2 μ L de extracto del medio NMMP. Los controles positivos catecol, ácido 2,3 dihidrobenzoico y desferroxamina presentaron tonalidad amarilla. La escala de los valores de R_f se muestra a la izquierda de la figura.

6.2.4 Determinación de producción de sideróforos por UPLC-MS

Con el fin de corroborar si sólo se produce un sideróforo de naturaleza catecolato en las condiciones de cultivo evaluadas y si el sideróforo producido es un compuesto conocido, se decidió evaluar el extracto metanólico del sobrenadante de *Embleya* sp. NF3 por medio de UPLC-MS.

Antes de iniciar con el análisis, se confirmó por medio de cajas de agar CAS la presencia de sideróforos en todos los pasos realizados para la obtención del extracto metanólico del sobrenadante de la cepa NF3 resuspendido en acetonitrilo:H₂O (1:1) y del extracto metanólico del medio NMMP resuspendido en acetonitrilo:H₂O (1:1), los cuales fueron los extractos analizados por UPLC-MS (Tabla 22).

Tabla 22. Resultados del monitoreo de la producción de sideróforos durante el procesamiento de las muestras previo al análisis de UPLC-MS por medio del agar CAS. La producción de sideróforo fue clasificada cualitativamente por cruces.

Muestra	Producción de sideróforo en agar CAS
Sobrenadante de <i>Embleya</i> sp. NF3 tras 66 h de cultivo	+
Medio NMMP	-
Extracto metanólico del sobrenadante de <i>Embleya</i> sp. NF3	+
Extracto metanólico del medio NMMP	-
Control negativo de metanol	-
Stock del extracto del sobrenadante de <i>Embleya</i> sp. NF3 disuelto en acetonitrilo:H ₂ O (1:1)	+
Stock del extracto del medio NMMP disuelto en acetonitrilo:H ₂ O (1:1)	-
Control negativo de acetonitrilo: H ₂ O (1:1)	-
Control positivo de mesilato de desferroxamina [0.05 mg/mL] disuelto en acetonitrilo:H ₂ O (1:1)	++

Ya que se confirmó la presencia de sideróforos en las muestras que contienen el sobrenadante de la cepa NF3, se continuó con el análisis por UPLC-MS de las siguientes muestras: 1) dilución 1:20 con acetonitrilo:H₂O (1:1) del stock del sobrenadante de la cepa NF3 (MS), 2) dilución 1:20 con acetonitrilo:H₂O (1:1) del stock del medio NMMP (CM), 3) MS con adición de hierro (MS + Fe) y 4) CM con adición de hierro (CM + Fe). Como control positivo se analizó el mesilato de desferroxamina 0.5 µg/mL (DFO) y DFO con adición de hierro (DFO + Fe). En la tabla 23 se enlista la forma en la que las muestras fueron pareadas para su análisis.

Tabla 23. Muestras analizadas por UPLC-MS y organización para su análisis.

Análisis pareado	Muestras		
	Extracto del medio NMMP	Extracto de <i>Embleya</i> sp. NF3	Control
Ronda 1	Control del medio (CM)	Sobrenadante (MS)	Desferroxamina [0.05 µg/mL] (DFO)
Ronda 2	CM + Fe	MS + Fe	DFO + Fe

Los resultados obtenidos fueron analizados en dos etapas. En la primera etapa se realizó una búsqueda manual en los cromatogramas obtenidos por medio del software MassLynx MS. En la segunda etapa se analizaron los resultados del UPLC-MS por medio del programa online XCMS (Gowda *et al.*, 2014).

En el análisis de resultados de la primera etapa se identificó por medio del software MassLynx MS la desferroxamina en la muestra DFO. El pico de la desferroxamina se encontró en un tiempo de retención de 3.35 min, con una señal m/z de 561.3618 con error de 1.1 ppm y composición química C₂₅H₄₉N₆O₈, la cual corresponde a la composición química de la desferroxamina ionizada positivamente (Figura 19). Por el contrario, en la muestra DFO + Fe no se identificó ninguna señal m/z que correspondiera a la desferroxamina quelada (masa molecular teórica de 614.2721 Da), sugiriendo que este compuesto no pudo ser ionizado ni identificado por el detector de masas.

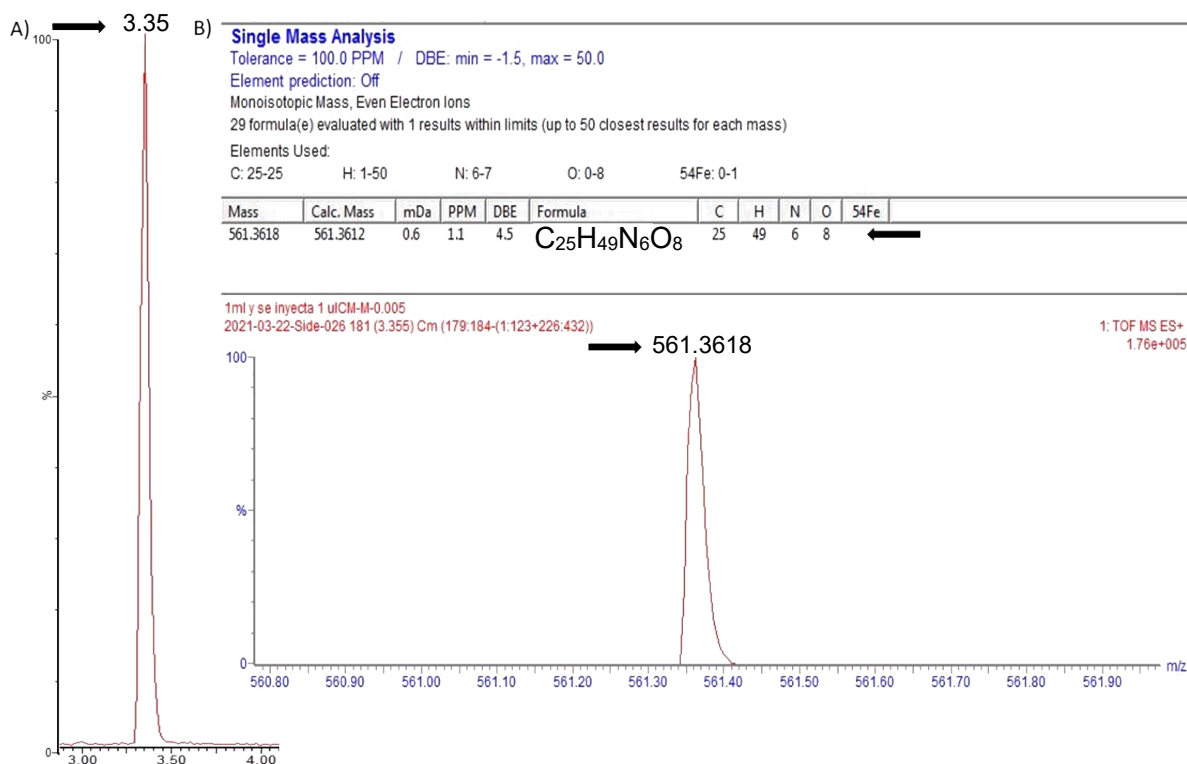


Figura 19. A) Cromatograma del UPLC-MS del control con desferroxamina. La flecha negra indica el tiempo de retención de este compuesto (3.35 min). B) Análisis de masas del pico del tiempo de retención de 3.35 min. Masa de 561.3612 Da con error de 1.1 ppm. La composición química del pico sugerida por el programa corresponde con la composición química de la desferroxamina ionizada positivamente ([M+H]⁺).

Posteriormente, se buscó manualmente en las muestras MS y MS + Fe la masa molecular teórica de los sideróforos caracterizados experimentalmente con los cuales tienen similitud los clústeres putativos de sideróforo de la cepa NF3. Ninguna de las masas teóricas de los sideróforos quelados y no quelados reportadas en la tabla 24 fueron identificadas en las muestras evaluadas (Kim *et al.*, 2019; Pluháček *et al.*, 2014; Matsuo *et al.*, 2011; Hirschmann *et al.*, 2017).

Tabla 24. Masa molecular teórica de los sideróforos buscados manualmente en las muestras del extracto metanólico del sobrenadante de *Embleya* sp. NF3 con y sin adición de hierro

Sideróforo	Fórmula molecular	Masa teórica (m/z)	
		[M+H] ⁺	[M+Fe-2H] ⁺
Aerobactina	C ₂₂ H ₃₆ N ₄ O ₁₃	565.2	618.1
Bacilibactina	C ₃₉ H ₄₂ N ₆ O ₁₈	883.2628	936.1743

Bisucaberina	C ₁₈ H ₃₂ N ₄ O ₆	401.2395	454.1509
Bisucaberina B	C ₁₈ H ₃₄ N ₄ O ₇	419.2500	472.1615
Coelichelina	C ₂₁ H ₃₉ N ₇ O ₁₁	566.2780	619.1895
Desferroxamina B	C ₂₅ H ₄₈ N ₆ O ₈	561.3606	614.2721
Desferroxamina E	C ₂₇ H ₄₈ N ₆ O ₉	601.3556	654.2670
Enterobactina	C ₃₀ H ₂₇ N ₃ O ₁₅	670.1515	723.0630
Estreptobactina	C ₅₁ H ₆₉ N ₁₅ O ₁₈	1180.5004	-
Petrobactina	C ₃₄ H ₅₀ N ₆ O ₁₁	719.3610	772.2725
Salinichelina A	C ₂₆ H ₄₆ N ₁₀ O ₁₀	659.3460	-
Salinichelina B	C ₂₇ H ₄₈ N ₁₀ O ₁₀	673.3614	-
Salinichelina C	C ₂₈ H ₅₀ N ₁₀ O ₁₀	687.3781	-
Vibriobactina	C ₃₅ H ₃₉ N ₅ O ₁₁	706.286	-
Vibrioferina	C ₁₆ H ₂₂ N ₂ O ₁₂	434.117	-

En la etapa dos se analizaron los resultados por medio del programa online XCMS. Por medio de este programa, se buscó en las muestras MS, MS + Fe y DFO, por nombre y por masa molecular teórica, los sideróforos mencionados en la tabla 24, identificando solamente la presencia de la desferroxamina no quelada en la muestra DFO.

Debido a que en ninguno de los dos análisis se identificó la masa teórica de la estreptobactina, sideróforo que según el análisis *in silico* puede estarse produciendo, se realizó una búsqueda bibliográfica en la que se encontró que el sideróforo estreptobactina es el mismo sideróforo griseobactina (Matsuo *et al.*, 2011; Patzer & Braun, 2010) y que, en el 2017, Gubbens *et al.* detectaron la griseobactina con mayor intensidad en la especie $[M+3H]^{3+}$ en m/z 394.1720 y la especie $[M+2H]^{2+}$ en m/z 590.7538. Por lo tanto, se decidió buscar estas señales en la muestra MS por medio del programa XCMS. En esta muestra se identificaron las señales de un isotopo $[M+3H]^{3+}$ en m/z 394.1652 y de un isotopo $[M+2H]^{2+}$ en m/z 590.7409, lo que sugiere la presencia de la estreptobactina/griseobactina en la muestra analizada (Figura 20).

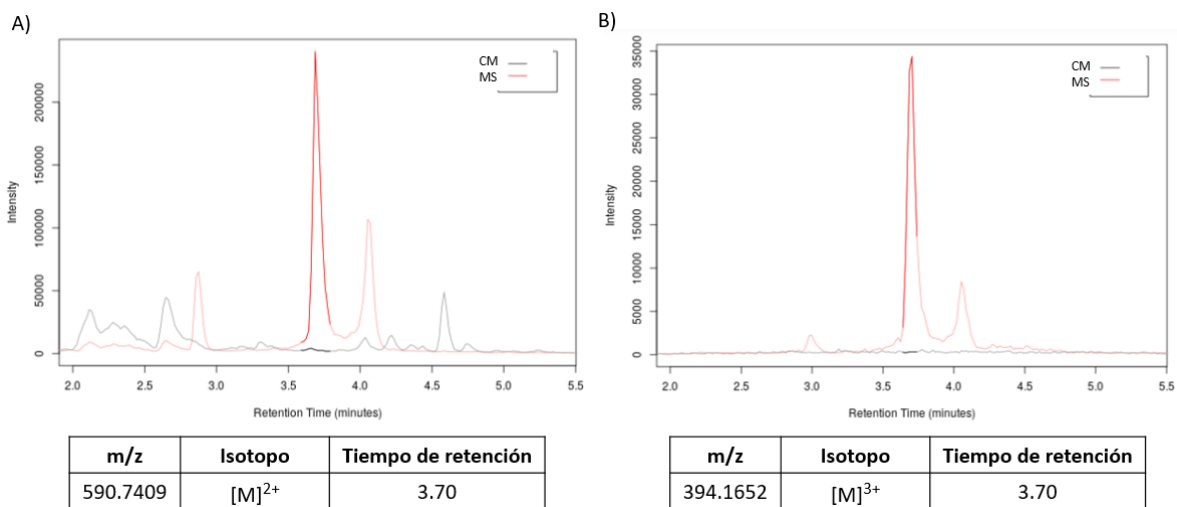


Figura 20. Cromatograma de iones extraídos de la muestra del sobrenadante (MS) donde se identificaron isotopos que sugieren la presencia de la griseobactina en la muestra. A) Cromatograma del isotopo $[M+3H]^{3+}$ en m/z 394.1652. B) Cromatograma del isotopo $[M+2H]^{2+}$ en m/z 590.7409.

Teniendo en cuenta los resultados de la evaluación de la producción de sideróforos podemos concluir que, en las condiciones de cultivo evaluadas en este trabajo, solo se identificó la producción del sideróforo estreptobactina/griseobactina, de naturaleza catecolato, el cual es codificado por el clúster 1.16. Este resultado permite plantearnos las siguientes dos hipótesis:

- 1) Aunque los resultados del análisis *in silico* sugieren que los clústeres 1.16, 1.9 y 2.2 podrían ser expresados en las mismas condiciones de cultivo, debido a que cuentan con secuencias operadoras a las que se les puede unir el regulador DtxR/IdeR, el identificar solamente la producción del clúster 1.16 en las condiciones de cultivo evaluadas sugiere que los clústeres 1.9, 2.2 y 3.2 podrían responder a otros reguladores globales de actinobacterias, como lo son el regulador de nitrógeno DasR o el regulador de fósforo Pho, y por tanto no se logró su expresión en las condiciones evaluadas.
- 2) Los clústeres 1.9 y 2.2 codifican para sideróforos con estructura química novedosa, por lo que no fueron identificados en el análisis de UPLC-MS (límite de detección 0.091 ng/mL y límite de cuantificación 1.46 ng/mL) y, se

producen en tan baja concentración que no fueron detectados por los ensayos colorimétricos (límite de detección 20 μ M) ni por el ensayo en CCF.

Considerando estas hipótesis sugerimos que: 1) se puede evaluar el efecto de diferentes ácidos orgánicos, fuentes de carbono, nitrógeno y fósforo, así como el uso del compuesto 2,2'-bipiridina para identificar las condiciones de cultivo en las que se expresen sideróforos diferentes a la estreptobactina, como se ha reportado en la literatura, y 2) el expresar heterológamente los clústeres 1.9, 2.2 y 3.2 facilitará la producción y caracterización de los sideróforos potencialmente novedosos codificados por estos clústeres, ya que su expresión no dependerá del sistema de regulación de la cepa NF3. No obstante, la expresión heteróloga de sideróforos representa un desafío, puesto que hasta el momento no se ha desarrollado ningún hospedero de la familia *Streptomycetaceae* para su expresión, por lo cual lograr la expresión heteróloga de un sideróforo codificado por la cepa NF3 consolidará el primer reporte de este tipo.

6.3 Construcción y caracterización de la biblioteca genómica de *Embleya* sp. NF3

6.3.1 Construcción de la biblioteca genómica

Embleya sp. NF3 es una bacteria que posee un genoma que se degrada con facilidad tras su manipulación, por lo que construir una biblioteca genómica facilitará contener su ADN en una forma de fácil acceso y rápida manipulación. Se realizó la construcción de la biblioteca con el kit CopyControl™ HTP Fosmid Library Production Kit de Lucigen con los fósmidos pCC1FOS™ y pCC2FOS™. Se seleccionó este kit porque los vectores aceptan tamaños de inserto de hasta 40 kb, tamaño máximo de la mayoría de CGB que codifican para MS. En este proyecto nos interesa identificar las clonas que contengan los CGB potencialmente novedosos codificados por la cepa NF3, con el fin de facilitar su clonación y posterior estudio. No obstante, la biblioteca genómica contendrá gran parte de los CGB novedosos de la cepa NF3 para ser estudiados en un futuro.

6.3.1.1 Extracción del ADN genómico de *Embleya* sp. NF3

El aislamiento del ADN genómico es el primer paso y el más importante para la construcción de una biblioteca genómica, ya que las reacciones de ligación y empaquetamiento dependen de la calidad e integridad de la muestra. Se estableció el protocolo para la extracción del ADN genómico de *Embleya* sp. NF3 siguiendo la metodología de Vázquez-Hernández (2017) y Marmur (1961), a partir de un cultivo en medio líquido. Se logró extraer ADN genómico de concentración y calidad aceptable que no se encuentra degradado ni contaminado con RNA, lo cual nos permitió continuar con la construcción de la biblioteca (Figura 21).

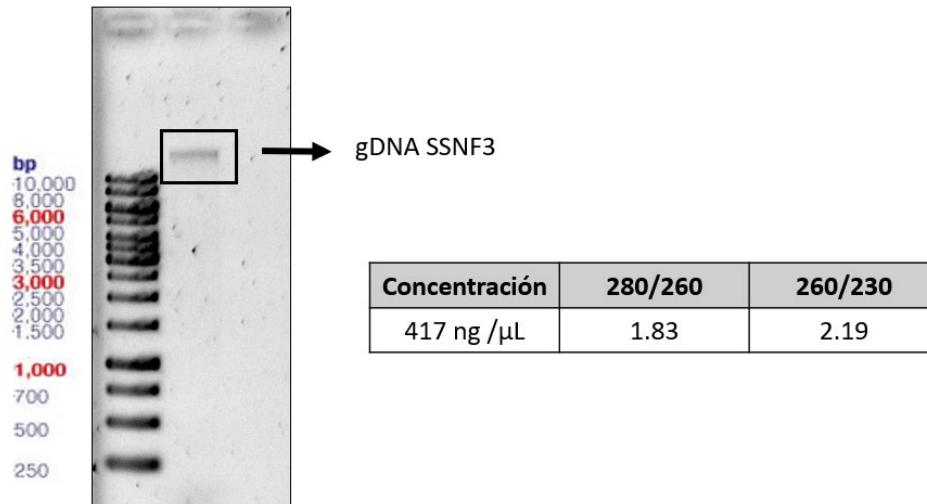


Figura 21. ADN genómico de *Embleya* sp. NF3. Carril 1, Marcador de peso molecular “Generuler 1kb ADN ladder” de THERMO; Carril 2, ADN genómico de *Embleya* sp. NF3.

6.3.1.2 Fragmentación del ADN genómico

Ya que los vectores aceptan fragmentos de ADN de aproximadamente 40 kb, se fragmentó el ADN de forma mecánica pasando 50 μ L de ADN por una aguja de jeringa para insulina 50, 100, 150, 200, 300, 400 y 500 veces. Por medio de un gel de electroforesis se determinó que pasar el ADN por la aguja 50 veces permite obtener fragmentos de aproximadamente 40 kb (Figura 22).

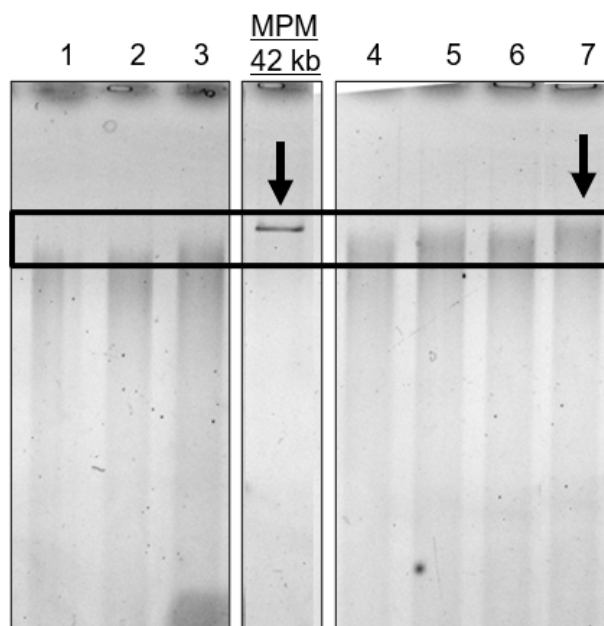


Figura 22. Fragmentación del ADN genómico de *Embleya* sp. NF3 utilizando jeringa para insulina con aguja. Carril 1, fragmentación 500 veces; carril 2, 400 veces; carril 3, 300 veces; carril 4, 200 veces; carril 5, 150 veces; carril 6, 100 veces; carril 7, 50 veces. Marcador de peso molecular: ADN control del fósido de 42 kb.

6.3.1.3 Reparación de los fragmentos de ADN genómico y su ligación al vector

Teniendo en cuenta que durante la fragmentación mecánica se obtienen pedazos de ADN con extremos cohesivos y para la ligación se requieren extremos romos, se repararon los fragmentos para convertirlos en fragmentos con extremos romos. Tras la reparación, se verificó por un gel de electroforesis la presencia de una banda relativamente gruesa de aproximadamente 40 kb que nos indica que hay una gran concentración de ADN de este tamaño (Figura 23, carril 1).

A partir de esta muestra se realizó la ligación de los fragmentos de 40 kb reparados al vector pCC1FOSTM y pCC2FOSTM utilizando la enzima T4 ADN ligasa de NEB. En el carril 2 de figura 23 se observa el resultado de la ligación. La banda superior corresponde al vector que ha ligado el inserto (aproximadamente 48 kb) y la banda inferior corresponde con el vector sin ligar (8 kb). Una vez verificada la ligación se procedió a realizar el empaquetamiento del vector recombinante en las cápsulas virales.

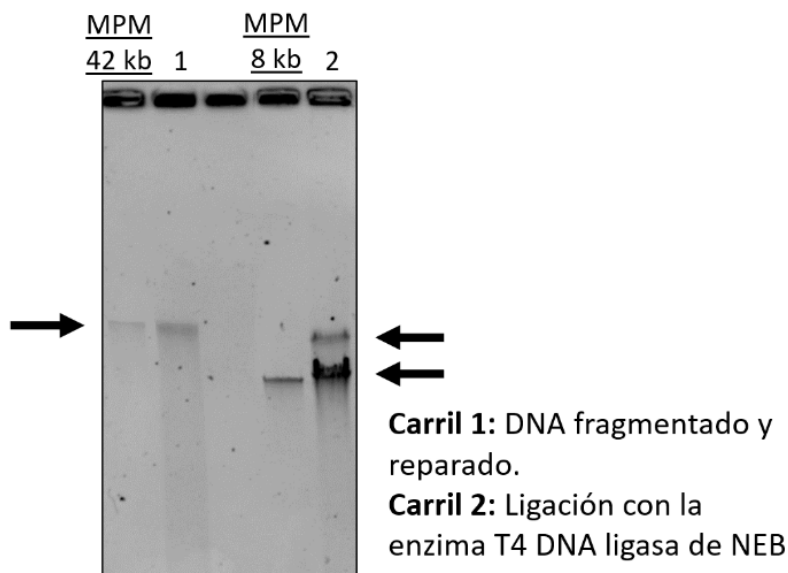


Figura 23. Reparación de los fragmentos de ADN y ligación al vector pCC2FOS. Carril 1, ADN de 40 kb aproximadamente tras la reparación de sus extremos; carril 2, ligación de los fragmentos reparados al vector pCC2FOS. Marcadores de peso molecular: ADN control del fósido de 42 kb y vector pCC2FOS de 8 kb.

6.3.1.4 Infección y selección de las clonas que tienen el vector recombinante

Tras el empaquetamiento del vector recombinante, se realizó la infección viral de las células *E. coli* EPI300-T1^R las cuales son resistentes al fago T1 utilizado para el empaquetamiento de los fósidos recombinantes. Las células infectadas se crecieron en placas de agar LB con 12.5 µg/mL de Cm, 0.05 mM de IPTG y 40 µg/mL de X-gal. El cloranfenicol permitió la selección de clonas por resistencia a antibiótico donde sólo crecieron las clonas que contienen el fósido. El IPTG y el X-gal, por el método de selección por α-complementación, permitieron diferenciar las clonas que contienen el fósido vacío (colonias azules) de las que tienen el fósido recombinante (colonias blancas), siendo estas últimas las clonas que conforman la biblioteca genómica.

Tras dos rondas de ligación e infección se obtuvieron 1,868 colonias de las cuales se seleccionaron sólo las 1,734 clonas de color blanco para conformar la biblioteca genómica (Tabla 25). El uso de dos vectores diferentes para la ligación no afecta los resultados ya que la única diferencia entre ellos es que el vector pCC2FOSTM

cuanta con un casete de cebadores que optimiza su secuenciación y minimiza la probabilidad de unión de los cebadores a secuencias del ADN de *E. coli* (Anexo 5).

Tabla 25. Características de las dos rondas de infecciones realizadas.

Rondas de ligación e infección	Vector	Colonias blancas	Colonias azules	Total
1	pCC2FOS	979	84	1063
2	pCC1FOS	755	50	805
Total	-	1734	134	1868

6.3.1.5 Almacenamiento de la biblioteca genómica

Las 1734 colonias que conforman la biblioteca genómica se almacenaron a -80 °C con el fin de preservar la biblioteca. Para esto, las colonias fueron repicadas individualmente en placas de 96 pozos en medio LB líquido con 7 µg/mL de Cm que se dejaron incubando O/N. Por otra parte, se conformaron 87 *pools* con 10 a 30 colonias individuales que se repicaron siguiendo las condiciones anteriores. Posterior a la incubación se adicionó glicerol al 40% y se almacenaron a -80°C. La distribución de las colonias individuales y los *pools* se encuentra en el anexo 6.

6.3.2 Caracterización de la biblioteca genómica

6.3.2.1 Cobertura de la biblioteca genómica

Como primer acercamiento para caracterizar y sugerir la funcionalidad de la biblioteca genómica de *Embleya* sp. NF3 se determinó su cobertura utilizando la formula descrita por Rosengarten *et al.* (2015). Como número de clonas independientes se utilizó el 90% del total de clonas obtenidas en las dos rondas de ligación e infección (1,560 clonas), como proporción de clonas con inserto se tomó 0.99 y como tamaño medio del inserto se tomó 40 kb (Figura 24). Este resultado nos sugiere que el genoma de la cepa NF3 está contenido aproximadamente 5.6 veces en las 1734 clonas que conforman la biblioteca genómica. Por tanto, se espera tener una alta probabilidad de encontrar una secuencia de interés en la biblioteca.

$$\frac{1,560 \times 0.99 \times 40,000 \text{ pb}}{10,958,352 \text{ pb}} = \text{Cobertura de } 5.6 \text{ veces}$$

Figura 24. Cálculo de la cobertura de la biblioteca genómica de *Embleya* sp. NF3 utilizando la fórmula de Rosengarten *et al.*, 2015).

6.3.2.2 Búsqueda de los genes de interés en la biblioteca genómica

Como un segundo acercamiento para sugerir la funcionalidad de la biblioteca se buscaron las clonas que tuvieran los genes conservados *rpoB*, *gyrB*, *trpB*, *recA*, *atpD*, y la región buscada de los clústeres de la estefimicina, la nibomicina y de 4 CGB putativos de sideróforo, siendo estos últimos los de mayor interés para este estudio.

Lo primero que se realizó fue la extracción de los fósmidos a partir de los 87 *pools* siguiendo el protocolo descrito en el anexo 3. En la figura 25 se ejemplifican los resultados de la extracción del fósmito con los *pools* A1 al A5 de la caja #11, los cuales tienen un tamaño entre los 42 y 50 kb. Se observó la presencia de fósmito recombinante en los 87 *pools* que conforman la biblioteca genómica.

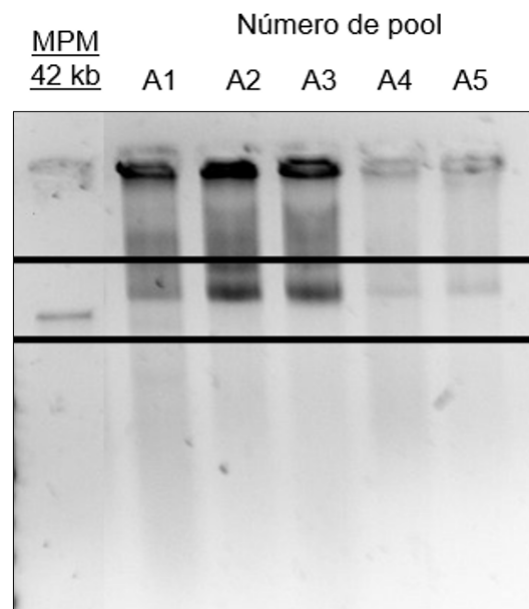


Figura 25. Extracción de los fósmitos de los *pools* A1 al A5 de la caja #11 de 24 pozos. Fósmito recombinante marcado con un recuadro negro.

Posteriormente se identificó por medio de PCR los *pools* que contienen los genes *rpoB*, *gyrB*, *trpB*, *recA*, *atpD*, los genes de los clústeres de la estefimicina y de la nibomicina, y de los 4 CGB putativos de sideróforo (Tabla 26). El identificar los 11 genes de interés nos indica que la biblioteca genómica construida es funcional. Por otra parte, la gran representatividad del gen *gyrB* se atribuye a que la cepa NF3 contiene tres copias en su genoma.

Tabla 26. Resultados de la búsqueda de los genes de interés en los 87 *pools* de la biblioteca genómica.

Gen o región buscada	Número de <i>pool</i> de la biblioteca genómica
<i>rpoB</i>	21C1, 22A2, 31A3, 31B2 y 31D4
<i>trpB</i>	01B4, 21C3, 31B5 y 31D5
<i>gyrB</i>	01C6, 21A4, 21A5, 21B1, 21B2, 21D1, 21D3, 21D4, 22A1, 22A4, 31B2 y 31D2
<i>recA</i>	22B3
<i>atpD</i>	11B3
Región del gen 1047 al gen 1048 de la nibomicina	11A5, 21D1, 31A3 y 31D6
Región del gen 1788 al gen 1790 de la estefimicina	21A1, 21D6 y 22B5
Clúster NIS 2.2	01A3, 01D1 y 31A5
Clúster NIS 1.8	01C4 y 11A2
Clúster NRPS 1.16	01C4, 11A3, 21A1, 21A6, 21B2 y 31A1
Clúster NRPS 3.2	21B6, 21D5, 22A3, 31A2 y 31D2

7. CONCLUSIONES

El análisis bioinformático de las actinobacterias *Streptomyces* sp. L06, *S. thermocarboxydus* K155, *Actinoplanes* sp. TFC3 y *Embleya* sp. NF3 evidenció que la cepa NF3 tiene la mayor capacidad biosintética para la producción de sideróforos potencialmente novedosos, por lo cual se seleccionó a *Embleya* sp. NF3 como cepa de estudio definitiva.

El análisis bioinformático del genoma de *Embleya* sp. NF3 evidenció la presencia de 5 clústeres putativos de sideróforos de los cuales el clúster 1.16 codifica la estreptobactina/griseobactina, los clústeres 1.9, 2.2 y 3.2 podrían codificar para sideróforos con estructura química potencialmente novedosa y, el clúster 1.8 sugiere no ser funcional.

A pesar de que el análisis *in silico* sugería la producción de 4 sideróforos por parte de la cepa NF3, en las condiciones de cultivo evaluadas en este trabajo solo se expresó la estreptobactina/griseobactina, un sideróforo de naturaleza catecolato codificado por el clúster 1.16. Por consiguiente, para producir y caracterizar químicamente los sideróforos potencialmente novedosos se sugiere expresar heterológicamente los clústeres 1.9, 2.2 y 3.2 con el fin de que su expresión no dependa del sistema de regulación de la cepa NF3.

La biblioteca genómica de *Embleya* sp. NF3 construida en este estudio representa una herramienta que facilitará la clonación y expresión heteróloga no sólo de clústeres putativos de sideróforos sino de CGB con potencial para producir compuestos bioactivos. El alto nivel de cobertura y el identificar por medio de PCR los 11 genes de interés indica que la biblioteca es funcional.

8. PERSPECTIVAS

- ✓ Expresar heterológamente los clústeres 1.9, 2.2 y 3.2 codificados por *Embleya* sp. NF3.
- ✓ Determinar la estructura química de los sideróforos potencialmente novedosos producidos por *Embleya* sp. NF3 por resonancia magnética nuclear.
- ✓ Evaluar las posibles actividades del o de los sideróforos potencialmente novedosos identificados.
- ✓ Desarrollar un hospedero heterólogo para la expresión de sideróforos.
- ✓ Realizar un análisis evolutivo de los clústeres de sideróforo NIS en el género *Embleya* y filo *Actinobacteria*.

9. REFERENCIAS

- Albarano, L., Esposito, R., Ruocco, N., & Costantini, M. (2020). Genome mining as new challenge in natural products discovery. *Marine Drugs*, 18(4), 199. <https://doi.org/10.3390/md18040199>
- Alós J.I. (2015). Resistencia bacteriana a los antibióticos: una crisis global [Antibiotic resistance: A global crisis]. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 33(10), 692–699. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2014.10.004>
- Arnou, L. E. (1937). Colorimetric determination of the components of 3,4 dihydroxyphenylalanine tyrosine mixtures. *Journal of Biology and Chemistry*, 118,531–537
- Avalos, M. (2010). Caracterización polifásica de una cepa de *Streptomyces* aislada de una región del Valle de Chalco. Tesis para optar por el grado de Químico Farmacéutico Biólogo. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Baichoo, N., & Helmann, J. D. (2002). Recognition of ADN by Fur: a reinterpretation of the Fur box consensus sequence. *Journal of Bacteriology*, 184(21), 5826–5832. <https://doi.org/10.1128/JB.184.21.5826-5832.2002>
- Bailey, D. C., Alexander, E., Rice, M. R., Drake, E. J., Mydy, L. S., Aldrich, C. C., & Gulick, A. M. (2018). Structural and functional delineation of aerobactin biosynthesis in hypervirulent *Klebsiella pneumoniae*. *The Journal of Biological Chemistry*, 293(20), 7841–7852. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA118.002798>
- Baltz R. H. (2017). Gifted microbes for genome mining and natural product discovery. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 44(4-5), 573–588. <https://doi.org/10.1007/s10295-016-1815-x>
- Barona-Gómez, F., Wong, U., Giannakopoulos, A. E., Derrick, P. J., & Challis, G. L. (2004). Identification of a cluster of genes that directs desferrioxamine biosynthesis in *Streptomyces coelicolor* M145. *Journal of the American Chemical Society*, 126(50), 16282–16283. <https://doi.org/10.1021/ja045774k>
- Basilio, A., González, I., Vicente, M. F., Gorrochategui, J., Cabello, A., González, A., & Genilloud, O. (2003). Patterns of antimicrobial activities from soil actinomycetes isolated under different conditions of pH and salinity. *Journal of Applied Microbiology*, 95(4), 814–823. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2003.02049.x>
- Behie, S. W., Bonet, B., Zacharia, V. M., McClung, D. J., & Traxler, M. F. (2017). Molecules to ecosystems: Actinomycete natural products in situ. *Frontiers in Microbiology*, 7, 2149. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.02149>
- Bérdy J. (2005). Bioactive microbial metabolites. *The Journal of Antibiotics*, 58(1), 1–26. <https://doi.org/10.1038/ja.2005.1>

Bérdy J. (2015). Microorganisms producing antibiotics. In: S. Sánchez, A.L. Demain (Eds.), *Antibiotics Current Innovations and Future Trends* (pp. 49-64). Caister Academic Press.

Bérdy J. (2012). Thoughts and facts about antibiotics: where we are now and where we are heading. *The Journal of Antibiotics*, 65(8), 385–395. <https://doi.org/10.1038/ja.2012.27>

Blin, K., Shaw, S., Kloosterman, A. M., Charlop-Powers, Z., van Wezel, G. P., Medema, M. H., & Weber, T. (2021). antiSMASH 6.0: improving cluster detection and comparison capabilities. *Nucleic Acids Research*, 49(W1), W29–W35. <https://doi.org/10.1093/nar/gkab335>

Bogdan, A. R., Miyazawa, M., Hashimoto, K., & Tsuji, Y. (2016). Regulators of iron homeostasis: New players in metabolism, cell death, and disease. *Trends in Biochemical Sciences*, 41(3), 274–286. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2015.11.012>

Brumm, P., Land, M. L., Hauser, L. J., Jeffries, C. D., Chang, Y. J., & Mead, D. A. (2015). Complete genome sequences of *Geobacillus* sp. Y412MC52, a xylan-degrading strain isolated from obsidian hot spring in Yellowstone National Park. *Standards in Genomic Sciences*, 10, 81. <https://doi.org/10.1186/s40793-015-0075-0>

Burrell, M., Hanfrey, C. C., Kinch, L. N., Elliott, K. A., & Michael, A. J. (2012). Evolution of a novel lysine decarboxylase in siderophore biosynthesis. *Molecular Microbiology*, 86(2), 485–499. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2012.08208.x>

Butler, M. S., Blaskovich, M. A., & Cooper, M. A. (2013). Antibiotics in the clinical pipeline in 2013. *The Journal of Antibiotics*, 66(10), 571–591. <https://doi.org/10.1038/ja.2013.86>

Carroll, C. S., & Moore, M. M. (2018). Ironing out siderophore biosynthesis: a review of non-ribosomal peptide synthetase (NRPS)-independent siderophore synthetases. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 53(4), 356–381. <https://doi.org/10.1080/10409238.2018.1476449>

Ceapă, C. D., Vázquez-Hernández, M., Rodríguez-Luna, S. D., Cruz Vázquez, A. P., Jiménez Suárez, V., Rodríguez-Sanoja, R., Alvarez-Buylla, E. R., & Sánchez, S. (2018). Genome mining of *Streptomyces scabrissporus* NF3 reveals symbiotic features including genes related to plant interactions. *PloS one*, 13(2), e0192618. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0192618>

Centeno-Leija, S., Vinuesa, P., Rodríguez-Peña, K., Trenado-Urbe, M., Cárdenas-Conejo, Y., Serrano-Posada, H., Rodríguez-Sanoja, R., & Sánchez, S. (2016). Draft genome sequence of an endophytic Actinoplanes species, encoding uncommon trans-acyltransferase polyketide synthases. *Genome Announcements*, 4(2), e00164-16. <https://doi.org/10.1128/genomeA.00164-16>

Challis G. L. (2005). A widely distributed bacterial pathway for siderophore biosynthesis independent of nonribosomal peptide synthetases. *ChemBiochem : a European Journal of Chemical Biology*, 6(4), 601–611. <https://doi.org/10.1002/cbic.200400283>

Cooper, M. A., & Shlaes, D. (2011). Fix the antibiotics pipeline. *Nature*, 472(7341), 32. <https://doi.org/10.1038/472032a>

Cragg, G. M., & Newman, D. J. (2013). Natural products: a continuing source of novel drug leads. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1830(6), 3670–3695. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2013.02.008>

Cruz-Morales, P., Ramos-Aboites, H. E., Licona-Cassani, C., Selem-Mójica, N., Mejía-Ponce, P. M., Souza-Saldívar, V., & Barona-Gómez, F. (2017). Actinobacteria phylogenomics, selective isolation from an iron oligotrophic environment and siderophore functional characterization, unveil new desferrioxamine traits. *FEMS Microbiology Ecology*, 93(9), fix086. <https://doi.org/10.1093/femsec/fix086>

de Carvalho, C. C., & Fernandes, P. (2014). Siderophores as "Trojan Horses": tackling multidrug resistance?. *Frontiers in Microbiology*, 5, 290. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00290>

De Serrano L. O. (2017). Biotechnology of siderophores in high-impact scientific fields. *Biomolecular Concepts*, 8(3-4), 169–178. <https://doi.org/10.1515/bmc-2017-0016>

Demain, A. L., & Sanchez, S. (2009). Microbial drug discovery: 80 years of progress. *The Journal of antibiotics*, 62(1), 5–16. <https://doi.org/10.1038/ja.2008.16>

Desferal®. (s.f). Novartis
<http://www.pharma.us.novartis.com/cs/www.pharma.us.novartis.com/product/pi/pdf/desferal.pdf> [Acceso 10 septiembre 2021]

Dinesh, R., Srinivasan, V., T E, S., Anandaraj, M., & Srmbikkal, H. (2017). Endophytic actinobacteria: Diversity, secondary metabolism and mechanisms to unsilence biosynthetic gene clusters. *Critical Reviews in Microbiology*, 43(5), 546–566. <https://doi.org/10.1080/1040841X.2016.1270895>

Drake, E. J., Nicolai, D. A., & Gulick, A. M. (2006). Structure of the EntB multidomain nonribosomal peptide synthetase and functional analysis of its interaction with the EntE adenylation domain. *Chemistry & Biology*, 13(4), 409–419. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2006.02.005>

Escolar, L., Pérez-Martín, J., & de Lorenzo, V. (1999). Opening the iron box: transcriptional metalloregulation by the Fur protein. *Journal of bacteriology*, 181(20), 6223–6229. <https://doi.org/10.1128/JB.181.20.6223-6229.1999>

Fadiji, A. E., & Babalola, O. O. (2020). Exploring the potentialities of beneficial endophytes for improved plant growth. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 27(12), 3622–3633. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2020.08.002>

Fan, D., & Fang, Q. (2021). Siderophores for medical applications: Imaging, sensors, and therapeutics. *International Journal of Pharmaceutics*, 597, 120306. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2021.120306>

Fetroja®. (s.f). Shionogi. <https://www.shionogi.com/content/dam/shionogi/si/products/pdf/fetroja.pdf> [Acceso 10 septiembre 2021]

Fetroja® (Cefiderocol). (s.f). Fetroja® (Cefiderocol). <https://www.fetroja.com> [Acceso 10 septiembre 2021]

Fuangthong, M., & Helmann, J. D. (2003). Recognition of ADN by three ferric uptake regulator (Fur) homologs in *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology*, 185(21), 6348–6357. <https://doi.org/10.1128/JB.185.21.6348-6357.2003>

Glazer, A. N., & Nikaido, H. (2007). *Microbial biotechnology: Fundamentals of applied microbiology*. (2^a ed.). Cambridge: Cambridge University Press.

Gowda, H., Ivanisevic, J., Johnson, C. H., Kurczy, M. E., Benton, H. P., Rinehart, D., Nguyen, T., Ray, J., ... Siuzdak, G. (2014). Interactive XCMS Online: simplifying advanced metabolomic data processing and subsequent statistical analyses. *Analytical Chemistry*, 86(14), 6931–6939. <https://doi.org/10.1021/ac500734c>

Gubbens, J., Wu, C., Zhu, H., Filippov, D. V., Florea, B. I., Rigali, S., Overkleeft, H.S., & van Wezel, G.P. (2017). Intertwined precursor supply during biosynthesis of the catecholate-hydroxamate siderophores qinichelins in *Streptomyces* sp. MBT76. *ACS Chemical Biology*, 12(11), 2756–2766. <https://doi.org/10.1021/acscchembio.7b00597>

Guo, Y., Zheng, W., Rong, X., & Huang, Y. (2008). A multilocus phylogeny of the *Streptomyces griseus* 16S rRNA gene clade: use of multilocus sequence analysis for streptomycete systematics. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 58(Pt 1), 149–159. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.65224-0>

Guzmán-Trampe, S., Ceapa, C. D., Manzo-Ruiz, M., & Sánchez, S. (2017). Synthetic biology era: Improving antibiotic's world. *Biochemical Pharmacology*, 134, 99–113. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2017.01.015>

Guzmán-Trampe, S. M., Ikeda, H., Vinuesa, P., Macías-Rubalcava, M. L., Esquivel, B., Centeno-Leija, S., Tapia-Cabrera, S. M., ... Sanchez, S. (2020). Production of distinct labdane-type diterpenoids using a novel cryptic labdane-like cluster from *Streptomyces thermocarboxydus* K155. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 104(2), 741–750. <https://doi.org/10.1007/s00253-019-10240-3>

Guzmán-Trampe, S., Rodríguez-Sanoja, R., & Sánchez, S. (2017). Potencial y limitaciones de la minería de genomas de actinomicetos como herramienta para la identificación de clústeres de producción de metabolitos secundarios. *Revista de la Sociedad Mexicana de Biotecnología y Bioingeniería, A.C.* Vol. 20. 2017.

Guzmán-Trampe, S., Rodríguez-Peña, K., Espinosa-Gómez, A., Sánchez-Fernández, R. E., Macías-Rubalcava, M. L., Flores-Cotera, L. B., and Sánchez, S. (2015). Endophytes as a potential source of new antibiotics. In: S. Sánchez, A.L. Demain (Eds.), *Antibiotics Current Innovations and Future Trends*. (pp. 175-204). Caister Academic Press.

Hardoim, P. R., van Overbeek, L. S., & Elsas, J. D. (2008). Properties of bacterial endophytes and their proposed role in plant growth. *Trends in Microbiology*, 16(10), 463–471. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2008.07.008>

Himpsl, S. D., & Mobley, H. (2019). Siderophore detection using Chrome Azurol S and cross-feeding assays. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 2021, 97–108. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9601-8_10

Hirschmann, M., Grundmann, F., & Bode, H. B. (2017). Identification and occurrence of the hydroxamate siderophores aerobactin, putrebactin, avaroferrin and ochrobactin C as virulence factors from entomopathogenic bacteria. *Environmental Microbiology*, 19(10), 4080–4090. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.13845>

Hoffmann, K. M., Goncuian, E. S., Karimi, K. L., Amendola, C. R., Mojab, Y., Wood, K. M., Prussia, G. A., Nix, J., Yamamoto, M., Lathan, K., & Orion, I.W. (2020). Cofactor complexes of DesD, a model enzyme in the virulence-related NIS Synthetase Family. *Biochemistry*, 59(37), 3427–3437. <https://doi.org/10.1021/acs.biochem.9b00899>

Hug, J. J., Bader, C. D., Remškar, M., Cirnski, K., & Müller, R. (2018). Concepts and methods to access novel antibiotics from actinomycetes. *Antibiotics (Basel, Switzerland)*, 7(2), 44. <https://doi.org/10.3390/antibiotics7020044>

Hutchings, M. I., Truman, A. W., & Wilkinson, B. (2019). Antibiotics: past, present and future. *Current Opinion in Microbiology*, 51, 72–80. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2019.10.008>

Ishimaru, C. A., & Loper, J. E. (1993). Biochemical and genetic analysis of siderophores produced by plant-associated *Pseudomonas* and *Erwinia* species. In: L.L. Barton, B.C. Hemming (Eds.), *Iron Chelation in Plants and Soil Microorganisms* (pp. 27-73). ACADEMIC PRESS, INC.

Joseph, B., & Priya, R. M. (2011). Bioactive compounds from endophytes and their potential in pharmaceutical effect: A review. *American Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, 1(3), 291–309. <https://doi.org/10.3923/ajbmb.2011.291.309>

Kadi, N., & Challis, G. L. (2009). Chapter 17. Siderophore biosynthesis a substrate specificity assay for nonribosomal peptide synthetase-independent siderophore synthetases involving trapping of acyl-adenylate intermediates with hydroxylamine. *Methods in Enzymology*, 458, 431–457. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(09\)04817-4](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(09)04817-4)

Kautsar, S. A., Blin, K., Shaw, S., Navarro-Muñoz, J. C., Terlouw, B. R., van der Hoof, J., van Santen, J. A., Tracanna, V., Suarez Duran, H. G., ... Medema, M. H. (2020). MIBiG 2.0: a repository for biosynthetic gene clusters of known function. *Nucleic Acids Research*, 48(D1), D454–D458. <https://doi.org/10.1093/nar/gkz882>

Keating, T. A., Marshall, C. G., Walsh, C. T., & Keating, A. E. (2002). The structure of VibH represents nonribosomal peptide synthetase condensation, cyclization and epimerization domains. *Nature Structural Biology*, 9(7), 522–526. <https://doi.org/10.1038/nsb810>

Khan, A., Singh, P., & Srivastava, A. (2018). Synthesis, nature and utility of universal iron chelator - Siderophore: A review. *Microbiological Research*, 212-213, 103–111. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2017.10.012>

Kim, S., Chen, J., Cheng, T., Gindulyte, A., He, J., He, S., Li, Q., Shoemaker, B. A., Thiessen, P. A., Yu, B., Zaslavsky, L., Zhang, J., & Bolton, E.E. (2019). PubChem in 2021: new data content and improved web interfaces. *Nucleic Acids Research*, 49(D1), D1388–D1395. <https://doi.org/10.1093/nar/gkaa971>

Kjærboelling, I., Mortensen, U. H., Vesth, T., & Andersen, M. R. (2019). Strategies to establish the link between biosynthetic gene clusters and secondary metabolites. *Fungal Genetics and Biology: FG & B*, 130, 107–121. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2019.06.001>

Kong W. L., Wu X. Q., & Zhao Y. J. (2020). Effects of *Rahnella aquatilis* JZ-GX1 on Treat Chlorosis Induced by Iron Deficiency in *Cinnamomum camphora*. *J. Plant Growth Regulat*, 39, 877–887. [10.1007/s00344-019-10029-8](https://doi.org/10.1007/s00344-019-10029-8)

Krause, J., & Tobin, G. (2013). Discovery, development, and regulation of natural products. using old solutions to new problems - Natural drug discovery in the 21st century. Published. <https://doi.org/10.5772/56424>

Krewulak, K. D., & Vogel, H. J. (2008). Structural biology of bacterial iron uptake. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1778(9), 1781–1804. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2007.07.026>

Kurth, C., Kage, H., & Nett, M. (2016). Siderophores as molecular tools in medical and environmental applications. *Organic & Biomolecular Chemistry*, 14(35), 8212–8227. <https://doi.org/10.1039/c6ob01400c>

Kusari, S., Hertweck, C., & Spiteller, M. (2012). Chemical ecology of endophytic fungi: origins of secondary metabolites. *Chemistry & Biology*, 19(7), 792–798. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2012.06.004>

Lautru, S., & Challis, G. L. (2004). Substrate recognition by nonribosomal peptide synthetase multi-enzymes. *Microbiology (Reading, England)*, 150(Pt 6), 1629–1636. <https://doi.org/10.1099/mic.0.26837-0>

Lee, J. H., & Holmes, R. K. (2000). Characterization of specific nucleotide substitutions in DtxR-specific operators of *Corynebacterium diphtheriae* that dramatically affect DtxR binding, operator function, and promoter strength. *Journal of Bacteriology*, 182(2), 432–438. <https://doi.org/10.1128/JB.182.2.432-438.2000>

Lee, N., Hwang, S., Kim, J., Cho, S., Palsson, B., & Cho, B. K. (2020). Mini review: Genome mining approaches for the identification of secondary metabolite biosynthetic gene clusters in *Streptomyces*. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, 18, 1548–1556. <https://doi.org/10.1016/j.csbj.2020.06.024>

Li, Y., Zhang, C., Liu, C., Ju, J., & Ma, J. (2018). Genome Sequencing of *Streptomyces atratus* SCSIOZH16 and Activation Production of Nocardamine via Metabolic Engineering. *Frontiers in Microbiology*, 9, 1269. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01269>

Lohman, J. R., Ma, M., Cuff, M. E., Bigelow, L., Bearden, J., Babnigg, G., Joachimiak, A., Phillips, G. N., Jr, & Shen, B. (2014). The crystal structure of BlmI as a model for nonribosomal peptide synthetase peptidyl carrier proteins. *Proteins*, 82(7), 1210–1218. <https://doi.org/10.1002/prot.24485>

Madigan, M., Martinko, J., Bender, D., Buckley, D., & Stahl, D. (2015). *Brock: Biología de los microorganismos*. (14th ed.). Pearson.

Marcos-Torres, F. J., Maurer, D., Juniar, L., & Griese, J. J. (2021). The bacterial iron sensor IdeR recognizes its DNA targets by indirect readout. *Nucleic Acids Research*, 49(17), 10120–10135. <https://doi.org/10.1093/nar/gkab711>

Marmur, J. (1961). A procedure for the isolation of deoxyribonucleic acid from microorganisms. *Journal of Molecular Biology*, 3(2), 208–IN1. [https://doi.org/10.1016/s0022-2836\(61\)80047-8](https://doi.org/10.1016/s0022-2836(61)80047-8)

Martens, E., & Demain, A. L. (2017). The antibiotic resistance crisis, with a focus on the United States. *The Journal of Antibiotics*, 70(5), 520–526. <https://doi.org/10.1038/ja.2017.30>

Martinez-Klimova, E., Rodríguez-Peña, K., & Sánchez, S. (2017). Endophytes as sources of antibiotics. *Biochemical Pharmacology*, 134, 1–17. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2016.10.010>

Matsumoto, A., & Takahashi, Y. (2017). Endophytic actinomycetes: promising source of novel bioactive compounds. *The Journal of Antibiotics*, 70(5), 514–519. <https://doi.org/10.1038/ja.2017.20>

Matsuo, Y., Kanoh, K., Jang, J.H., Adachi, K., Matsuda, S., Miki, O., Kato, T., & Shizuri, Y. (2011). Streptobactin, a tricatchol-type siderophore from marine-derived *Streptomyces* sp. YM5-799. *Journal of Natural Products*, 74(11), 2371–2376. <https://doi.org/10.1021/np200290j>

May, J. J., Kessler, N., Marahiel, M. A., & Stubbs, M. T. (2002). Crystal structure of DhbE, an archetype for aryl acid activating domains of modular nonribosomal peptide synthetases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(19), 12120–12125. <https://doi.org/10.1073/pnas.182156699>

Medema, M. H., Blin, K., Cimermancic, P., de Jager, V., Zakrzewski, P., Fischbach, M. A., Weber, T., Takano, E., & Breitling, R. (2011). antiSMASH: rapid identification, annotation and analysis of secondary metabolite biosynthesis gene clusters in bacterial and fungal genome sequences. *Nucleic Acids Research*, 39(Web Server issue), W339–W346. <https://doi.org/10.1093/nar/gkr466>

Messaoudi, O., Wink, J., & Bendahou, M. (2020). Diversity of actinobacteria isolated from date palms rhizosphere and saline environments: isolation, identification and biological activity evaluation. *Microorganisms*, 8(12), 1853. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8121853>

Miethke, M., Kraushaar, T., & Marahiel, M. A. (2013). Uptake of xenosiderophores in *Bacillus subtilis* occurs with high affinity and enhances the folding stabilities of substrate binding proteins. *FEBS letters*, 587(2), 206–213. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2012.11.027>

Mike, L. A., Smith, S. N., Sumner, C. A., Eaton, K. A., & Mobley, H. L. (2016). Siderophore vaccine conjugates protect against uropathogenic *Escherichia coli* urinary tract infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 113(47), 13468–13473. <https://doi.org/10.1073/pnas.1606324113>

Miller, B. R., Drake, E. J., Shi, C., Aldrich, C. C., & Gulick, A. M. (2016). Structures of a nonribosomal peptide synthetase module bound to MbtH-like proteins support a highly dynamic domain architecture. *The Journal of Biological Chemistry*, 291(43), 22559–22571. <https://doi.org/10.1074/jbc.M116.746297>

Nair, S., & Abraham, J. (2020). Natural products from actinobacteria for drug discovery. In: Patra J., Shukla A., Das G. (Eds.), *Advances in Pharmaceutical Biotechnology* (pp. 333-363). Springer.

Nikolic, V., Savic, I., Savic, I., Nikolic, L., Stankovic, M., & Marinkovic, V. (2011). Paclitaxel as an anticancer agent: isolation, activity, synthesis and stability. *Open Medicine*, 6(5), 527–536. <https://doi.org/10.2478/s11536-011-0074-5>

Nishat, S. A., & Alam, M. M. (2017). Screening of antibiotic-producing *Streptomyces* from marine sediments of Bangladesh. *Bangabandhu Sheikh Mujib Medical University Journal*, 10(4), 255. <https://doi.org/10.3329/bsmmuj.v10i4.34403>

O'Neill, J. (2014). Antimicrobial resistance: tackling a crisis for the health and wealth of nations. *Review on Antimicrobial Resistance*. https://www.jpamr.eu/wp-content/uploads/2014/12/AMR-Review-Paper-Tackling-a-crisis-for-the-health-and-wealth-of-nations_1-2.pdf

Okonechnikov, K., Golosova, O., Fursov, M., & UGENE team. (2012). Unipro UGENE: a unified bioinformatics toolkit. *Bioinformatics (Oxford, England)*, 28(8), 1166–1167. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts091>

Osman, Y., Gebreil, A., Mowafy, A. M., Anan, T. I., & Hamed, S. M. (2019). Characterization of *Aspergillus niger* siderophore that mediates bioleaching of rare earth elements from phosphorites. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 35(6), 93. <https://doi.org/10.1007/s11274-019-2666-1>

Patridge, E., Gareiss, P., Kinch, M. S., & Hoyer, D. (2016). An analysis of FDA-approved drugs: natural products and their derivatives. *Drug Discovery Today*, 21(2), 204–207. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2015.01.009>

Patzer, S. I., & Braun, V. (2010). Gene cluster involved in the biosynthesis of griseobactin, a catechol-peptide siderophore of *Streptomyces* sp. ATCC 700974. *Journal of Bacteriology*, 192(2), 426–435. <https://doi.org/10.1128/JB.01250-09>

Pluháček, T., Lemr, K., Ghosh, D., Milde, D., Novák, J., & Havlíček, V. (2016). Characterization of microbial siderophores by mass spectrometry. *Mass Spectrometry Reviews*, 35(1), 35–47. <https://doi.org/10.1002/mas.21461>

Prakash, P., Yellaboina, S., Ranjan, A., & Hasnain, S. E. (2005). Computational prediction and experimental verification of novel IdeR binding sites in the upstream sequences of *Mycobacterium tuberculosis* open reading frames. *Bioinformatics (Oxford, England)*, 21(10), 2161–2166. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bti375>

Qian, Y., Lee, J. H., & Holmes, R. K. (2002). Identification of a DtxR-regulated operon that is essential for siderophore-dependent iron uptake in *Corynebacterium diphtheriae*. *Journal of Bacteriology*, 184(17), 4846–4856. <https://doi.org/10.1128/jb.184.17.4846-4856.2002>

Ribeiro, M., & Simões, M. (2019). Advances in the antimicrobial and therapeutic potential of siderophores. *Environmental Chemistry Letters*, 17(4), 1485–1494. <https://doi.org/10.1007/s10311-019-00887-9>

Rodriguez, G. M., Voskuil, M. I., Gold, B., Schoolnik, G. K., & Smith, I. (2002). ideR, An essential gene in *Mycobacterium tuberculosis*: role of IdeR in iron-dependent gene expression, iron metabolism, and oxidative stress response. *Infection and Immunity*, 70(7), 3371–3381. <https://doi.org/10.1128/IAI.70.7.3371-3381.2002>

Rodríguez-Peña K. (2020). Búsqueda de metabolitos secundarios de interés farmacológico en microorganismos endófitos de *Amphipterygium adstringens*. Tesis para optar por el grado de Doctora. Universidad Nacional Autónoma de México.

Rodríguez-Peña, K., Macías-Rubalcava, M. L., Rocha-Zavaleta, L., Trenado-Uribe, M., Rodríguez-Sanoja, R., & Sanchez, S. (2018). *Streptomyces scabrissporus*, an endophyte isolated from *Amphipterygium adstringens* as producer of an anthracycline active against different cancer cell lines. *Global Drugs and Therapeutics*, 3(5). <https://doi.org/10.15761/gdt.1000158>

Rosengarten, R. D., Beltran, P. R., & Shaulsky, G. (2015). A deep coverage *Dictyostelium discoideum* genomic ADN library replicates stably in *Escherichia coli*. *Genomics*, 106(4), 249–255. <https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2015.05.008>

Rudolf, M., Stevanovic, M., Kranzler, C., Pernil, R., Keren, N., & Schleiff, E. (2016). Multiplicity and specificity of siderophore uptake in the cyanobacterium *Anabaena* sp. PCC 7120. *Plant Molecular Biology*, 92(1-2), 57–69. <https://doi.org/10.1007/s11103-016-0495-2>

Ruiz, B., Chávez, A., Forero, A., García-Huante, Y., Romero, A., Sánchez, M., Rocha, D., Sánchez, B., Rodríguez-Sanoja, R., Sánchez, S., & Langley, E. (2010). Production of microbial secondary metabolites: regulation by the carbon source. *Critical Reviews in Microbiology*, 36(2), 146–167. <https://doi.org/10.3109/10408410903489576>

Rutledge, P. J., & Challis, G. L. (2015). Discovery of microbial natural products by activation of silent biosynthetic gene clusters. *Nature reviews. Microbiology*, 13(8), 509–523. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3496>

Saha, M., Sarkar, S., Sarkar, B., Sharma, B. K., Bhattacharjee, S., & Tribedi, P. (2016). Microbial siderophores and their potential applications: a review. *Environmental Science and Pollution Research International*, 23(5), 3984–3999. <https://doi.org/10.1007/s11356-015-4294-0>

Sambrook, J., Fritsch, E. F., & Maniatis, T. (1989). *Molecular cloning: A laboratory manual*. (2^a ed.). Cold Spring Harbor.

Salomone-Stagni, M., Bartho, J. D., Polsinelli, I., Bellini, D., Walsh, M. A., Demitri, N., & Benini, S. (2018). A complete structural characterization of the desferrioxamine E biosynthetic pathway from the fire blight pathogen *Erwinia amylovora*. *Journal of Structural Biology*, 202(3), 236–249. <https://doi.org/10.1016/j.jsb.2018.02.002>

Schalk, I. J., Mislin, G. L., & Brillet, K. (2012). Structure, function and binding selectivity and stereoselectivity of siderophore-iron outer membrane transporters. *Current Topics in Membranes*, 69, 37–66. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-394390-3.00002-1>

Schmitt, M. P., Predich, M., Doukhan, L., Smith, I., & Holmes, R. K. (1995). Characterization of an iron-dependent regulatory protein (IdeR) of *Mycobacterium tuberculosis* as a functional homolog of the diphtheria toxin repressor (DtxR) from *Corynebacterium diphtheriae*. *Infection and Immunity*, 63(11), 4284–4289. <https://doi.org/10.1128/iai.63.11.4284-4289.1995>

Schwyn, B., & Neilands, J. B. (1987). Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. *Analytical Biochemistry*, 160(1), 47–56. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(87\)90612-9](https://doi.org/10.1016/0003-2697(87)90612-9)

Seyoum, Y., Baye, K., & Humblot, C. (2021). Iron homeostasis in host and gut bacteria-a complex interrelationship. *Gut Microbes*, 13. <https://doi.org/10.1080/19490976.2021.1874855>

Sharma, M. (2018). Endophytic microorganisms: Their role in plant growth and crop improvement. In: R. Prasas, S. Gill, N. Tuteja (Eds.), *New and future developments in microbial biotechnology and bioengineering: Crop improvement through microbial biotechnology*. (pp. 391-413). Elsevier.

Singh, R., & Dubey, A. K. (2018). Diversity and applications of endophytic actinobacteria of plants in special and other ecological niches. *Frontiers in Microbiology*, 9, 1767. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01767>

Singh, T. A., Passari, A. K., Jajoo, A., Bhasin, S., Gupta, V. K., Hashem, A., Alqarawi, A. A., & Abd Allah, E. F. (2021). Tapping into actinobacterial genomes for natural product discovery. *Frontiers in Microbiology*, 12, 655620. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.655620>

Stumm, W., & Morgan, J. J. (1995). Metal ions in aqueous solution: Aspects of coordination chemistry. In: W. Stumm, J.J. Morgan (Eds.), *Aquatic Chemistry: Chemical Equilibria and Rates in Natural Waters*. (3rd ed., pp. 252-348). Wiley.

Su, Q., Xu, G., Guan, T., Que, Y., & Lu, H. (2016). Mass spectrometry-derived systems biology technologies delineate the system's biochemical applications of siderophores. *Mass Spectrometry Reviews*, 37(2), 188–201. <https://doi.org/10.1002/mas.21513>

Tanui, C. K., Shyntum, D. Y., Priem, S. L., Theron, J., & Moleleki, L. N. (2017). Influence of the ferric uptake regulator (Fur) protein on pathogenicity in *Pectobacterium carotovorum* subsp. *brasiliense*. *PloS One*, 12(5), e0177647. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0177647>

Tarry, M. J., Haque, A. S., Bui, K. H., & Schmeing, T. M. (2017). X-Ray crystallography and electron microscopy of cross- and multi-module nonribosomal peptide synthetase proteins reveal a flexible architecture. *Structure (London, England: 1993)*, 25(5), 783–793.e4. <https://doi.org/10.1016/j.str.2017.03.014>

Temraz, S., Santini, V., Musallam, K., & Taher, A. (2014). Iron overload and chelation therapy in myelodysplastic syndromes. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 91(1), 64–73. <https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2014.01.006>

Terra, L., Ratcliffe, N., Castro, H. C., Vicente, A., & Dyson, P. (2021). Biotechnological potential of *Streptomyces siderophores* as new antibiotics. *Current Medicinal Chemistry*, 28(7), 1407–1421. <https://doi.org/10.2174/0929867327666200510235512>

Thirumurugan, D., Cholarajan, A., Raja, S., & Vijayakumar, R. (2018). An introductory chapter: Secondary metabolites. In: R. Vijayakumar, S. Raja (Eds.), *Secondary Metabolites: Sources and Applications* (pp. 1-21). InTech - Open Science.

Tierrafría, V. (2010). Determinación de la especificidad de los transportadores de ferroxaminas B y E *Streptomyces coelicolor* mediante Ingeniería Genética: repercusión en el proceso biotecnológico de purificación de desferroxamina B (Desferal®). Tesis para optar por el grado de Maestría. Universidad Nacional Autónoma de México.

Tunca, S., Barreiro, C., Sola-Landa, A., Coque, J. J., & Martín, J. F. (2007). Transcriptional regulation of the desferrioxamine gene cluster of *Streptomyces coelicolor* is mediated by binding of DmdR1 to an iron box in the promoter of the desA gene. *The FEBS journal*, 274(4), 1110–1122. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2007.05662.x>

Tyc, O., Song, C., Dickschat, J. S., Vos, M., & Garbeva, P. (2017). The ecological role of volatile and soluble secondary metabolites produced by soil bacteria. *Trends in Microbiology*, 25(4), 280–292. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2016.12.002>

Ueki, M., Suzuki, R., Takamatsu, S., Takagi, H., Uramoto, M., Ikeda, H., & Osada, H. (2009). Nocardamin production by *Streptomyces avermitilis*. *Actinomycetologica*, 23(2), 34–39. <https://doi.org/10.3209/saj.saj230203>

van Bergeijk, D. A., Terlouw, B. R., Medema, M. H., & van Wezel, G. P. (2020). Ecology and genomics of Actinobacteria: new concepts for natural product discovery. *Nature Reviews. Microbiology*, 18(10), 546–558. <https://doi.org/10.1038/s41579-020-0379-y>

Vasavada, S. H., Thumar, J. T. & Singh, S. P. (2006). Secretion of a potent antibiotic by salt-tolerant and alkaliphilic actinomycete *Streptomyces sannanensis* strain RJT-1. *Current Science*, 91, 1393-1397.

Vázquez-Hernandez, M., Ceapa, C. D., Rodríguez-Luna, S. D., Rodríguez-Sanoja, R., & Sánchez, S. (2017b). Correction for Vazquez-Hernandez et al., "Draft genome sequence of *Streptomyces scabrisporus* NF3, an endophyte isolated from

Amphipterygium adstringens". Genome Announcements, 5(24), e00583-17. <https://doi.org/10.1128/genomeA.00583-17>

Vázquez-Hernández, M. (2017a). Minería genómica de una cepa de *Streptomyces* sp., aislada del cuachalalate: Alternativa para la búsqueda de nuevos compuestos con actividad farmacéutica. Tesis para optar por el grado de Maestría. Universidad Nacional Autónoma de México.

Velásquez, J., & Wray, A. A. (Actualizado 31 de mayo de 2021). Deferoxamina. StatPearls Publishing. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK557654/>

Ventola C. L. (2015). The antibiotic resistance crisis: part 1: causes and threats. P & T: a peer-reviewed journal for formulary management, 40(4), 277–283.

Vogel, A. E. (1987). Class reactions (reactions for functional groups) Elementary Practical Organic Chemistry. pp. 190–194. CBS Publishing.

WHO. (2019). No podemos esperar: asegurar el futuro contra las infecciones farmacorresistentes. Informe para el secretario general de las naciones unidas. https://www.who.int/antimicrobial-resistance/interagency-coordination-group/IACG_final_report_ES.pdf?ua=1. [Acceso 10 septiembre 2021]

Wohlleben, W., Mast, Y., Stegmann, E., & Ziemert, N. (2016). Antibiotic drug discovery. Microbial Biotechnology, 9(5), 541–548. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.12388>

Yan, N., Marschner, P., Cao, W., Zuo, C., & Qin, W. (2015). Influence of salinity and water content on soil microorganisms. International Soil and Water Conservation Research, 3(4), 316–323. <https://doi.org/10.1016/j.iswcr.2015.11.003>

Zhanel, G. G., Golden, A. R., Zelenitsky, S., Wiebe, K., Lawrence, C. K., Adam, H. J., Idowu, T., Domalaon, R., ... Karlowsky, J. A. (2019). Cefiderocol: A siderophore cephalosporin with activity against carbapenem-resistant and multidrug-resistant gram-negative Bacilli. Drugs, 79(3), 271–289. <https://doi.org/10.1007/s40265-019-1055-2>

Zhu, W., Winter, M. G., Spiga, L., Hughes, E. R., Chanin, R., Mulgaonkar, A., Pennington, J., Maas, M., Behrendt, C. L., Kim, J., Sun, X., Beiting, D. P., Hooper, L. V., & Winter, S. E. (2020). Xenosiderophore Utilization Promotes Bacteroides thetaiotaomicron Resilience during Colitis. Cell Host & Microbe, 27(3), 376–388.e8. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2020.01.010>

Ziemert, N., Weber, T., & Medema, M. H. (2019). Genome mining approaches to bacterial natural product discovery. In H-W. B. Liu, & T. P. Begley (Eds.), Comprehensive Natural Products III (Third Edition) (Vol. 6, pp. 19-33). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-409547-2.14627-X>

10. ANEXOS

Anexo 1: Medios de cultivo, buffers y soluciones

Yeast Maltose Glucose (YMG)

Extracto de levadura	4 g/L
Extracto de malta	10 g/L
Glucosa	4 g/L
Agar	15 g/L

Yeast Extract-Malt Extract (YEME)

Extracto de levadura	3 g/L
Extracto de malta	3 g/L
Peptona	5 g/L
Glucosa	4 g/L
Sacarosa	150 g/L

Luria-Bertani (LB)

Extracto de levadura	5 g/L
NaCl	8 g/L
Bacto-Triptona	10 g/L

Medio CMM

Sacarosa	10 g/L
TRIS base	1.2 g/L
Sulfato de magnesio heptahidratado	250 mg/L
Cloruro de litio	5 mg/L
Extracto de levadura	2 g/L
Cloruro de amonio	1 g/L
Casaminoácidos	4 g/L
Agar	15 g/L

Minimal liquid medium (NMMP)

Sulfato de amonio	2 g
Casaminoácidos	5 g
Sulfato de magnesio heptahidratado	0.6 g
¹ Solución de elementos menores	1 mL
Agua destilada	800 mL

¹Solución de elementos menores:

Sulfato de zinc heptahidratado	1 g/L
Sulfato de hierro heptahidratado	1 g/L
Cloruro de manganeso (II) tetrahidratado	1 g/L
Cloruro de calcio anhidro	1 g/L

Dispensar en alícuotas de 80 mL y esterilizar a 121°C y 15 lb por 20 minutos en autoclave

Al momento de usar adicionar a las alícuotas:

Buffer NaH ₂ PO ₄ / K ₂ HPO ₄ (0.1 M, pH 6.8)	15 mL
Fuente de carbono (20%)	2.5 mL
Cualquier factor de crecimiento requerido	2.5 mL

Caldo Terrific (TB)

TB-A:

Extracto de levadura	24 g
Bacto-Tripton	12 g
Glicerol	4 mL
Agua destilada	900 mL

TB-B: Buffer de fosfato de potasio

KH ₂ PO ₄	2.3 g
K ₂ HPO ₄	16.4 g
Agua destilada	100 mL

Preparar y esterilizar por separado TB-A y TB-B. Para preparar el TB mezclar 900 mL de TB-A con 100 mL de TB-B.

Agar Cromo azurol S (CAS)

Lavar el material de vidrio con HCL 6M para eliminar los elementos traza

Blue dye:

- Solución 1: Disolver 65 mg de CAS en 50 mL de agua destilada
- Solución 2: Disolver 27 mg de FeCl₃.6H₂O en 10 mL de HCl 10 mM
- Solución 3: Disolver 72.9 mg de HDTMA en 40 mL de agua destilada

Mezcle la solución 1 con 9 mL de la Solución 2. Luego adicionar la solución 3 y mezclar sin hacer burbujas. Esterilizar y almacenar en un recipiente de plástico en oscuridad.

Soluciones para el agar:

Solución 1: Stock de solución de sal para el medio mínimo 9 (MM9): Disolver 15 g de KH₂PO₄, 25 g de NaCl y 50 g de NH₄Cl en 500 mL de agua destilada

Solución 2: Stock de glucosa 2.5 M: Disolver 45 g de glucosa en 100 mL de agua destilada

Solución 3: Solución de casaminoácidos: Disolver 3 g de casaminoácidos en 27 mL de agua destilada

Esterilizar las soluciones 1 y 3 por separado. Esterilizar por filtración la solución 3.

Preparación del agar CAS:

1. Agregar 100 mL de solución de sal para MM9 a 750 mL de agua destilada
2. Disolver 22,4 g de piperazina-N, N'-bis (ácido 2-etanosulfónico) PIPES. lentamente el pH a 6.8 con NaOH No exceder de 6.8 ya que esto hará que la solución se vuelva verde.
3. Agregar 15 g de agar Bacto
4. Esterilizar y enfriar a 50 °C
5. Añadir 30 mL de solución de casaminoácidos y 20 mL del stock de glucosa a la mezcla MM9/PIPES.
6. Adicionar lentamente 100 mL de solución blue dye a lo largo de la pared de vidrio con suficiente agitación para mezclar bien.
7. Verter el medio en placas de Petri

Solución I: Buffer Glucosa, Tris, EDTA (Buffer GTE)

Glucosa	50 mM
Tris HCl	25 mM
EDTA	10 mM

Ajustar a pH 7.0 y esterilizar. Adicionar lisozima 4mg/mL antes de usar la solución.

Solución II

SDS	2%
NaOH	0.4 N

Mezclar volúmenes iguales de SDS y el NaOH en el momento de usar.

Solución III

Acetato de potasio 5M	60 mL
Ácido acético glacial	11.5 mL
Agua	28.5 mL

Anexo 2: Protocolo del empaquetamiento de las clonas con el fósido Copy Control pCC1FOS™ o pCC2FOS™

1. El día de las reacciones de envasado, inocular 50 mL de caldo LB + MgSO₄ 10 mM + 0.2% Maltosa con 0.5 mL del cultivo nocturno EPI300-T1^R. Incubar el matraz a 37 °C en agitación hasta una D.O_{600nm} entre 0.8-1.0 (~ 2 h). Almacenar las células a 4 °C hasta que se necesiten. Las células pueden almacenarse hasta 72 h a 4 °C.
2. Descongelar, en hielo, un tubo de extractos de empaque MaxPlax Lambda para cada 10 µL de reacción de ligación.
3. Cuando los extractos estén descongelados, transferir inmediatamente 25 µL de cada extracto a un segundo tubo de 1.5 mL y colocarlo en hielo. Devolver los 25 µL restantes del extracto de embalaje MaxPlax a -70 °C para usar en el paso 7.
4. Agregar 10 µL de la reacción de ligación a cada 25 µL de extractos descongelados que se encuentren en hielo.
5. Mezclar pipeteando las soluciones varias veces. Evitar la introducción de burbujas de aire. Centrifugar brevemente los tubos para llevar todo el líquido al fondo.
6. Incubar las reacciones de envasado a 30 °C durante 2 horas.
7. Después de la incubación, agregar los 25 µL restantes de MaxPlax Lambda Extracto de empaque del paso 3 a cada tubo.
8. Incubar las reacciones durante 2 horas más a 30 °C.
9. Al final de la segunda incubación, agregar tampón de dilución de fagos (PDB) para llegar a un volumen final de 1 mL en cada tubo y mezclar suavemente. Agregar 25 µL de cloroformo a cada tubo. Mezclar suavemente y almacenar a 4 °C. Se puede formar un precipitado viscoso después de la adición del cloroformo, pero este precipitado no interfiere con la construcción de la biblioteca.

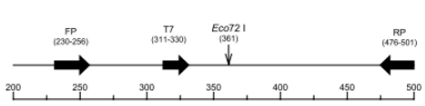
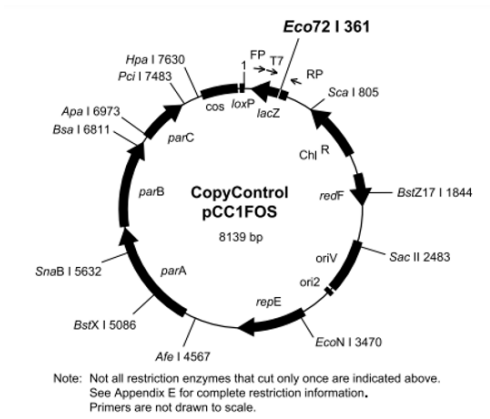
Anexo 3: Protocolo para la extracción de los fósmidos

1. Inocular 15 mL de precultivo en TB + cloranfenicol 12.5 µg/mL e incubar en agitación por 16 h a 37 °C.
2. Tomar 12 mL del precultivo en un tubo falcon de 15 mL y centrifugar a 6,000 rpm por 10 min. Descartar el sobrenadante con cuidado que no queden restos de medio.
3. Lavar el pellet bacteriano con 5 mL de agua destilada estéril y centrifugar a 6,000 rpm por 10 min. Descartar el sobrenadante cuidando que no quede agua.
4. Adicionar 1.2 mL de la solución I, agitar suave e incubar a temperatura ambiente por 5 min.
5. Adicionar 2.4 mL de la solución II, mezclar por inversión e incubar en hielo por 5 min.
6. Adicionar 1.8 mL de la solución III, mezclar por inversión e incubar en hielo por 10 min. Centrifugar a 10,000 rpm por 18 minutos.
7. Traspasar el sobrenadante a un tubo falcon de 15 mL y añadir 1 volumen de isopropanol. Incubar por 30 minutos a temperatura ambiente.
8. Centrifugar a 10,000 rpm por 15 min. Lavar el botón con 1 volumen de etanol 70%.
9. Centrifugar a 10,000 rpm por 15 min y desechar el sobrenadante.
10. Dejar secar el botón y resuspender en 800 µL de buffer TE.
11. Añadir RNAsa a una concentración final de 20 µg/mL e incubar a 37 °C por 1 h.
12. Adicionar 1 volumen de fenol:cloroformo y centrifugar a 10,000 rpm por 5 min.
13. Recuperar la fase acuosa y adicionar 1 volumen de cloroformo. Centrifugar a 10,000 rpm por 5 min.
14. Adicionar NaCl a una concentración final de 100 mM y 2.1 volúmenes de etanol absoluto. Incubar a -20 °C por 30 min.
15. Centrifugar a 10,000 rpm por 15 min. Lavar el botón con 1mL de etanol 70%.
16. Repetir el paso 15.
17. Centrifugar a 10,000 rpm por 15 min y descartar el sobrenadante.
18. Dejar secar el botón y resuspender en 80 µL de agua Milli-Q estéril.

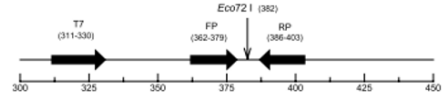
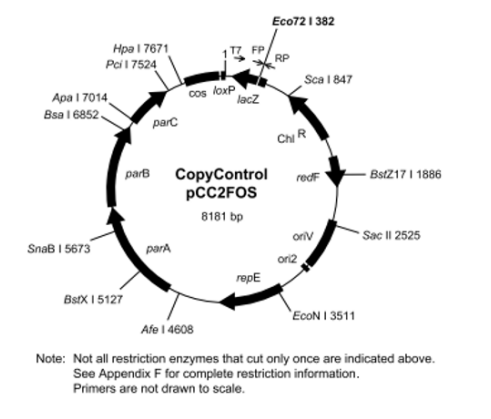
Anexo 4: Condiciones de la PCR para la amplificación de los genes de interés

Gen	Concentración de DMSO	Etapa		Temp (°C)	Tiempo	Número de ciclos
- rpoB - gyrB	5%	1 ^{ra} Etapa	Desnaturalización inicial	95	5 min	1
		2 ^{da} Etapa	Desnaturalización	95	45 s	35
			Alineamiento	60	45 s	
			Extensión	72	1:30 min	
3 ^{ra} Etapa	Extensión final	72	5 min	1		
- trpB - recA - atpD	10%	1 ^{ra} Etapa	Desnaturalización inicial	95	5 min	1
		2 ^{da} Etapa	Desnaturalización	95	45 s	35
			Alineamiento	60	45 s	
			Extensión	72	1:30 min	
3 ^{ra} Etapa	Extensión final	72	5 min	1		
- Nibomicina	10%	1 ^{ra} Etapa	Desnaturalización inicial	95	5 min	1
		2 ^{da} Etapa	Desnaturalización	95	45 s	35
			Alineamiento	60	45 s	
			Extensión	72	2:30 min	
3 ^{ra} Etapa	Extensión final	72	5 min	1		
- Clúster NIS 1.8 - Clúster NRPS 1.16 - Clúster NRPS 3.2	5%	1 ^{ra} Etapa	Desnaturalización inicial	95	5 min	1
		2 ^{da} Etapa	Desnaturalización	95	45 s	35
			Alineamiento	60	45 s	
			Extensión	72	2:30 min	
3 ^{ra} Etapa	Extensión final	72	5 min	1		
- Estefimicina - Clúster NIS 2.2	5%	1 ^{ra} Etapa	Desnaturalización inicial	95	5 min	1
		2 ^{da} Etapa	Desnaturalización	95	45 s	35
			Alineamiento	64	45 s	
			Extensión	72	2:30 min	
3 ^{ra} Etapa	Extensión final	72	5 min	1		

Anexo 5: Mapa de los plásmidos pCC1FOS™ y pCC2FOS™



FP = pCC1™ Foward Sequencing Primer 5' GGATGTGCTGCAAGGCATTAAGTTGG 3'
 RP = pCC1™ Reverse Sequencing Primer 5' CTCGTATGTTGTGGAAATTGTGAGC 3'
 T7 = T7 Promoter Primer 5' TAATACGACTCACTATAGGG 3'



...CGGGGATCCCACGTACAACGACACCTAGACACCGTGTTCCTAGGCTGTTTCCTGGTGGGAT...
 pCC2™ Foward Sequencing Primer 5' GTACAACGACACCTAGAC 3'
 pCC2™ Reverse Sequencing Primer 5' CAGGAAACGACCTAGGAA 3'
 T7 = T7 Promoter Primer 5' TAATACGACTCACTATAGGG 3'

Anexo #6: Almacenamiento y distribución de las colonias que conforman la biblioteca genómica

1. Ligación e infección # 1 con el vector pCC2FOS™

Conteo y almacenamiento 1:

Cajas de 96 pozos # 0.1 0.2 0.3 0.4 0.5 0.6

Caja de 24 pozos # 0.1

Caja	Colonias blancas	Colonias azules	Placa de 96 pozos	Placa de 24 pozos
1	6	2	A1 - A6	A1
2	5	0	A7 - A11	
3	3	1	A12, B1, B2	
4	5	1	B3 - B7	
5	3	0	B8 - B10	
6	2	0	B11 - B12	
7	7	2	C1 - C7	A2
8	9	0	C8 - D4	
9	5	2	D5 - D9	
11	6	0	D10 - E3	A3
12	5	2	E4 - E8	
13	8	0	E9 - F4	
14	6	0	F5 - F10	
15	6	0	F11 - G4	
28	6	0	C8 - D1	A6
29	6	1	D2 - D7	
30	3	1	D8 - D10	
31	13	1	D11 - E11	
32	9	0	E12 - F8	B1
33	9	0	F9 - G5	
34	9	0	G6 - H2	
35	5	0	H3 - H7	B2
36	8	2	H8 - A3	
37	6	1	A4 - A9	
38	5	0	A10 - B2	
39	9	1	B3 - B11	B3
40	6	1	B12 - C5	
41	9	1	C6 - D2	
42	2	0	D3 - D4	
43	6	0	D5 - D10	B4
44	9	0	D11 - E7	

45	5	0	E8 - E12	B5
46	5	0	F1 - F5	
47	7	0	F6 - F12	
48	9	0	G1 - G9	
49	8	1	G10 - H5	B6
51	8	2	H6 - A1	
52	1	0	A2	
53	7	0	A3 - A9	
54	12	1	A10 - B9	C2
59	8	1	D12 - E7	
60	5	0	E8 - E12	
61	6	1	F1 - F6	
62	8	3	F7 - G2	C4
66	4	2	A1 - A4	
67	5	2	A5, A7 - A9, B7	
68	8	0	A10 - B5	
69	14	3	B8 - C10	C5
70	7	2	C11 - D5	
71	7	2	D7 - E1	
72	15	0	E8 - F11	
73	9	0	F12 - G9	C6
74	6	1	G10 - H3	
75	7	1	H4, H5, H7, H8, H10 - H12	
76	9	0	A1 - A9	
77	8	1	A10 - B5	D1
78	9	1	B6 - C2	
79	9	0	C3 - C11	D2
80	10	3	C12 - D9	

Conteo y almacenamiento 2:

Cajas de 96 pozos # 11 12 13 14

Caja de 24 pozos # 11

Caja	Colonias blancas	Colonias azules	Placa de 96 pozos	Placa de 24 pozos
100	11	3	A1 - A11	A1
101	7	0	A12 - B6	
102	4	1	B7 - B10	
103	5	0	B11 - C3	
104	8	0	C4 - C11	A2
107	4	0	C12 - D3	
108	7	0	D4 - D10	

109	10	0	D11 - E8	A3
110	9	0	E9 - F5	
111	8	0	F6 - G1	
112	7	1	G2 - G8	A4
113	9	1	G9 - H5	
114	3	0	H6 - H8	
115	6	1	H9 - A2	A5
116	1	0	A3	
117	9	0	A4 - A12	
118	7	1	B1 - B7	
119	8	0	B8 - C3	
120	6	1	C4 - C9	A6
121	5	1	C10 - D2	
122	2	0	D3 - D4	
123	4	0	D5 - D8	
124	8	0	D9 - E4	
125	1	0	E5	B1
126	12	3	E6 - F5	
127	7	0	F6 - F12	
128	4	0	G1 - G4	B2
129	9	1	G5 - H1	
130	11	0	H2 - H12	B3
131	13	0	A1 - B1	
132	13	0	B2 - C2	B4
133	10	0	C3 - C12	
134	8	3	D1 - D8	
135	8	2	D9 - E4	B5
136	8	2	E5 - E12	
137	8	0	F1 - F8	
138	10	1	F9 - G6	B6
139	7	0	H7 - H1	
140	9	0	H2 - H10	
141	5	0	H11 - A3	C1
142	9	1	A4 - A12	
143	10	1	B1 - B10	
144	3	0	B11 - C1	
145	3	0	C2 - C4	
146	3	0	C5 - C7	
147	5	1	C8 - C12	

Conteo y almacenamiento 3:

Caja de 24 pozos # 31

En el conteo y almacenamiento 3 se obtuvieron 255 colonias, pero no fueron repicadas en cajas de 96 pozos. En este momento se encuentran distribuidas en 23 *pools* cada uno con un promedio de 12 colonias individuales.

2. Infección y ligación #2 con el vector pCC1FOS™

Cajas de 96 pozos # 21 22 24 25 26 27 28

Caja de 24 pozos # 21 22

Caja	Colonias blancas	Colonias azules	Placa de 96 pozos	Placa de 24 pozos
201	5	0	A1 - A5	A1
202	9	1	A6 - B2	
203	4	1	B3 - B6	
204	6	1	B7 - B12	
205	3	2	C1 - C3	
206	3	0	C4 - C6	A2
207	2	0	C7 - C8	
208	5	2	C9 - D1	
209	7	0	D2 - D8	
210	6	0	D9 - E2	
211	7	1	E3 - E9	A3
212	4	2	E10 - F1	
213	3	0	F2 - F4	
214	6	1	F5 - F10	
215	6	0	F11 - G4	A4
216	6	1	G5 - G10	
217	9	1	G11 - H7	
219	10	1	H8 - A5	A5
220	2	1	A6 - A7	
221	6	0	A8 - B1	
222	4	1	B2 - B5	
223	6	0	B6 - B11	
224	5	0	B12 - C4	A6
225	8	1	C5 - C12	
226	11	1	D1 - D11	
227	16	0	D12 - F3	B1
228	2	1	F4 - F5	

229	10	0	F6 - G3	B2
230	4	0	G4 - G7	
231	6	0	G8 - H1	
232	9	0	H2 - H10	
233	2	0	H11 - H12	
234	9	0	A1 - A9	B3
235	10	0	A10 - B7	
236	4	0	B8 - B11	
237	10	0	B12 - C9	B4
238	4	0	C10 - D1	
239	7	0	D2 - D8	
240	8	1	D9 - E4	B5
241	15	1	E5 - F7	
242	14	0	F8 - G9	B6
243	13	0	G10 - H10	
244	6	0	H11 - A4	C1
245	6	1	A5 - A10	
247	14	0	A11 - B12	
248	2	0	C1 - C2	C2
249	6	0	C3 - C8	
250	6	0	C9 - D2	C3
252	3	0	D3 - D5	
253	7	0	D6 - D12	
254	3	0	E1 - E3	
255	7	0	E4 - E10	C4
256	8	0	E11 - F6	
257	2	0	F7 - F8	
258	2	0	F9 - F10	
259	5	0	F11 - G3	C6
260	5	4	G4 - G8	
261	12	2	G10 - H9	
262	6	0	H10 - A3	D1
263	5	0	A4 - A7	
264	8	0	A8 - B3	
265	7	1	B4 - B10	
266	8	1	B11 - C6	D2
267	8	0	C7 - D2	
268	6	3	D3 - D8	
269	12	0	D9 - E8	D3
270	7	0	E9 - F3	
271	5	0	F4 - F8	

272	6	0	F9 - G2	D4
273	9	0	G3 - G11	
274	19	0	G12 - A6	D5
275	2	0	A7 - A8	
276	3	1	A9 - A11	
277	9	0	A12 - B8	D6
278	4	0	B9 - B12	
279	2	0	C1 - C2	
281	7	1	C3 - C9	
282	9	1	C10 - D6	A1
283	7	0	D7 - E1	A2
284	18	0	E2 - F7	
285	5	0	F8 - F12	
286	3	1	G1 - G3	A3
287	10	0	G4 - H1	
288	7	0	H2 - H8	
289	4	0	H9 - H12	
290	10	0	A1 - A10	A4
291	19	0	A11 - C5	
292	6	0	C6 - C11	A5
293	11	0	C12 - D10	
294	10	1	D11 - E8	
295	6	0	E9 - F2	A6
296	1	0	F3	
297	7	1	F4 - F10	
298	5	0	F11 - G3	
299	6	1	G4 - G9	
300	11	0	G10 - H8	B1
301	7	0	H9 - A3	
302	10	0	A4 - B1	B2
303	13	1	B2 - C2	
304	4	0	C3 - C6	
305	12	6	C7 - D6	
306	7	0	D7 - E1	B3
307	4	0	E2 - E5	
308	4	0	E6 - E9	
309	2	1	E10 - E11	B4
310	3	0	E12 - F2	
311	7	2	F3 - F9	
312	6	0	F10 - G3	
313	8	0	G4 - G11	