



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

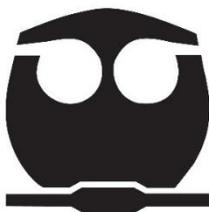
**ESTUDIO QUÍMICO DE BACTERIAS SELECTAS AISLADAS DEL
VALLE DE CUATRO CIÉNEGAS, COAHUILA MÉXICO**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

PRESENTA

JUAN CARLOS ROSAS HERNÁNDEZ



CDMX.

2021



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: DRA. ISABEL DEL CARMEN RIVERO CRUZ
VOCAL: DR. MARIO ALBERTO FIGUEROA SALDÍVAR
SECRETARIO: DR. ABRAHAM MADARIAGA MAZÓN
1er. SUPLENTE: DRA. BERENICE OVALLE MAGALLANES
2do. SUPLENTE: DRA. MARÍA ROSA GONZÁLEZ TEPALE

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

LABORATORIO 125, EDIFICIO DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA, CONJUNTO E, FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM



DR. MARIO ALBERTO FIGUEROA SALDÍVAR

ASESOR DEL TEMA



M. EN C. CARLOS ANTONIO FAJARDO HERNÁNDEZ

SUPERVISOR TÉCNICO



JUAN CARLOS ROSAS HERNÁNDEZ

SUSTENTANTE

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) y a la Facultad de Química (FQ), por contribuir en mi formación profesional y académica.

A la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA) y al Programa de Apoyo a la Investigación y el Posgrado (PAIP) de la FQ, UNAM, por los financiamientos otorgados a través de los proyectos IN 222220 y 5000-9145, respectivamente, para la realización de esta investigación.

A la Unidad de Servicio de Apoyo a la Investigación y a la Industria (USAII), FQ, UNAM, por el registro de los espectros de resonancia magnética nuclear (RMN).

A las Dras. Valeria Souza y Susana de la Torre del Instituto de Biología, UNAM y del Instituto de Biotecnología, UANL, respectivamente, por su apoyo en el aislamiento de las cepas objeto de estudio, y a la Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales (SEMARNAT) por el permiso otorgado a la Dra. Souza (oficio No. SGPA/DGVVS/02002/16), para la recolección de muestras con fines académicos y de investigación.

Al M. en C. Carlos Antonio Fajardo Hernández por sus enseñanzas y supervisión técnica durante todas las etapas del presente proyecto.

A mis compañeros del laboratorio 125, que en todo momento me apoyaron con su experiencia y conocimientos para el desarrollo de esta investigación.

A mi tutor, el Dr. Mario A. Figueroa Saldívar. Le agradezco por permitirme formar parte de su equipo de trabajo, por brindarme su apoyo a lo largo del presente proyecto de investigación y por todas las enseñanzas, así como por la confianza depositada en mí.

INDICE

	Página
1. Antecedentes.	1
1.1. Enfermedades infecciosas.	1
1.2. Importancia de los productos naturales en el desarrollo de nuevos agentes terapéuticos.	2
1.3. Ecosistemas inexplorados como fuente de especies únicas de bacterias.	5
1.4. Área de protección de flora y fauna Cuatro Ciénegas, Coahuila.	5
1.5. Función de las bacterias en la producción de agentes antimicrobianos.	7
1.6. Redes moleculares como herramienta para el estudio de la diversidad química.	8
2. Hipótesis.	10
3. Objetivos.	10
3.1. Objetivo general.	10
3.2. Objetivos particulares.	10
4. Procedimiento experimental.	11
4.1. Cultivo de bacterias en pequeña escala y preparación de los extractos orgánicos.	11
4.2. Evaluación de la actividad antimicrobiana.	13
4.3. Análisis de los extractos activos por HPLC.	13
4.4. Generación de redes moleculares a partir de los análisis por UPLC-HRESIMS-MS/MS.	14
4.5. Separación y purificación de los principales componentes presentes en los extractos activos.	15
4.6. Caracterización de los compuestos aislados.	15
5. Resultados y Discusión.	16
5.1. Evaluación de la actividad antimicrobiana.	16
5.2. Estudios químicos y de metabolómica de las bacterias seleccionadas.	22
5.2.1. Bacteria 1CA.	22
5.2.2. Bacteria 3CA.	31
5.2.3. Bacteria 8CA.	36
5.2.4. Bacteria 510.	41
6. Conclusiones.	46
7. Bibliografía.	47

Lista de figuras

	Página
Figura 1. Principales causas de muerte a nivel mundial.	1
Figura 2. Nuevos fármacos aprobados por la FDA entre 1981 y 2019.	3
Figura 3. Nuevas moléculas pequeñas aprobadas por la FDA entre 1981 y 2019.	4
Figura 4. Nuevos agentes antibacterianos aprobados por la FDA entre 1981 y 2019.	4
Figura 5. Compuestos obtenidos de actinobacterias de relevancia clínica.	7
Figura 6. Metodología general para la obtención de los extractos orgánicos a partir de los cultivos bacterianos en pequeña escala.	12
Figura 7. Cultivos de las bacterias (1CA, 3CA, 8CA y 510) objeto de estudio.	17
Figura 8. Cromatogramas por HPLC a nivel analítico de los extractos activos de la bacteria 1CA.	22
Figura 9. Cromatograma por HPLC del fraccionamiento primario de la reunión 01003-88-19 y 01003-88-21 (Detección: UV λ 365 nm).	23
Figura 10. Espectro de HRESIMS en modo (+) de la yodinina (1) (m/z 245.0553 [M+H] ⁺).	24
Figura 11. Espectro de ¹ H RMN de la yodinina (1) (CDCl ₃).	25
Figura 12. Biosíntesis de la yodinina (1) y otras fenazinas (1,6-fenazindiol (FD; 3) y 5-óxido del 1,6-fenazindiol (OFD; 4) a partir del ácido 1,6-dicarboxílico de la fenazina (FDC; 2).	25
Figura 13. Perfil cromatográfico por UPLC del extracto 01003-88-21 [Detección: UV λ 254 nm (arriba) y perfiles UV-Vis de los componentes analizados (abajo)].	26
Figura 14. Espectros de MS (arriba) y MS ² (abajo) obtenidos por HRESIMS en modo (+) para el compuesto 1 (m/z 245.0553 [M+H] ⁺).	26
Figura 15. Espectros de MS (arriba) y MS ² (abajo) obtenidos por HRESIMS en modo (+) para el compuesto 4 (m/z 229.0605 [M+H] ⁺).	27
Figura 16. Espectros de MS (arriba) y MS ² (abajo) obtenidos por HRESIMS en modo (+) para el compuesto 3 (m/z 213.0655 [M+H] ⁺).	28
Figura 17. Red molecular de los extractos de la bacteria 1CA.	29
Figura 18. Cromatogramas por HPLC a nivel analítico de los extractos activos de la bacteria 3CA.	31
Figura 19. Cromatograma del fraccionamiento primario del extracto 01003-88-31 por HPLC (Detección: UV λ 254 nm).	32
Figura 20. Cromatograma por HPLC del fraccionamiento primario de las fracciones 01003-88-32-01003-88-33 (Detección: UV λ 365 nm).	33
Figura 21. Red molecular de los extractos de la bacteria 3CA.	34
Figura 22. Cromatogramas por HPLC a nivel analítico de los extractos activos de la bacteria 8CA.	36
Figura 23. Cromatograma por HPLC del fraccionamiento primario de la reunión 01003-88-07 y 01003-88-27 (Detección: UV λ 365 nm).	36
Figura 24. Red molecular de los extractos de la bacteria 8CA.	38

Figura 25. Cromatogramas por HPLC a nivel analítico de los extractos activos procedentes de la bacteria 510.	41
Figura 26. Cromatograma por HPLC del fraccionamiento primario de la reunión 01003-88-22 y 01003-88-23 (Detección: UV λ 365 nm).	41
Figura 27. Red molecular de los extractos de la bacteria 510.	43

Lista de tablas

	Página
Tabla 1. Condiciones cromatográficas empleadas en el análisis de los extractos orgánicos activos.	15
Tabla 2. Rendimientos de los extractos orgánicos de la serie de bacterias 1CA, 3CA, 8CA y 510.	18
Tabla 3. Resultados de la evaluación de la actividad antimicrobiana de los extractos orgánicos.	21
Tabla 4. Fraccionamiento primario de la reunión 01003-88-19 y 01003-88-21 por HPLC.	23
Tabla 5. Resultados cuantitativos de la clasificación química estructural del perfil químico de la bacteria 1CA.	30
Tabla 6. Fraccionamiento primario del extracto 01003-88-31 por HPLC.	32
Tabla 7. Fraccionamiento primario de los extractos 01003-88-32 y 01003-88-33 por HPLC.	33
Tabla 8. Resultados cuantitativos de la clasificación química estructural atribuible al perfil químico de la bacteria 3CA.	35
Tabla 9. Fraccionamiento primario de los extractos 01003-88-7 y 01003-88-27 por HPLC.	37
Tabla 10. Resultados cuantitativos de la clasificación química estructural atribuible al perfil químico de la bacteria 8CA.	39
Tabla 11. Compuestos con actividad biológica identificados en la red molecular de los extractos de la bacteria 8CA.	40
Tabla 12. Fraccionamiento primario de los extractos 01003-88-22 y 01003-88-23 por HPLC.	42
Tabla 13. Resultados cuantitativos de la clasificación química estructural atribuible al perfil químico de la bacteria 510.	44
Tabla 14. Compuestos de origen bacteriano identificados en la red molecular de los extractos de la bacteria 510.	44

Lista de abreviaturas

°C	Grado Celsius	MeOD	Metanol deuterado
ACN	Acetonitrilo	mg	Miligramo
AcOEt	Acetato de etilo	MHz	Mega Hertz
CHCl ₃	Cloroformo	min	Minuto
CDCl ₃	Cloroformo deuterado	mL	Mililitro
Cl ₅₀	Concentración inhibitoria media	mm	Milímetro
CMI	Concentración inhibitoria mínima	MS	Espectrometría de masas
d	Señal doble	MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol
dd	Señal doble de doble	NEQ	Nueva entidad química
DMSO	Dimetil sulfóxido	nm	Nanómetro
DMSO- <i>d</i> ₆	Dimetil sulfóxido deuterado	OMS	Organización mundial de la salud
td	Señal triple dobleteada	PDA	Detector de arreglo de fotodiodos
ELSD	Detector de dispersión de luz evaporativo	psi	Libras por pulgada cuadrada
ESI	Técnica de ionización por electrospray	RMN	Resonancia magnética nuclear
FDA	Food and drug administration	rpm	Revoluciones por minuto
g	Gramo	s	Señal simple
G+C	Guanina + citosina		
GNPS	Global natural product social molecular networking	MRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> resistente a la meticilina
HPLC	Cromatografía de líquidos de alta eficiencia	t _R	Tiempo de retención
HRESIMS-MS/MS	Espectrometría de masas de alta resolución por la técnica de ionización por electrospray	UPLC	Cromatografía de líquidos de ultra eficiencia
Hz	Hertz	UV	Espectroscopía en el ultravioleta
kV	Kilovolt	V	Volt
m	Señal múltiple	δ	Desplazamiento químico
<i>m/z</i>	Relación masa-carga	μg	Microgramo
MeOH	Metanol	μm	Micrómetro

1. Antecedentes.

1.1. Enfermedades infecciosas.

La Organización Mundial de la Salud (WHO, 2018a) en el 2016, reportó que de las 56.9 millones de muertes a nivel mundial, el 54% fueron ocasionadas por las causas que se resumen en la **Figura 1**. De estas causas, las infecciones en las vías respiratorias bajas son las de mayor índice de letalidad, ocasionando más de 3 millones de las muertes alrededor del mundo. A pesar de los avances en la prevención y la terapia contra estas infecciones, la aparición de nuevos mecanismos de resistencia a los agentes terapéuticos convencionales, han disminuido la eficacia de dichos tratamientos, incluso para aquellas enfermedades infecciosas más comunes (WHO, 2018a). Esta resistencia se presenta cuando los microorganismos (bacterias, hongos, virus y parásitos) se adaptan a la exposición de los fármacos (antibióticos, antifúngicos, antivirales, y antiparasitarios). Como resultado de este cambio, los tratamientos se vuelven poco eficaces y las infecciones persisten en el organismo, aumentando el riesgo de contagio hacia otros individuos (WHO, 2018b).

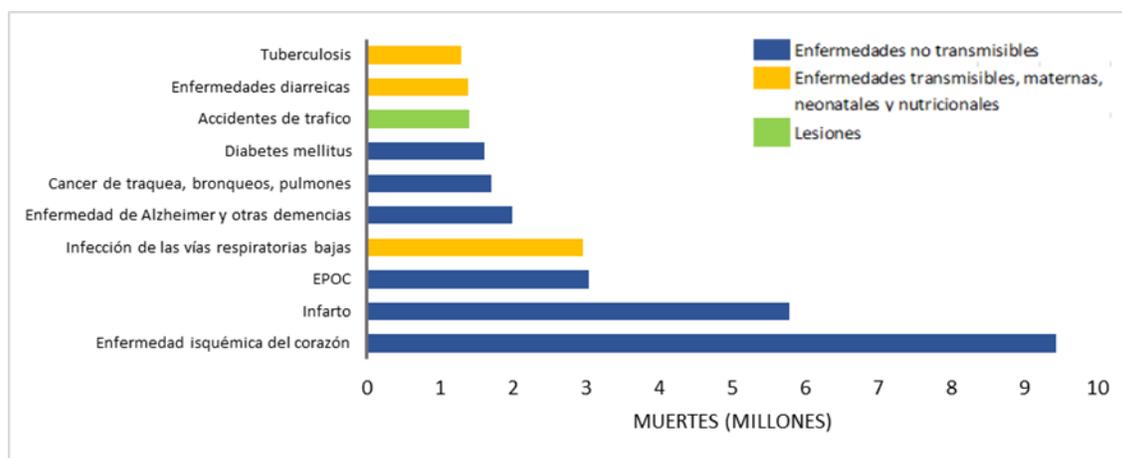


Figura 1. Principales causas de muerte a nivel mundial (WHO, 2018a).

En el caso específico de las bacterias, la resistencia a los antibióticos ha incrementado de manera alarmante en todas partes del mundo (WHO, 2018a). Los pacientes con infecciones causadas por bacterias resistentes se encuentran en una situación de riesgo permanente, al mostrar una mayor predisposición para presentar cuadros clínicos adversos e incluso la muerte (WHO, 2018b).

A medida que los antibióticos son menos eficaces, una gran cantidad de infecciones como la neumonía, la tuberculosis, la septicemia, la gonorrea, entre otras, se vuelven más difíciles, y en ocasiones, imposibles de tratar (WHO, 2018a). Por lo que, estos patógenos multirresistentes son una prioridad global para la OMS, que ha recomendado a sus países miembros una búsqueda racional de nuevos fármacos que sean eficaces para tratar este tipo de infecciones (WHO, 2017). Debido a esta situación, y sin acciones urgentes, nos dirigimos a la era *post* antibióticos en la cual, infecciones comunes, o bien, el tratamiento

de heridas menores, podrían ocasionar la muerte, además de que algunos procedimientos médicos como son los trasplantes de órganos, las quimioterapias en el tratamiento del cáncer, y las cirugías mayores, se convertirían en escenarios de alto riesgo (WHO, 2018b). En resumen, el fenómeno de resistencia hacia los agentes antimicrobianos es un problema complejo que afecta a toda la sociedad y es causada por muchos factores, todos estrechamente relacionados, y las intervenciones individuales y aisladas tienen poco impacto, por lo que se requieren de acciones coordinadas que minimicen la emergencia y la propagación de este fenómeno. Así, una mayor innovación e inversión son requeridos para la búsqueda y el desarrollo de nuevos medicamentos antimicrobianos, vacunas y/o otras herramientas de diagnóstico (WHO, 2018b).

A pesar de esta necesidad, las compañías farmacéuticas han suspendido todo desarrollo enfocado a la investigación de nuevos antibióticos, debido a un modelo económico fracturado, resultando en una carencia de nuevas clases de antibióticos y dejando la investigación y el desarrollo de esta clase de fármacos a los centros de investigación de las universidades y pequeñas compañías biotecnológicas (Dror *et al.*, 2020).

1.2. Importancia de los productos naturales en el desarrollo de nuevos agentes terapéuticos.

El término farmacognosia fue acuñado por primera vez entre 1811 y 1815, y originalmente se refería a la “materia médica”, el conocimiento de los materiales farmacéuticos o farmacología. Posteriormente, la farmacognosia fue restringida a la rama de la farmacia encargada de investigar “sustancias medicinales originarias del reino vegetal, animal y mineral en su estado crudo o en la forma de derivados primarios, como aceites, ceras, gomas y resinas”. En un posterior intento de actualizar el área del conocimiento de esta disciplina para que fuera consistente con las actividades realizadas al principio del siglo 21, la farmacognosia fue definida como “una ciencia molecular que explora las relaciones estructura-actividad ocurriendo de manera natural con un potencial farmacológico” (Kingham, 2001).

La importancia de los fármacos que tienen su origen a partir de fuentes animales, microorganismos y plantas está bien establecida, y algunos de estos productos naturales también han servido como base para la manipulación semisintética, o de modelo para la síntesis total. Las últimas décadas del siglo XX presenciaron un declive en la búsqueda de compuestos naturales como fármacos útiles en la terapéutica, no obstante, las ventajas que presentan estos productos sobre los compuestos sintéticos, destacando su diversidad estructural, además de una amplia gama de actividades biológicas. Estas dos características han sido utilizadas para la realización de diversos estudios quimioinformáticos (González-Medina *et al.*, 2016; 2017), estableciéndose que los productos naturales y sus derivados contribuyen con cerca del 50% de los fármacos aprobados por la FDA entre 1981 y 2019 (**Figura 2**; Newman & Cragg, 2020).

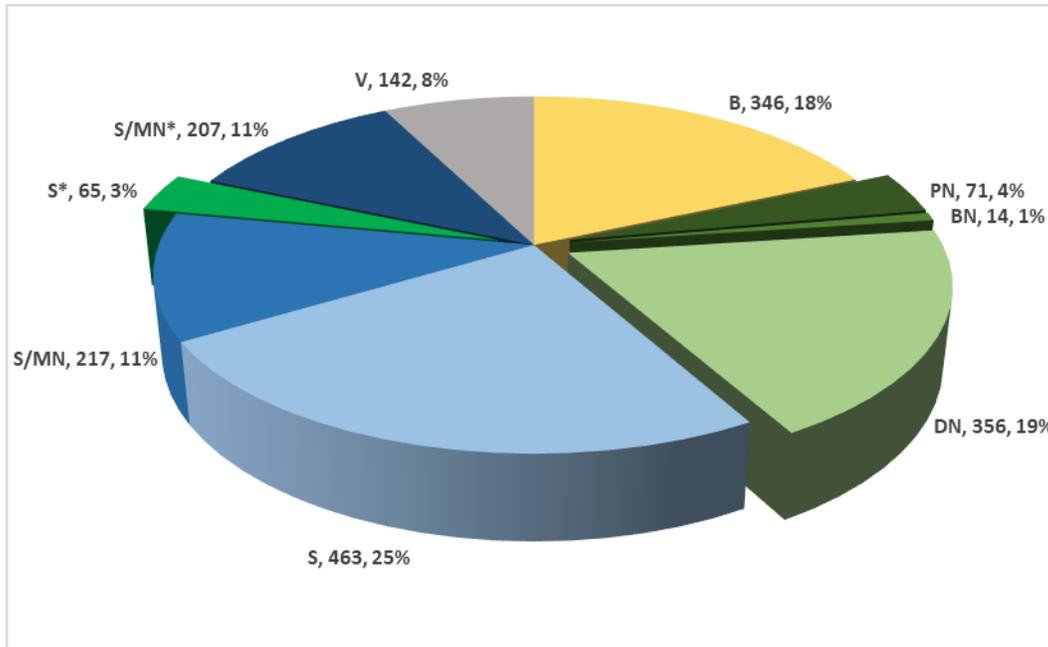


Figura 2. Nuevos fármacos aprobados por la FDA entre 1981 y 2019. B (biológicos), PN (producto natural), BN (producto natural botánico), DN (derivado de producto natural), S (fármaco totalmente sintético), S* (fármaco sintético basado en farmacóforo de un producto natural), V (vacunas), MN (Producto natural mimético). (Adaptado de Newman & Cragg, 2020).

En el caso particular, de los fármacos clasificados como moléculas pequeñas (<1000 Da), de los 1394 aprobados en los últimos 39 años por la FDA, 441 son productos naturales o derivados de estos (**Figura 3**). Si a éstos se le suman los correspondientes a la clasificación de S* (65 NEQs), el número total de moléculas se incrementa a 506 (36.3% del total de fármacos) (Newman & Cragg, 2020). Cabe destacar que los fármacos antibacterianos siguen la misma tendencia, ya que, de los 162 aprobados en el mismo periodo, 78 (48%), son productos naturales o derivados de estos (**Figura 4**).

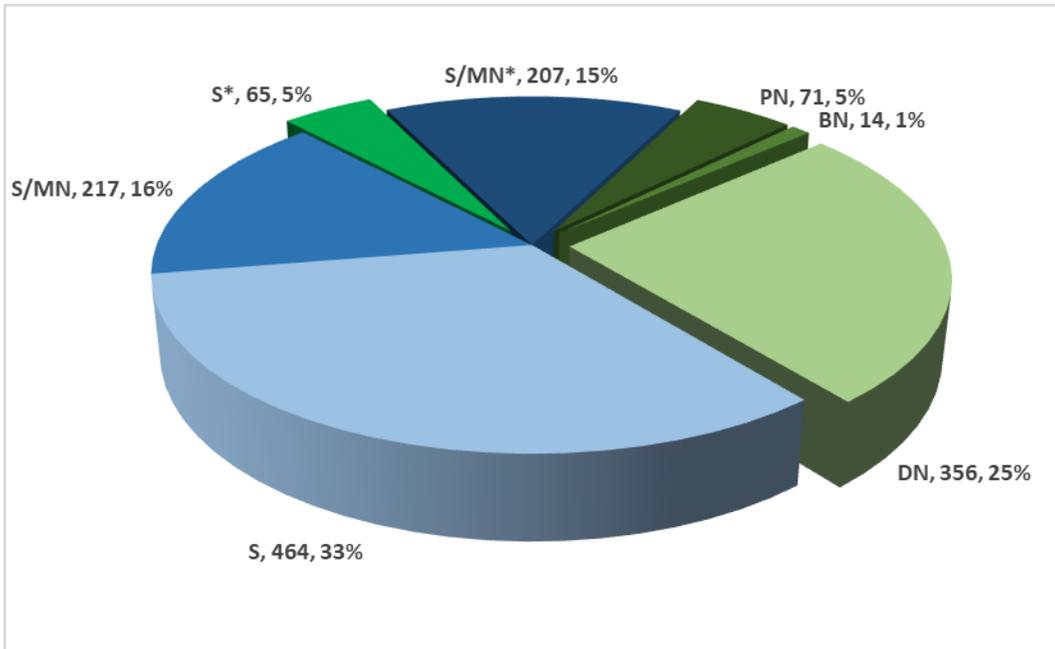


Figura 3. Nuevas moléculas pequeñas aprobadas por la FDA entre 1981 y 2019. B (biológicos), PN (producto natural), BN (producto natural botánico), DN (derivado de producto natural), S (fármaco totalmente sintético), S* (fármaco sintético basado en farmacóforo de un producto natural), V (vacunas), MN (Producto natural mimético). (Adaptado de Newman & Cragg, 2020).

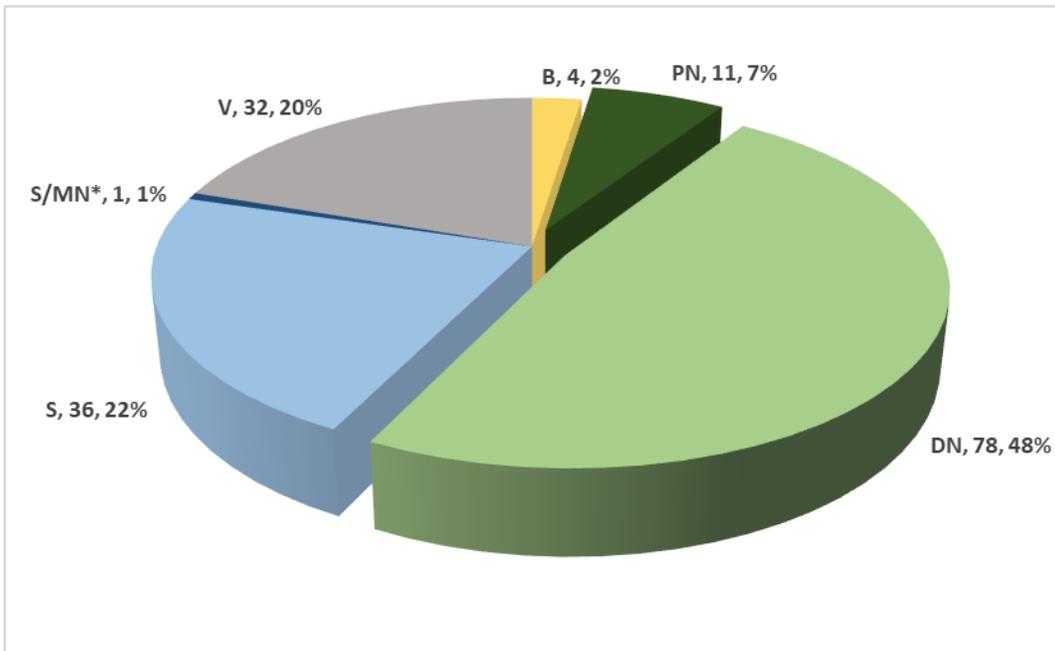


Figura 4. Nuevos agentes antibacterianos aprobados por la FDA entre 1981 y 2019. B (biológicos), PN (producto natural), BN (producto natural botánico), DN (derivado de producto natural), S (fármaco totalmente sintético), S* (fármaco sintético basado en farmacóforo de un producto natural), V (vacunas), MN (Producto natural mimético). (Adaptado de Newman & Cragg, 2020).

1.3. Ecosistemas inexplorados como fuente de especies únicas de bacterias.

Aunque pudiera parecer que se ha llegado al punto máximo en el descubrimiento de productos naturales novedosos, cada vez se vuelve más evidente que existe una gran biodiversidad pendiente por ser estudiada. La dicotomía entre los productos naturales novedosos de aquellos aún por descubrir en los microbiomas terrestres viene del hecho de que; (1) los metabolitos secundarios producidos por bacterias siguen estímulos específicos que no pueden ser imitados utilizando medios de cultivo artificiales; y (2) la mayoría de las bacterias de suelo no han sido cultivadas en el laboratorio y, por lo tanto, este vasto reservorio de metabolitos secundarios aún no ha sido explorado (Dror *et al.*, 2020).

La gran variedad de ecosistemas, el elevado número de especies, la enorme riqueza de endemismos y la variabilidad genética de las especies silvestres y cultivadas, hacen que México forme parte del selecto grupo de países megadiversos que ocupan aproximadamente un 10% de la superficie del planeta, y albergan en conjunto alrededor del 70% de la biodiversidad mundial, lo que vuelve a sus ecosistemas inexplorados una fuente invaluable para la investigación de organismos y productos naturales novedosos (CONABIO, 2021).

En este contexto, los desiertos, son considerados ecosistemas también únicos que se caracterizan por la falta de vegetación, alta radiación en el UV, extremas temperaturas y desecación, alta salinidad, presencia de oxidantes inorgánicos, concentraciones deficientes de carbón, e inestabilidad física causada por fuertes vientos. Éstos cubren la quinta parte del planeta tierra y se consideran un medio ambiente hostil para el crecimiento de microorganismos, por lo cual requieren de adaptaciones que les permitan su supervivencia (Sivalingam *et al.*, 2019).

Por otra parte, la exploración de la diversidad metabólica de cepas microbianas cultivadas de muestras de hábitats inexplorados que incluyen zonas extremadamente áridas, cavernas prístinas, endófitos de plantas y epifitos, microbiomas de insectos, ecosistemas marinos, ambientes extremadamente fríos, microbiomas humanos, entre otros (Dror *et al.*, 2020); sigue siendo un campo muy dinámico, algunos ejemplos exitosos lo representan las bacterias pertenecientes al filo de las Actinobacterias, como algunas especies del género *Streptomyces* productoras de nuevas moléculas con diversas actividades biológicas, destacando aquellas con propiedades antimicrobianas y antineoplásicas (Sivalingam *et al.*, 2019).

1.4. Área de protección de flora y fauna Cuatro Ciénegas, Coahuila.

La cuenca de Cuatro Ciénegas (CC) se encuentra en la zona central de México, en el estado de Coahuila, y es un valle de alrededor de 30 a 40 km², localizado a 740 msnm, y rodeado por grandes montañas de >3000 m de altura. Esta cuenca evaporítica cerrada recibe alrededor de 120 mm de precipitación anual y, a pesar de su clima árido, alberga un extenso sistema de manantiales, arroyos y estanques de interés científico (Minckley, 1992).

Debido a los altos niveles de endemismo y de biodiversidad de organismos superiores en este sitio, con más de 70 especies endémicas de vertebrados acuáticos, estromatolitos y otras comunidades microbianas (Minckley, 1992), el valle de CC es considerado como un oasis de biodiversidad en el desierto de Chihuahua y actualmente es designado federalmente como “Área de protección de Flora y Fauna” (Souza *et al.*, 2006; 2012).

Las zonas áridas en general presentan un estrés hídrico frecuente, poca materia orgánica y nutrientes, particularmente nitrógeno (N) y fósforo (P), así como una elevada salinidad, temperatura y exposición a la radiación UV (Bashan *et al.*, 1995; Puente *et al.*, 2009). El valle de CC no es la excepción, ya que se caracteriza por sus hábitats acuáticos extremadamente oligotróficos debido a los bajos niveles de fósforo (Escalante *et al.*, 2008; Martínez-Carranza *et al.*, 2017). La tierra en CC es alcalina con elevadas concentraciones de iones, resultando en una alta conductividad eléctrica. Esta característica puede ser atribuida a la naturaleza rica en yeso de los suelos de la región (López-Lozano *et al.*, 2020). En estudios previos, la salinidad demostró tener una fuerte influencia en la composición de las comunidades microbianas en la cuenca, no sólo porque es una presión selectiva por sí misma, sino también porque disminuye la disponibilidad de nutrientes, los cuales son muy escasos en estos suelos (López-Lozano *et al.*, 2012). Estas características han causado una enorme diversificación y una considerable cantidad de endemismos, siendo reportado como el lugar con mayor número de endemismos en Norte América, incluyendo macro y microorganismos (Souza *et al.*, 2006).

La vida microbiana en CC incluye comunidades acuáticas diversas, entre las cuales se encuentran 38 filotipos únicos con 10 linajes procarióticos mayores. Esta alta diversidad es sorprendente, debido a que las aguas oligotróficas de la cuenca a veces resultan en ambientes acuáticos extremos con altas concentraciones de magnesio, calcio, carbonatos y sulfatos (Souza *et al.*, 2006; De Anda *et al.*, 2018). En esta tierra húmeda extremadamente diversa, el reciclaje de acuíferos profundos por el calor magmático reproduce muchas condiciones de los océanos antiguos (Wolaver *et al.*, 2012), incluyendo la estequiometría de nutrientes extremadamente desbalanceada y los minerales de azufre y magnesio que reproducen la osmolaridad marina a pesar de tener bajos niveles de NaCl (De Anda *et al.*, 2018).

En concordancia con esto, el microbiota acuático de los estanques presenta afinidades marítimas ancestrales y la composición de su comunidad bacteriana es dominada por proteobacterias (principalmente de las subdivisiones Gammaproteobacteria, Betaproteobacteria, y Alphaproteobacteria), seguida por bacteroidetes y actinobacterias (Pajares *et al.*, 2012). En contraste, algunos nichos en los ecosistemas terrestres contienen abundantes miembros del filo Actinobacteria (*Planntactinospora*, *Streptomyces*, *Janibacter* e *Isoptericola*) (Horikoshi, 2011; Pajares *et al.*, 2012;). Las actinobacterias tienen una tolerancia particular a la alta salinidad y a la desecación, y han sido aisladas de muchos desiertos áridos e hiperáridos (Stevenson & Hallsworth, 2014). Otra característica es su gran capacidad para producir metabolitos secundarios bioactivos (López-Lozano *et al.*, 2020).

1.5. Función de las bacterias en la producción de agentes antimicrobianos.

Los productos naturales de origen microbiano son la base de la mayoría de las clases de antibióticos de uso clínico actual, además de representar estructuras únicas como resultado del proceso evolutivo. La búsqueda de nuevos agentes antimicrobianos a partir de fuentes naturales afronta el reto de identificar nuevas estructuras, que actúen contra nuevos blancos terapéuticos, y que no presenten mecanismos de resistencia cruzada, al mismo tiempo de superar inconvenientes de permeabilidad y bombas de eflujo (Pye *et al.*, 2017; Palazzolo *et al.*, 2017). En este sentido, los microorganismos terrestres son considerados una de las mejores fuentes para la obtención e identificación de dichos productos. Entre estos, los actinomicetos son reconocidos por producir una amplia gama de metabolitos secundarios con diversas actividades biológicas. Se estima que, a la fecha, el 70-80% de los metabolitos secundarios y un tercio de los antibióticos disponibles comercialmente han sido obtenidos de esta fuente natural (Ding *et al.*, 2019). A la fecha, se desconoce la función específica de los metabolitos secundarios en el metabolismo primario de las bacterias, sin embargo, su amplia diversidad indica un papel predominante en las interacciones entre los microorganismos y su entorno (Igbinsosa *et al.*, 2020).

Las actinobacterias que producen metabolitos bioactivos han sido aisladas principalmente de ambientes terrestres. Entre los fármacos antimicrobianos derivados de estos organismos destacan la estreptomycinina aislada de *Streptomyces griseus*, el primer fármaco utilizado para el tratamiento de la tuberculosis, la generación de eritromicinas y de las tetraciclinas, aisladas de *S. erytherus* y *S. aureofaciens*, respectivamente (Chávez *et al.*, 2015; **Figura 5**), además del cloranfenicol (*S. venezuelae*), la gentamicina (*Micromonospora purpurea*), la novobiocina (*S. niveus*), la oxitetraciclina (*S. rimosus*), la candidicina (*S. griseus*) y la borrelidina (*Streptomyces* spp.), por mencionar sólo algunos ejemplos de interés (Gohain *et al.*, 2020).

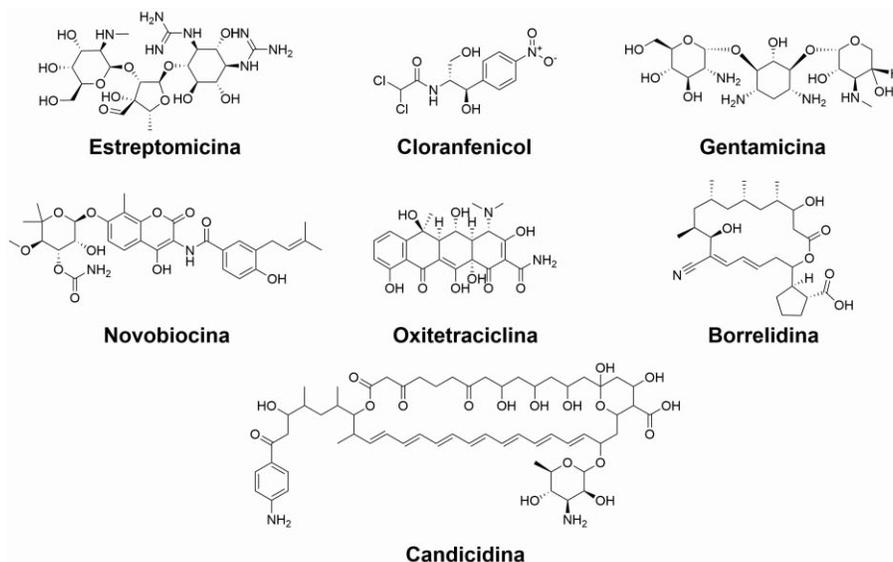


Figura 5. Compuestos obtenidos de actinobacterias de relevancia clínica (Gohain *et al.*, 2020).

1.6. Redes moleculares como herramienta para el estudio de la diversidad química.

Las investigaciones del metabolismo secundario a menudo consisten en el cribado de extractos orgánicos para la búsqueda de actividades biológicas específicas seguidos de la purificación, la identificación y la caracterización de los componentes activos presentes. Este proceso ha demostrado ser eficiente en la búsqueda de entidades químicas novedosas. Sin embargo, en la actualidad esta estrategia ha sido infructuosa debido a las altas tasas de redescubrimiento.

Así, los avances en la secuenciación genómica han renovado el interés por el cribado de metabolitos a partir de microorganismos, debido a que el análisis de la información genómica de los cúmulos biosintéticos descubiertos puede revelar genes que codifican para diferentes clases de compuestos novedosos o producidos en condiciones de laboratorio. De tal manera que, ya existen algunos borradores de genoma completo microbiano, y el número está creciendo cada año, proporcionando perspectivas masivas para descubrir nuevas moléculas bioactivas a través de la minería del genoma.

El “Atlas of Biosynthetic Gene Clusters”, es la más grande biblioteca de cúmulos de genes extraídos automáticamente como componente de la Plataforma Integrada de Genomas Microbianos del Instituto Conjunto del Genoma (JGI IMG-ABC), proporcionando un conjunto de datos bastante depurado. Hoy en día, hay muchas herramientas disponibles para realizar la minería computacional de datos genéticos y su relación con metabolitos secundarios conocidos, y también se han desarrollado diferentes estrategias para acceder a nuevos productos naturales bioactivos (como: expresión heteróloga, eliminación de genes diana, reconstitución *in vitro*, secuencia genómica, cribado guiado por isótopos, etc). En este sentido, el uso de la minería del genoma en conjunto con un enfoque de redes moleculares representa un avance importante para la investigación de los productos naturales.

Una red molecular se define como la visualización global de moléculas de una sola fuente. Las moléculas estructuralmente divergentes que se fragmentan de forma única formarán su propio cúmulo o constelación específica, mientras que las moléculas relacionadas se agrupan. La agrupación de quimiotipos permite la conexión hipotética de características estructurales similares a sus orígenes biosintéticos (Aron *et al.*, 2020).

El uso de redes moleculares para el análisis de datos generados por la espectrometría de masas (MS) fue introducido en el 2012, al estudiar la producción de metabolitos secundarios por un grupo de colonias de bacterias. Con este análisis, se logró establecer la diversidad química entre los microorganismos, y desde su introducción, esta herramienta ha sido comparada con la secuenciación de ADN ambiental para el estudio de las comunidades microbianas presentes en diversos ecosistemas. Adicionalmente, el uso de redes moleculares ha ayudado a la identificación estructural de numerosos compuestos con base en patrones de fragmentación (Aron *et al.*, 2020).

El fundamento de los análisis por redes moleculares consiste en alinear y comparar los espectros obtenidos experimentalmente con aquellos contenidos en una base de datos, en este caso las bibliotecas públicas del servidor Global Natural Product Social Molecular Networking (GNPS), mediante el algoritmo de similitud espectral, no solo entre los espectros de masas obtenidos por la fragmentación de las moléculas, sino también de los espectros obtenidos por la fragmentación de los iones (MS/MS), permitiendo identificar a aquellas moléculas estructuralmente relacionadas que generan espectros de MS/MS comparables debido a su comportamiento en fase gaseosa, permitiendo así correlacionar moléculas dentro de una misma red (Aron *et al.*, 2020).

La versatilidad, precisión y alta sensibilidad de la cromatografía de líquidos acoplada a la espectrometría de masas (LC-MS) la convierten en la técnica de elección para la identificación de compuestos en el estudio de las redes moleculares. Actualmente, varias plataformas han invertido algoritmos y conjuntos de software para metabolómicas no dirigidas. El núcleo de estos programas incluye la detección de características (selección de picos) y la alineación de picos, lo que permite la coincidencia de entidades idénticas en un lote de muestras y la búsqueda de patrones. Los algoritmos basados en patrones de MS comparan patrones de fragmentación característicos y coinciden con las similitudes de MS que generan familias moleculares que comparten características estructurales. Estas características pueden ser resaltadas y agrupadas, permitiendo el descubrimiento de las moléculas novedosas presentes en las muestras analizadas.

2. Hipótesis.

Las bacterias obtenidas de la región de Cuatro Ciénegas, Coahuila, representan fuentes naturales idóneas para su bioprospección en la búsqueda de compuestos bioactivos para el desarrollo de nuevos agentes antimicrobianos.

3. Objetivos.

3.1. Objetivo general.

El objetivo general del presente trabajo es realizar el estudio químico y biológico de una serie de bacterias aisladas de una región poco explorada de nuestro país, con la finalidad de descubrir compuestos con potencial antimicrobiano.

3.2. Objetivos particulares.

Para el cumplimiento del objetivo general, se plantearon los siguientes objetivos particulares:

- Realizar el cultivo de una serie de bacterias aisladas de las Pozas Rojas de Cuatro Ciénegas, Coahuila, en diferentes medios de crecimiento.
- Preparar los extractos orgánicos utilizando resinas poliméricas y las técnicas de maceración y partición.
- Establecer el potencial antimicrobiano de los extractos orgánicos mediante el ensayo de microdilución con el colorante MTT en microplacas de 96 pozos.
- Analizar el contenido metabólico preliminar de los extractos por UPLC-PDA-HRESIMS-MS/MS.
- Separar a los componentes mayoritarios presentes en las fracciones activas por cromatografía de líquidos de alta eficiencia (HPLC) en fase reversa y caracterizarlos mediante técnicas espectroscópicas y espectrométricas de vanguardia.

4. Procedimiento experimental.

4.1. Cultivo de bacterias en pequeña escala y preparación de los extractos orgánicos.

El grupo de trabajo de la Dra. Valeria Souza del Instituto de Biología, UNAM, en conjunto con la Dra. Susana de la Torre, Instituto de Biotecnología, UANL, realizó el aislamiento de cuatro cepas de actinobacterias a partir de muestras de suelo colectadas en las Pozas Rojas de CC. Los organismos identificados con las claves internas (1CA, 3CA, 8CA y 510) fueron transferidos en cajas de Petri con agar ISP2 (4 g extracto de levadura, 10 g extracto de malta, 4 g dextrosa, 20 g agar, 1 L de agua, pH 7.2) para su posterior cultivo en 750 mL de cada uno de los siguientes medios líquidos: LB (10 g triptona, 10 g NaCl, 5 g extracto de levadura, 1 L de agua), ISP2 (4 g extracto de levadura, 10 g extracto de malta, 4 g dextrosa, 1 L agua, pH 7.2) y A1 (4 g extracto de levadura, 2 g peptona de soya, 10 g almidón, 1 L agua destilada). Todos los cultivos fueron incubados por 21 días a temperatura ambiente con agitación constante a 120 rpm y fotoperiodos de luz-oscuridad de 12/12 horas. Una vez concluido el periodo de incubación, cada cultivo fue tratado con 75 mL de MeOH y centrifugado para separar la biomasa (BM). El sobrenadante (Medio de cultivo sin biomasa) fue utilizado para la extracción por maceración con la resina amberlita XAD7HP (20 g por L), a la cual se le realizaron lavados sucesivos con distintos disolventes orgánicos (AcOEt, MeOH y acetona) siguiendo la metodología resumida en la **Figura 6**.

4.2. Evaluación de la actividad antimicrobiana.

La actividad antimicrobiana de los 60 extractos obtenidos fue evaluada utilizando el método de microdilución con el colorante de bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT) en placas de 96 pozos, contra las bacterias Gram (+) *Staphylococcus aureus* (ATCC259233) y *Bacillus subtilis* (ATCC6633), Gram (-) *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC27853), *Escherichia coli* (ATCC10536) y *Salmonella typhi* (ATCC9992), y la levadura *Candida albicans*. Todos los microorganismos empleados fueron proporcionados por el Cepario de la Facultad de Química, UNAM. Los ensayos fueron realizados utilizando caldo Müeller-Hinton como medio de cultivo para las bacterias y caldo papa dextrosa para la levadura. Los controles positivos empleados fueron ampicilina para *S. aureus*, *E. coli* y *S. typhi*, vancomicina para *B. subtilis*, gentamicina para *P. aeruginosa* y nistatina para *C. albicans*.

De manera general, los ensayos se realizan con las muestras disueltas en una solución al 10% de DMSO en el medio de cultivo correspondiente a la concentración final de 200 µg/mL. La suspensión de microorganismos se ajustó a 1×10^8 células/mL (0.5% del estándar turbidimétrico de McFarland). Los microorganismos junto con las muestras fueron incubados a 37°C por 24 horas y, una vez transcurrido el periodo de incubación, se adicionaron 10 µL de la solución reveladora de MTT (5 mg/mL en MeOH) a cada pozo. La placa se incubó por 30 min a 37°C. La retención del color amarillo del revelador es indicativa de un resultado positivo para la actividad antimicrobiana. Todos los análisis se realizaron por duplicado.

4.3. Análisis de los extractos activos por HPLC.

Para el análisis de la composición de los extractos orgánicos, se empleó la técnica de cromatografía de líquidos de alta eficiencia (HPLC) a nivel analítico. Todos los extractos activos fueron analizados en un cromatógrafo de líquidos marca Waters (Waters Corp., Massachusetts, EE.UU.) equipado con una bomba cuaternaria, auto muestreador, y los detectores de arreglo de fotodiodos (PDA; UV λ 190-500 nm) y evaporativo de dispersión de luz (ELSD; ganancia 100, presión de N₂ 40 psi, nebulizador en modo de calentamiento y temperatura del tubo de $75 \pm 5^\circ\text{C}$). La obtención de los perfiles cromatográficos se realizó con una columna Gemini C₁₈ (4.6 × 250 mm, 5 µm, Phenomenex, California, EE.UU.) con una fase móvil compuesta por ácido fórmico acuoso (0.1%) y MeCN con un gradiente de elución de 15% MeCN a 100% MeCN en 15 min. Todas las muestras se analizaron (20 µL) a una concentración de 5 mg/mL en DMSO-dioxano-MeOH (6.2:1.9:1.9). El control del equipo, así como el procesamiento y manipulación de datos se realizaron empleando el programa Empower versión 3.0.

Paralelamente, se analizaron los extractos con actividad biológica en un equipo de cromatografía de líquidos de ultra eficiencia (UPLC) marca Waters, acoplado con un detector PDA (λ 190-500 nm) y un espectrómetro de masas de alta resolución utilizando la técnica de ionización por electrospray (HRESIMS) Q Exactive marca ThermoFisher

Scientific (Massachusetts, EE.UU.), en los modos positivo (ESI⁺) y negativo (ESI⁻). Todos los análisis se registraron a una temperatura de 40°C empleando una columna Acquity BEH C18 (2.1 x 10 mm, 1.7 µm, Waters) y una mezcla binaria de ácido fórmico al 0.1% y MeCN, utilizando un gradiente de elución de 15% MeCN a 100% MeCN en 8 min, manteniendo la composición isocrática por 1.5 min y regresando a las condiciones iniciales en 0.5 min. Las condiciones del HRESIMS en ESI⁺ fueron: temperatura del capilar y voltaje de la fuente: 275°C y 4.5 kV; voltaje del capilar: 20 V y voltaje para la lente del tubo: 95 V; y para el ESI⁻ temperatura del capilar y voltaje de la fuente: 275°C y 3.5 kV; voltaje del capilar: 42 V y voltaje para la lente del tubo: 110 V. Como gas acarreador se empleó N₂ a 25 unidades arbitrarias de flujo. Para cada análisis se disolvió 1.0 mg de la muestra en 0.5 mL de una mezcla de dioxano-MeOH (1:1). El control del instrumento y el análisis de datos se realizaron en el programa Xcalibur 2.1 (ThermoFisher Scientific). Todos los análisis de UPLC-HRESIMS-MS/MS se realizaron en la Universidad de Carolina del Norte en Greensboro, Carolina del Norte, EE.UU.

4.4. Generación de redes moleculares a partir de los análisis por UPLC-HRESIMS-MS/MS.

Para el estudio preliminar de la diversidad química de las cuatro cepas bacterianas objeto de este estudio, se generaron redes moleculares siguiendo el protocolo de trabajo descrito por Ersnt y colaboradores (2019) y la base de datos del GNPS (<http://gnps.ucsd.edu>). Los datos fueron depurados eliminando todos los fragmentos de iones MS/MS con una diferencia de ± 17 Da respecto al ion molecular del precursor. Los espectros de MS/MS generados fueron depurados nuevamente con la finalidad de seleccionar a los 6 principales fragmentos con una diferencia de ± 50 Da a lo largo del espectro. Las tolerancias de la masa del ion precursor y para el fragmento iónico MS/MS fueron fijadas en 0.02 Da. La red molecular fue entonces creada donde los bordes fueron depurados para tener un Cosine score (Similitud espectral entre dos espectros de fragmentación, donde; 1 representa espectros idénticos mientras 0 denota que no hay similitud en lo absoluto) por encima de 0.7 y más de seis picos de coincidencia. Adicionalmente, los bordes entre dos nodos se mantuvieron en la red solo si cada uno de los nodos aparecían entre los 10 más similares de la red para el nodo vecino y viceversa. Finalmente, el tamaño máximo de las familias moleculares fue fijado en 100, y los bordes con el menor score fueron removidos de las familias moleculares hasta que la familia molecular se encontrara debajo de este límite. Enseguida se realizó la búsqueda de los espectros en la red en las librerías espectrales del GNPS. Los espectros en la librería fueron analizados de la misma manera que los datos experimentales. Todas las coincidencias obtenidas en los espectros de la red y los espectros de las librerías requirieron un Cosine score por encima de 0.7 y al menos 6 picos coincidencia (Wang *et al.*, 2016).

Las redes moleculares generadas fueron enriquecidas utilizando MolNetEnhancer (Ernst *et al.*, 2019) que permite combinar los resultados de redes moleculares con las herramientas *in silico* MS2LDA, DEREPLICATOR y la clasificación química automatizada a través de Classyfire para brindar un análisis químico más comprensible de los datos metabolómicos,

mientras que al mismo tiempo permite establecer las características estructurales presentes en cada patrón de fragmentación (Ersnt *et al.*, 2019; Van der Hooft *et al.*, 2016; Mohimani *et al.*, 2016; Djoumbou *et al.*, 2016).

4.5. Separación y purificación de los principales componentes presentes en los extractos activos.

Con base en el análisis de los perfiles cromatográficos de los extractos activos por HPLC y UPLC-HRESIMS indicados en los incisos 4.3. y 4.4. de esta sección experimental, se reunieron las fracciones primarias con la finalidad de obtener cantidades adecuadas para la separación y purificación de los principales componentes presentes en cada una de las muestras analizadas. Para la separación y purificación, se optimizaron las condiciones de separación y se realizó el escalamiento correspondiente. En la **Tabla 1** se resume la información de los métodos de análisis empleados, utilizando un cromatógrafo de líquidos marca Waters (Waters Corp., Massachusetts, EE.UU.) equipado con una bomba cuaternaria, inyector automático, detector de arreglo de fotodiodos (PDA; λ 190-500 nm) y colector de fracciones. Para estos análisis se emplearon las columnas Gemini C₁₈ (10 × 250 mm y/o 21.2 × 250 mm, 5 μ m, Phenomenex, California, EE.UU.), para realizar los análisis a nivel semipreparativo y preparativo, respectivamente.

Tabla 1. Condiciones cromatográficas empleadas para el análisis de los extractos orgánicos activos.

Código interno	Clave del extracto	Condiciones de análisis	Tiempo de recolección (min)	Muestra (mg)	Clave muestra
8CA	01003-88-07 01003-88-27	SemiPGem 15% ACN a 100% ACN	1 a 22	14.2	01003-119-01 → 13
3CA	01003-88-31	SemiPGem 15% ACN a 100% ACN	1 a 22	12.5	01003-120-01 → 18
3CA	01003-88-32 01003-88-33	SemiPGem 15% ACN a 100% ACN	1 a 22	24.6	01003-121-01 → 12
1CA	01003-88-19 01003-88-21	PrepGem 15% ACN a 100% ACN	1 a 24	50.4	01003-122-01 → 14
510	01003-88-22 01003-88-23	PrepGem 15% ACN a 100% ACN	10 a 32	31.4	01003-123-01 → 13

4.6. Caracterización de los compuestos aislados.

Los componentes aislados fueron analizados por la técnica de resonancia magnética nuclear (RMN) en un equipo VARIAN CNRMS 400 (Varian Inc., California, EE.UU.), los espectros de ¹H RMN obtenidos fueron analizados con el programa MestreNova 12 (Mestrelabs Research). Los desplazamientos químicos (δ) se expresan en ppm y se emplearon los disolventes CDCl₃, CD₃OD o DMSO-*d*₆ para los registros. Todos estos experimentos se llevaron a cabo en la Unidad de Servicios de Apoyo a la Investigación y la Industria (USAI), Facultad de Química, UNAM.

5. Resultados y Discusión.

5.1. Evaluación de la actividad antimicrobiana.

Los cultivos en placa con agar ISP2 de las cuatro bacterias objeto de estudio en los tres distintos medios de cultivo líquido (inciso 4.1, sección experimental), presentan las características morfológicas que se ilustran en la **Figura 7**.

Observándose, que la bacteria con clave interna 1CA crece formando colonias negras con centro blanco y que producen un pigmento oscuro que difunde en el agar, en cuanto a sus características morfológicas sus colonias son puntiformes, con bordes erosionados y elevación convexa, de textura seca y dura. La producción del pigmento mencionado también se observó en los medios de cultivo ISP2 y A1.

La bacteria con la clave 3CA crece formando colonias de color gris a blanco, puntiformes y con bordes redondos, de elevación convexa y textura seca y dura. En los medios de cultivo líquidos, no forma agregados de gran tamaño ni produce pigmentos.

Por otra parte, la cepa 8CA forma colonias negras, de bordes redondos, elevadas y de textura mucoide. En las placas de agar no produce pigmentos, en contraste, en los medios de cultivo ISP2 y A1 si produce un pigmento oscuro.

Finalmente, la cepa 510 forma colonias de color gris a blanco, puntiformes y con bordes redondos, planas y con textura seca de aspecto polvoriento. En las placas de agar no produce pigmentos, y en los medios de cultivo ISP2 y A1 si produce un pigmento oscuro.

Cabe mencionar que, todas las cepas, evidenciaron colonias enterradas en el agar, que es una característica común que presentan las actinobacterias debido a la presencia de micelio del sustrato (Li *et al.*, 2016).

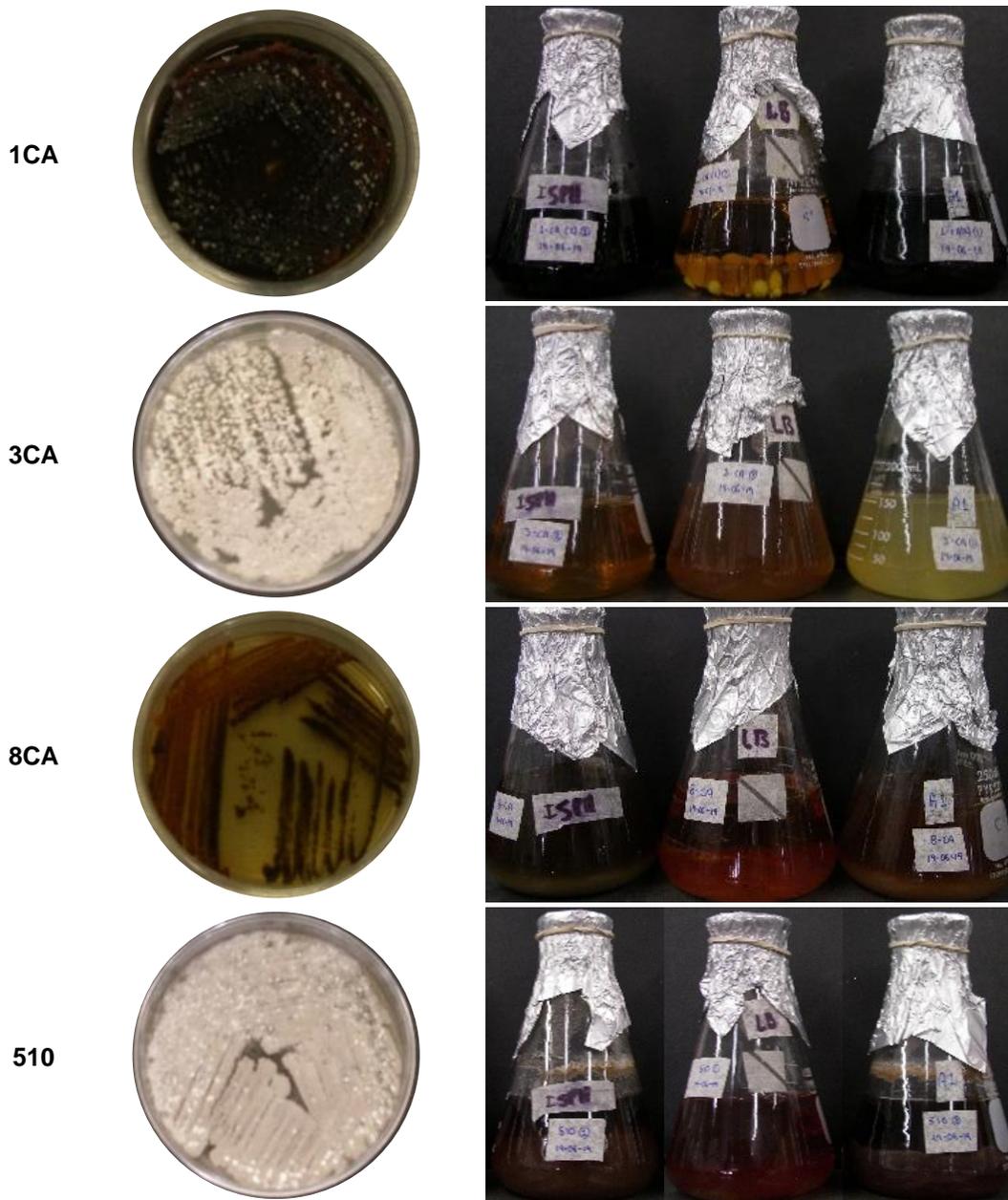


Figura 7. Cultivos de las bacterias (1CA, 3CA, 8CA y 510) objeto de estudio. De izquierda a derecha; código interno, crecimiento en cajas de Petri con agar ISP2, crecimiento en caldo ISP2, caldo LB, y caldo A1.

Posteriormente, a partir de los diferentes medios de cultivo se prepararon los extractos orgánicos correspondientes y los resultados obtenidos se resumen en la **Tabla 2**.

Tabla 2. Rendimientos de los extractos orgánicos de la serie de bacterias 1CA, 3CA, 8CA y 510.

Clave	Código interno	Medio de crecimiento	Disolvente	Rendimiento (mg)
01003-88-01	8CA	A1	AcOEt (R)	8.1
01003-88-02	8CA	ISP2	AcOEt (R)	21.4
01003-88-03	8CA	LB	AcOEt (R)	12
01003-88-04	8CA	A1	MeOH (R)	38.2
01003-88-05	8CA	ISP2	MeOH (R)	35.1
01003-88-06	8CA	LB	MeOH (R)	33.4
01003-88-07	8CA	A1	Acetona (R)	11.5
01003-88-08	8CA	ISP2	Acetona (R)	4.3
01003-88-09	8CA	LB	Acetona (R)	6.2
01003-88-10	510	LB	AcOEt (R)	16.6
01003-88-11	510	LB	MeOH (R)	35.7
01003-88-12	510	LB	Acetona (R)	12.2
01003-88-13	1CA	A1	AcOEt (R)	8.4
01003-88-14	1CA	A1	MeOH (R)	21.2
01003-88-15	1CA	A1	Acetona (R)	5
01003-88-16	8CA	ISP2	AcOEt (MC)	30.8
01003-88-17	8CA	LB	AcOEt (MC)	34.4
01003-88-18	8CA	A1	AcOEt (MC)	41.9
01003-88-19	1CA	ISP2	AcOEt (BM)	41.4
01003-88-20	1CA	LB	AcOEt (BM)	10.3
01003-88-21	1CA	A1	AcOEt (BM)	28.6
01003-88-22	510	ISP2	AcOEt (BM)	37.8
01003-88-23	510	LB	AcOEt (BM)	13.1
01003-88-24	510	A1	AcOEt (BM)	7.8
01003-88-25	8CA	ISP2	AcOEt (BM)	16.1
01003-88-26	8CA	LB	AcOEt (BM)	16.6
01003-88-27	8CA	A1	AcOEt (BM)	13.3
01003-88-28	3CA	ISP2	AcOEt (BM)	6.9
01003-88-29	3CA	LB	AcOEt (BM)	12
01003-88-30	3CA	A1	AcOEt (BM)	12.6
01003-88-31	3CA	A1	AcOEt (R)	18.3
01003-88-32	3CA	ISP2	AcOEt (R)	12.8
01003-88-33	3CA	LB	AcOEt (R)	25
01003-88-34	3CA	A1	MeOH (R)	38.6
01003-88-35	3CA	ISP2	MeOH (R)	24.4
01003-88-36	3CA	LB	MeOH (R)	37.3
01003-88-37	3CA	A1	Acetona (R)	6.4
01003-88-38	3CA	ISP2	Acetona (R)	3.1

R, resina; MC, medio de cultivo; BM, biomasa.

Tabla 2. Rendimientos de los extractos orgánicos de la serie de bacterias 1CA, 3CA, 8CA y 510 (continuación).

Clave	Código interno	Medio de crecimiento	Disolvente	Rendimiento (mg)
01003-88-39	3CA	LB	Acetona (R)	12
01003-88-40	510	A1	Acetona (R)	5.5
01003-88-41	510	ISP2	Acetona (R)	8.7
01003-88-42	510	A1	AcOEt (R)	18
01003-88-43	510	ISP2	AcOEt (R)	20.6
01003-88-44	1CA	ISP2	Acetona (R)	4.8
01003-88-45	1CA	LB	Acetona (R)	8.8
01003-88-46	510	A1	MeOH (R)	15.9
01003-88-47	510	ISP2	MeOH (R)	21
01003-88-48	1CA	LB	MeOH (R)	90.4
01003-88-49	1CA	ISP2	MeOH (R)	14.5
01003-88-50	1CA	LB	AcOEt (R)	22.6
01003-88-51	1CA	ISP2	AcOEt (R)	5.9
01003-88-52	1CA	ISP2	AcOEt (MC)	13.3
01003-88-53	1CA	LB	AcOEt (MC)	36.5
01003-88-54	1CA	A1	AcOEt (MC)	21
01003-88-55	510	ISP2	AcOEt (MC)	44.8
01003-88-56	510	LB	AcOEt (MC)	34.2
01003-88-57	510	A1	AcOEt (MC)	14.2
01003-88-58	3CA	ISP2	AcOEt (MC)	26.8
01003-88-59	3CA	LB	AcOEt (MC)	51.8
01003-88-60	3CA	A1	AcOEt (MC)	26.9

R, resina; MC, medio de cultivo; BM, biomasa.

Una vez preparados los 60 extractos orgánicos (**Tabla 2**) de cada una de las bacterias objeto de estudio, se realizó la evaluación del potencial antimicrobiano siguiendo la estrategia metodológica descrita en el inciso **4.2** de la sección experimental. Estos resultados se resumen en la **Tabla 3**.

Como se desprende de estos resultados, en el caso de la bacteria 1CA los extractos 01003-88-19 y 01003-88-21, BM de ISP2 y BM de A1 (**Tabla 2**), respectivamente, presentaron una inhibición total contra *B. subtilis* además de una inhibición parcial contra *S. aureus* y *C. albicans*, de igual manera el extracto 01003-88-20 (BM de LB) mostró una inhibición parcial contra *S. aureus* y *B. subtilis*. Por otra parte, el extracto 01003-88-13 (fracción soluble de AcOEt de A1), tiene un efecto inhibitorio parcial contra *S. aureus* y el extracto 01003-88-44 (fracción soluble de acetona de ISP2), mostró una inhibición total contra *C. albicans*. Estos resultados sugieren que los metabolitos con actividad antimicrobiana presentes en la cepa 1CA se encuentran en mayor concentración dentro de la célula bacteriana, y que probablemente también sean excretados en el medio de crecimiento.

Para la cepa 3CA los extractos 01003-88-30 (BM de A1, **Tabla 2**) y 01003-88-31 (fracción soluble de AcOEt de A1, **Tabla 2**), presentaron una inhibición total contra *B. subtilis* además de una inhibición parcial contra *S. aureus*. Por otra parte, los extractos 01003-88-32 (fracción soluble de AcOEt de ISP2) y 01003-88-33 (fracción soluble de AcOEt de LB), mostraron una inhibición parcial contra *S. aureus* y *B. subtilis*. De acuerdo con estos resultados podríamos establecer que los metabolitos bioactivos presentes en los extractos analizados son excretados en el medio de crecimiento.

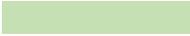
En el caso de la cepa 8CA los extractos 01003-88-01 (fracción soluble de AcOEt de A1, **Tabla 2**) y 01003-88-02 (fracción soluble de AcOEt de ISP2, **Tabla 2**), inhiben parcialmente el crecimiento de *S. aureus* y *B. subtilis*. En tanto que, los extractos 01003-88-07 (fracción soluble de acetona de A1) y 01003-88-08 (fracción soluble de acetona de ISP2), presentaron también una inhibición parcial contra *B. subtilis*. Finalmente, los extractos obtenidos de la BM de LB y A1, 01003-88-26 y 01003-88-27, inhiben de manera parcial el crecimiento de *S. aureus* y *B. subtilis*, respectivamente.

En el caso, de la cepa 510 los extractos 01003-88-22 (BM de ISP2, **Tabla 2**) y 01003-88-24 (BM de A1, **Tabla 2**), inhiben parcialmente a las bacterias *S. aureus* y *B. subtilis*, y la muestra 01003-88-23 (BM de LB) sólo inhibe parcialmente a *B. subtilis*.

En conjunto estos resultados, permiten establecer la importancia del uso de resinas de mediana polaridad en el estudio químico de bacterias, ya que como se pudo observar, los extractos orgánicos que mostraron actividad biológica fueron obtenidos mediante la elución de la resina o la maceración de la biomasa y en ningún caso a partir de la extracción mediante un proceso de reparto de los medios de cultivo.

Tabla 3. Resultados de la evaluación de la actividad antimicrobiana de los extractos orgánicos.

Extracto 01003-88-	<i>C. albicans</i>	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. typhi</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>B. subtilis</i>
1						
2						
3 → 6						
7						
8						
9 → 12						
13						
14 → 18						
19						
20						
21						
22						
23						
24						
25						
26						
27						
28 – 29						
30						
31						
32						
33						
34 → 43						
44						
45 → 60						
CMI (µg/mL)	0.0009	0.0016	0.05	0.0125	0.00024	0.0004

	Ampicilina		Inhibición total a 200 µg/mL
	Vancomicina		Inhibición parcial a 200 µg/mL
	Gentamicina		Sin inhibición
	Nistatina		

5.2. Estudios químicos y de metabolómica de las bacterias seleccionadas.

5.2.1. Bacteria 1CA.

El perfil cromatográfico por HPLC de los extractos activos 01003-88-13, 01003-88-19, 01003-88-20, 01003-88-21 y 01003-88-44 obtenidos de la cepa 1CA se ilustran en la **Figura 8**. El análisis comparativo de estos cromatogramas, permitieron establecer que las muestras indicadas con las claves 01003-88-19 y 01003-88-21 mostraron un perfil cromatográfico muy similar, por lo que se decidió reunir las con base en esta similitud cromatográfica presentada.

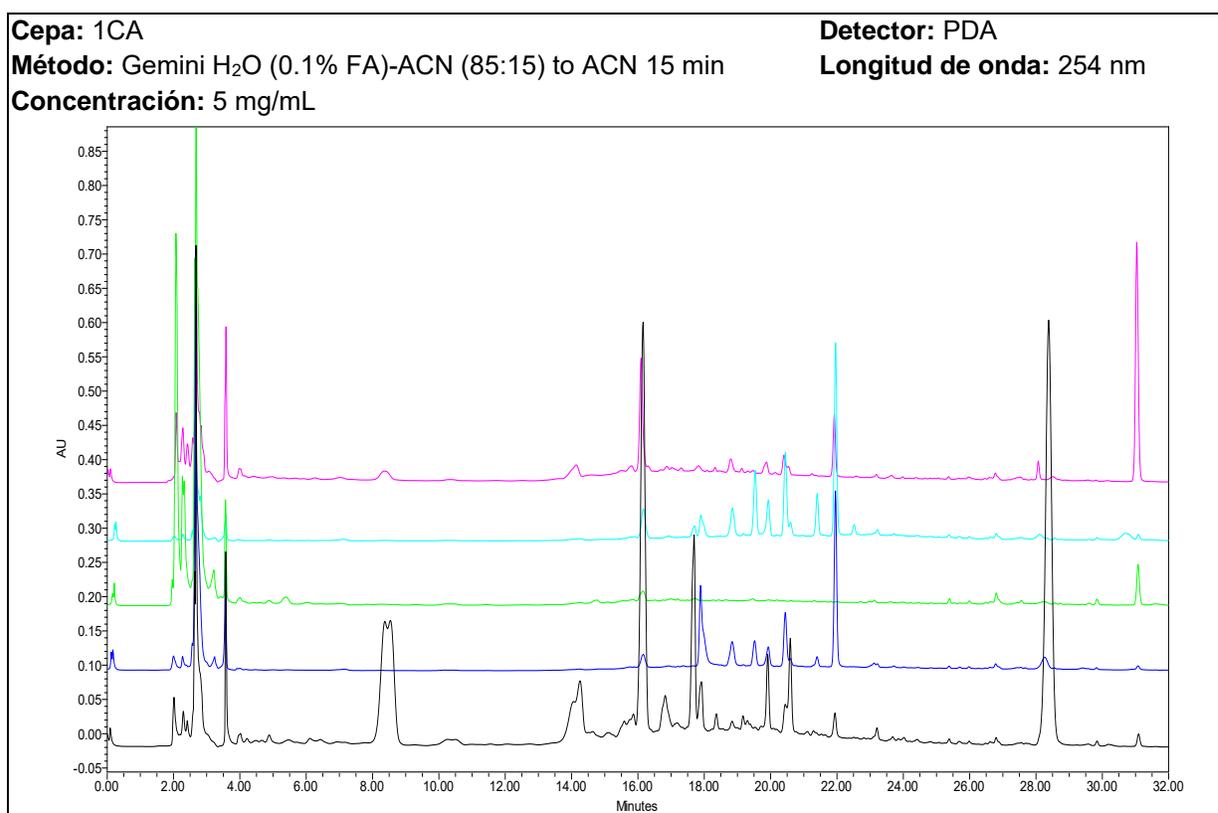


Figura 8. Cromatogramas por HPLC a nivel analítico de los extractos activos de la bacteria 1CA. En orden descendiente: 01003-88-44, 01003-88-21, 01003-88-20, 01003-88-19, 01003-88-13.

La resolución por HPLC de los extractos 01003-88-19 y 01003-88-21 reunidos (**Figura 9**, **Tabla 4**) condujo al aislamiento del compuesto mayoritario **1** (1.7 mg).

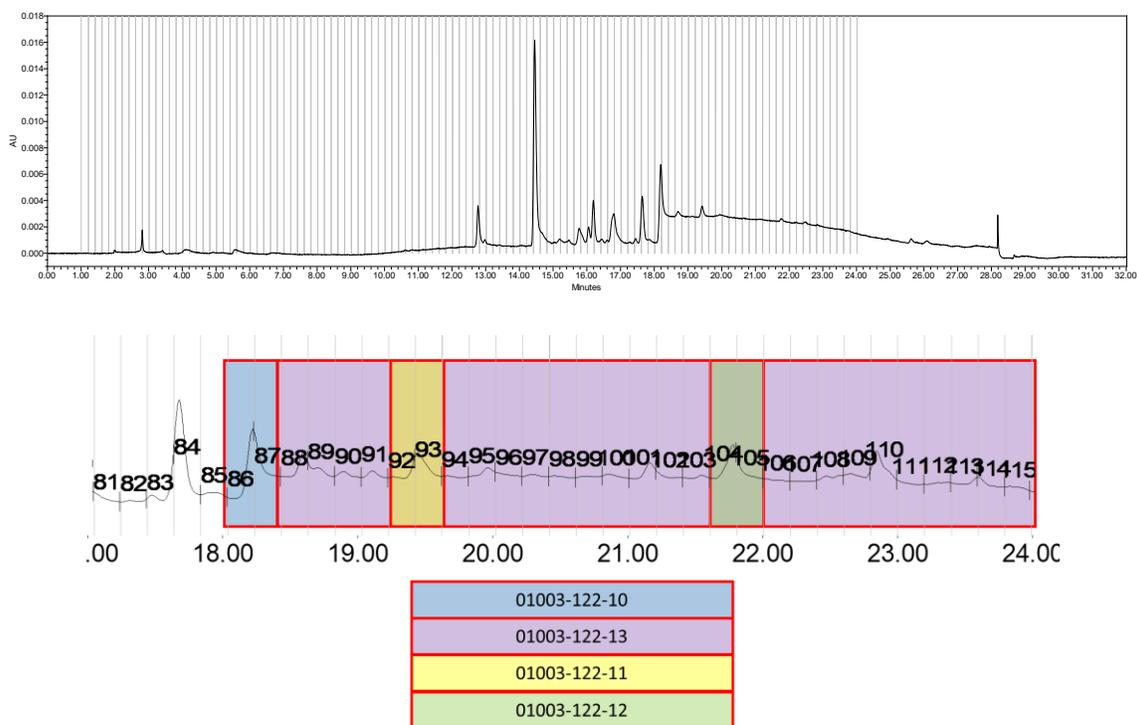


Figura 9. Cromatograma por HPLC del fraccionamiento primario de la reunión 01003-88-19 y 01003-88-21 (Detección: UV λ 365 nm).

Tabla 4. Fraccionamiento primario de la reunión 01003-88-19 y 01003-88-21 por HPLC.

Clave del extracto	Fracción	Clave	Rendimiento (mg)
01003-88-19 – 01003-88-21	9-10	01003-122-01	1.9
	16-17	01003-122-02	0.7
	59-60	01003-122-03	0.2
	62-63	01003-122-04	0.1
	67-68	01003-122-05	0.1
	74-75	01003-122-06	0.1
	76-77	01003-122-07	0.2
	79-80	01003-122-08	0.2
	83-84	01003-122-09	0.2
	86-87	01003-122-10	0.5
	92-93	01003-122-11*	0.7
	104-105	01003-122-12*	1.0
	88-91,94-103,105	01003-122-13*	38.7
	Remanente	01003-122-14	12.8
Recobro (mg)			57.4
Rendimiento (%)			113.4

*Fracciones analizadas por ^1H RMN.

El compuesto **1** fue aislado como un pigmento morado. Como se puede observar en el espectro de masas de alta resolución (HRESIMS) en modo (+) (**Figura 10**), este producto presenta un ión molecular en una relación m/z de 245.0553 $[M+H]^+$, que permitió establecer la fórmula molecular de $(C_{12}H_9O_4N_2)^+$ con un índice de deficiencia de hidrógeno (IDH) de 10.

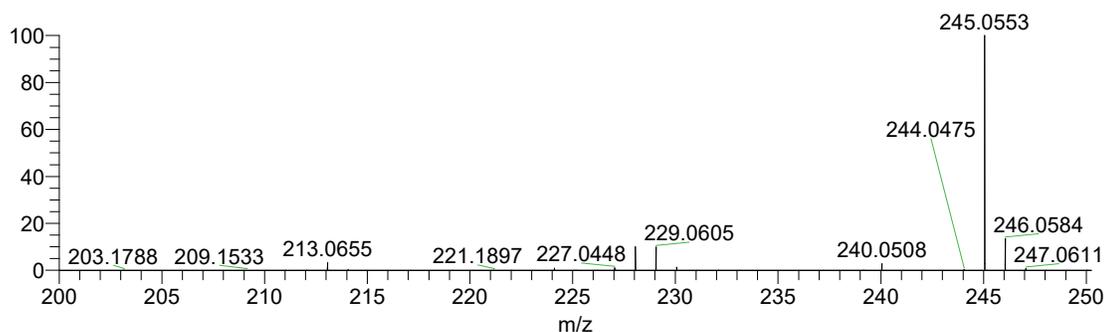


Figura 10. Espectro de HRESIMS en modo (+) de la yodinina (**1**) (m/z 245.0553 $[M+H]^+$).

En el espectro de 1H RMN (**Figura 11**) se observan únicamente en δ_H 7.15 (dd, $J = 1.04$, 7.92 Hz, 2H), 7.71 (td, $J = 7.97$, 8.98 Hz, 2H) y 8.02 (dd, $J = 1.03$, 9.03 Hz, 2H), tres conjuntos de señales características de la presencia de dos sistemas ABC de dos anillos aromáticos.

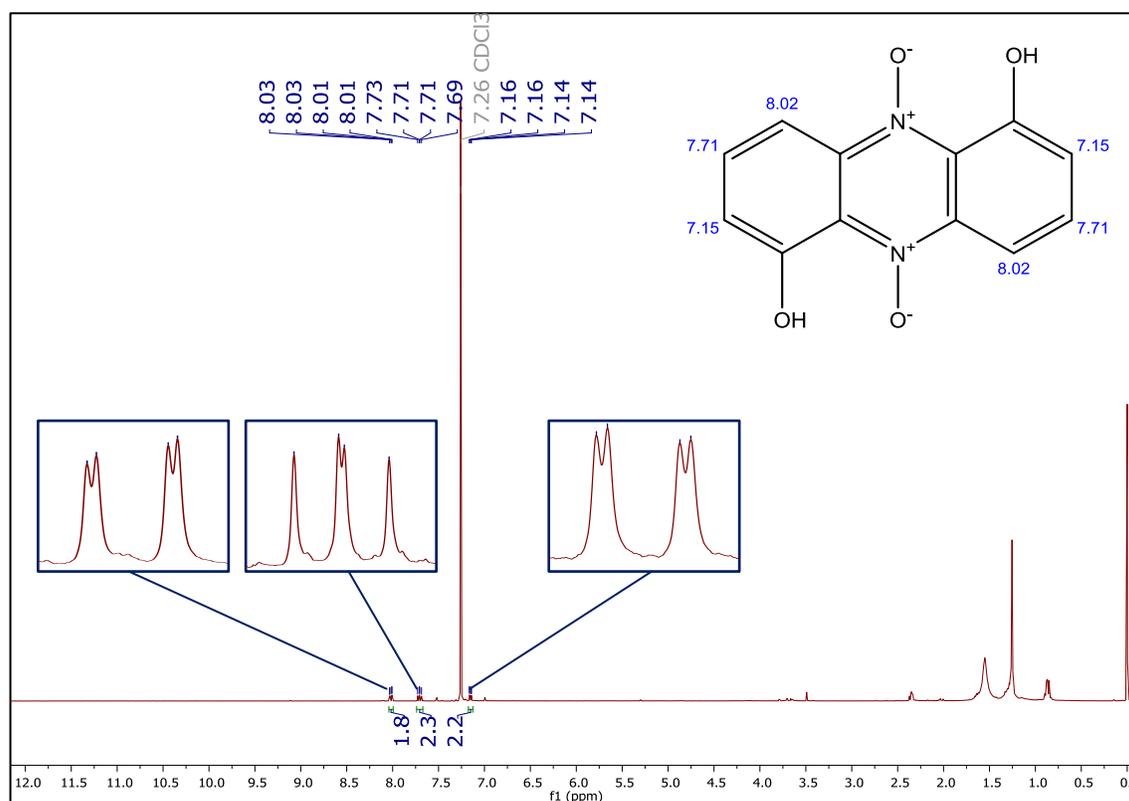


Figura 11. Espectro de 1H RMN de la yodinina (**1**) ($CDCl_3$).

En conjunto, la información obtenida por RMN y MS (Tsuji *et al.*, 1988; Zhao *et al.*, 2016), permitieron caracterizar a este producto natural como la yodinina (**1**). Este compuesto es un antibiótico derivado del óxido de fenazina producido por diversas bacterias de los géneros *Chromobacterium*, *Streptomyces*, *Nocardiosis*, *Arthrobacter*, *Streptosporangium*, *Microbispora*, *Brevibacterium*, *Actinomadura*, *Waksmania*, *Pseudomonas* y otros microorganismos (DNP, 2021). Los *N*-óxidos aromáticos heterocíclicos son productos naturales con importantes actividades biológicas; en el caso particular del compuesto **1**, este metabolito presenta actividad antibacteriana contra Gram positivos, hongos filamentosos y levaduras (DNP, 2021), lo cual se encuentra en armonía con los resultados obtenidos en este proyecto de investigación. Recientemente, se ha reportado que algunos derivados halogenados de fenazinas inhiben a las biocapas formadas por *Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina (MRSA) y a *Mycobacterium tuberculosis* (Zhao *et al.*, 2016).

Desde el punto de vista biosintético la síntesis del compuesto **1** ha sido ampliamente estudiada y deriva de la ruta del ácido siquímico (Herbert *et al.*, 1979) (**Figura 12**).

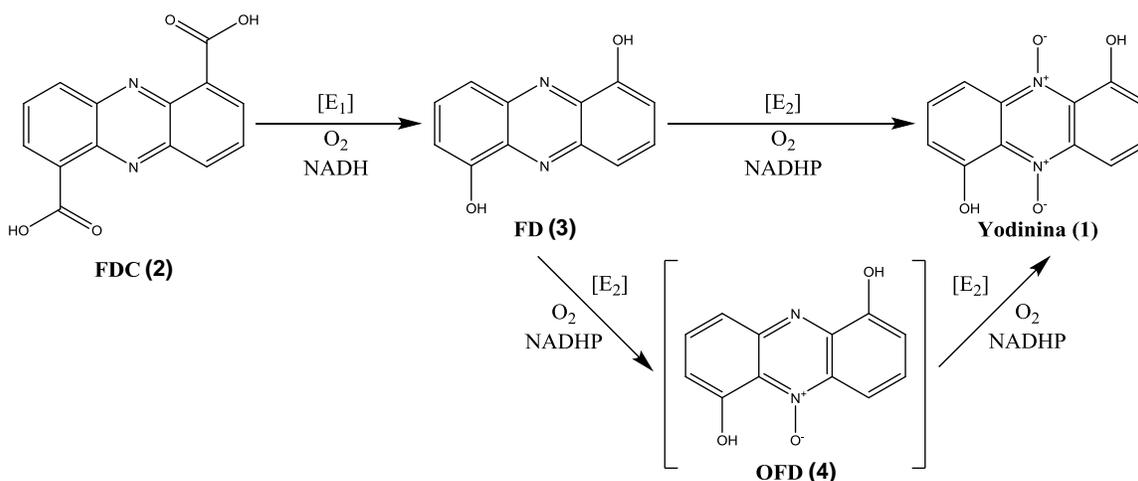


Figura 12. Biosíntesis de la yodinina (**1**) y otras fenazinas (1,6-fenazindiol (**FD; 3**) y 5-óxido del 1,6-fenazindiol (**OFD;4**) a partir del ácido 1,6-dicarboxílico de la fenazina (**FDC; 2**).

Analizando la coexistencia de **1** con algunos de sus precursores indicados en la **Figura 12**, se realizó el análisis detallado del cromatograma obtenido por UPLC-HRESIMS del extracto 01003-88-21 con la finalidad de identificar a **FD (3)** y su derivado *N*-óxido, **OFD (4)**. Los resultados obtenidos en estos análisis se indican en las **Figuras 13 y 14**.

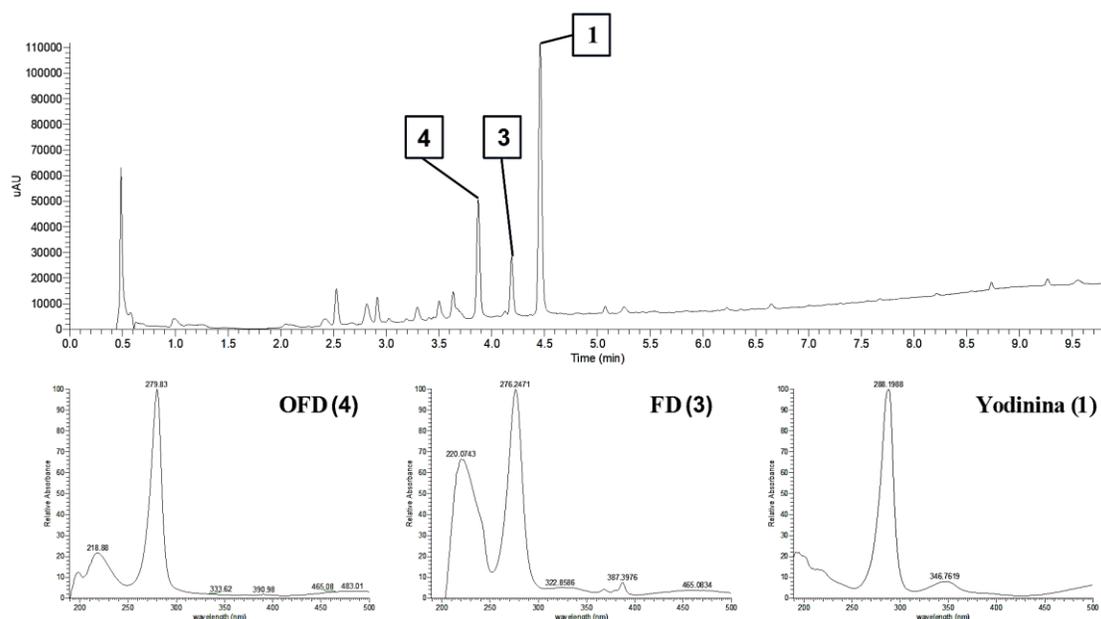


Figura 13. Perfil cromatográfico por UPLC del extracto 01003-88-21 [Detección: UV λ 254 nm (arriba) y perfiles UV-Vis de los componentes analizados (abajo)].

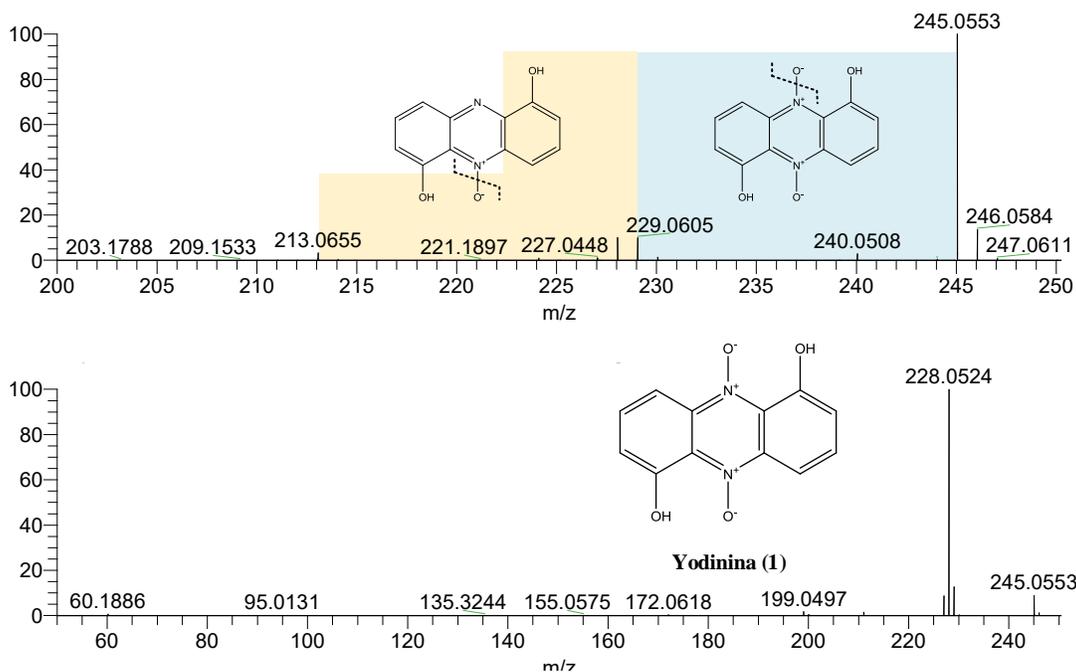


Figura 14. Espectros de MS (arriba) y MS² (abajo) obtenidos por HRESIMS en modo (+) para el compuesto **1** (m/z 245.0553 [M+H]⁺).

Los espectros de masas MS y MS² de estos componentes, en conjunto con los previamente discutidos para la caracterización de **1**, permitieron identificar nuevamente este compuesto en coexistencia con compuestos **4** con un tiempo de retención (t_R) de 3.87 min y **3** con un

t_R de 4.19 min. Las propiedades espectroscópicas de **3** y **4** (Figuras 15 y 16) se resumen a continuación:

(3) UV λ_{max} , 276, 330, 368, 387, 465 nm (MeOH-Dioxano); HRMS m/z 213.0655 $[M+H]^+$, calculado para $(C_{12}H_9N_2O_2)^+$, IDH = 10.

(4) UV λ_{max} , 280, 360, 390, 478 nm (MeOH-Dioxano); HRMS m/z 229.0605 $[M+H]^+$, calculado para $(C_{12}H_9N_2O_3)^+$, IDH = 10.

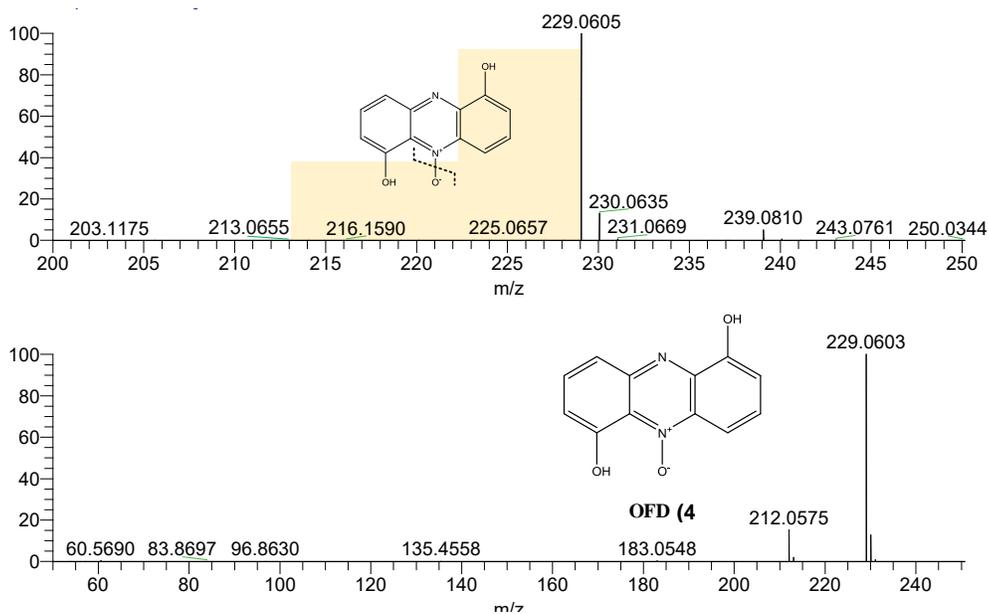


Figura 15. Espectros de MS (arriba) y MS² (abajo) obtenidos por HRESIMS en modo (+) para el compuesto **4** (m/z 229.0605 $[M+H]^+$).

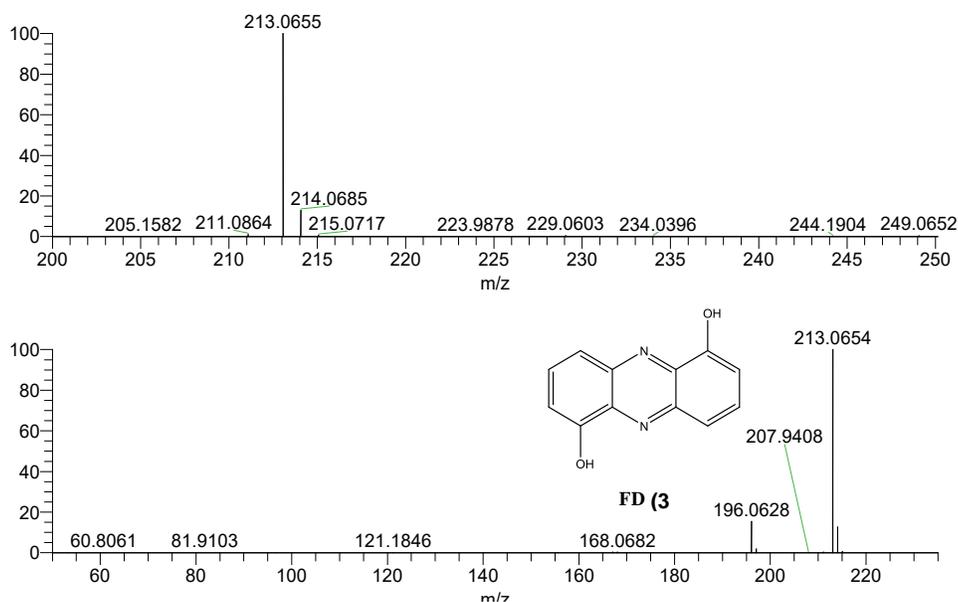


Figura 16. Espectros de MS (arriba) y MS² (abajo) obtenidos por HRESIMS en modo (+) para el compuesto **3** (m/z 213.0655 $[M+H]^+$).

La búsqueda de las masas exactas indicadas de **3** y **4** en la base de datos del Diccionario de Productos Naturales y la comparación directa de las propiedades espectroscópicas de estos dos compuestos con aquellas previamente publicadas (Zhao *et al.*, 2016; Jiang *et al.*, 2018) están en armonía con la propuesta estructural del 1,6-fenazindiol (FD) y el 5-óxido de 1,6-fenazindiol (OFD) respectivamente. Así, se propone que la bacteria 1CA acumula intracelularmente no sólo al antibiótico yodinina (**1**), sino que también al intermediario OFD (**4**) y su precursor FD (**3**).

Por último, con la finalidad de explorar la diversidad química preliminar de este organismo, se realizó el análisis de redes moleculares en la plataforma GNPS con los resultados obtenidos por UPLC-HRESIMS-MS/MS (**Figura 17**).

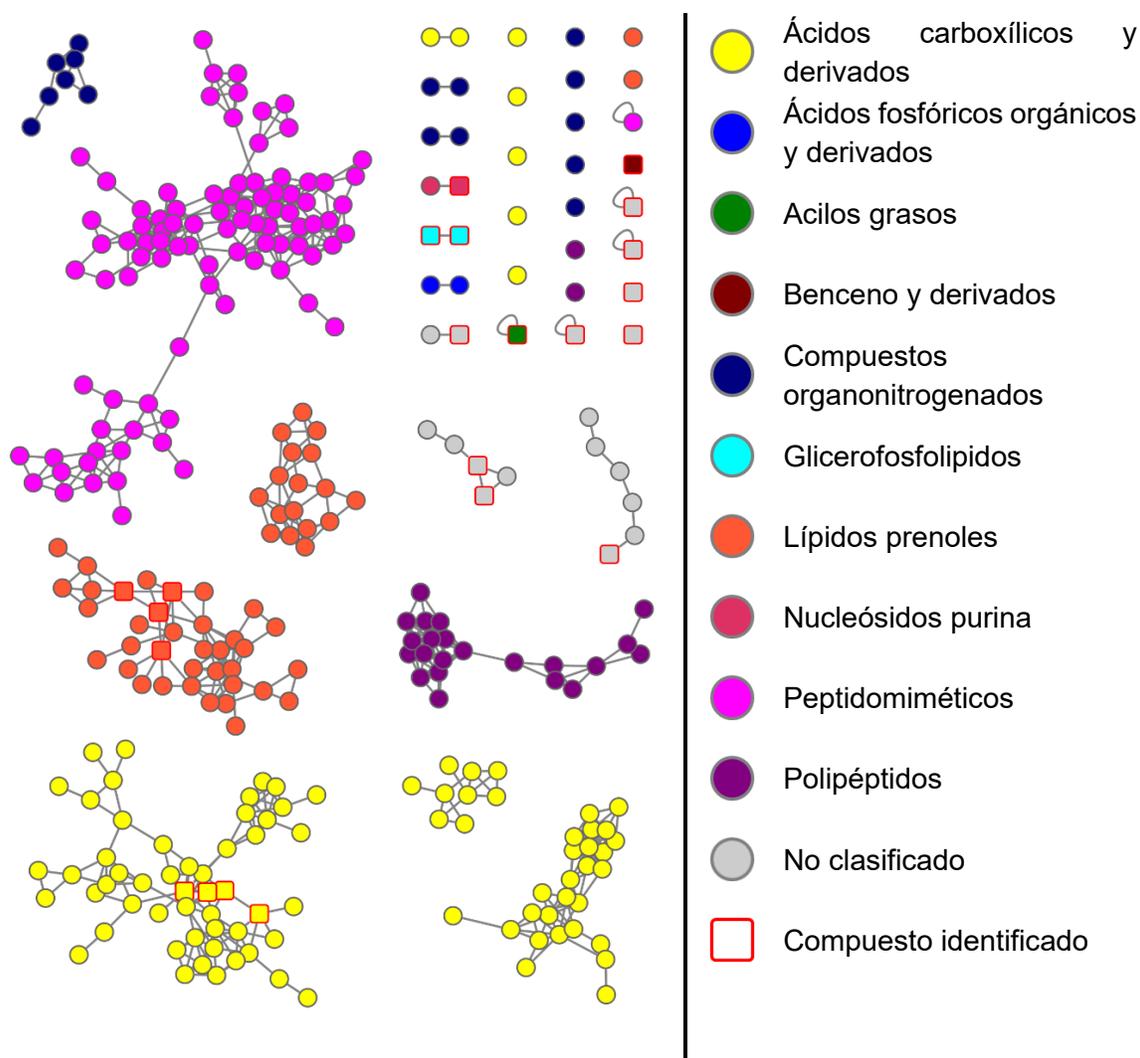


Figura 17. Red molecular de los extractos de la bacteria 1CA. Los nodos de cada clase química son coloreados con base en lo indicado en la leyenda.

Los resultados cuantitativos de las clasificaciones estructurales a los niveles de Superclase, Clase y Subclase, para todos los nodos presentes en la red molecular de la bacteria 1CA se resumen en la (Tabla 5). A través de este análisis se identificó el 94.1% de los nodos presentes en la red, los cuales se distribuyeron en 6 superclases, 10 clases y 9 subclases. Cabe mencionar que el número de subclases es menor al número de clases debido a que, en algunos casos, no fue posible establecer la subclase para la clasificación química. Para esta bacteria, predomina la Superclase de los ácidos orgánicos y derivados con el 61.3% de los nodos. Esta a su vez se encuentra dividida en dos clases, la de los ácidos carboxílicos y derivados, y la de los peptidomiméticos (subclases: aminoácidos, péptidos y análogos y depsipéptidos). Por último, no se identificaron otros metabolitos para este organismo mediante la anotación automática por GNPS, por lo que representa un candidato adecuado para estudios químicos posteriores con la finalidad de obtener nuevas entidades químicas.

Tabla 5. Resultados cuantitativos de la clasificación química estructural del perfil químico de la bacteria 1CA.

Superclase	Clase	Subclase	Nodos	Porcentaje
Bencenoides	Benceno y derivados sustituidos	Ácidos benzoicos y derivados	1	0.3%
Lípidos y moléculas similares a lípidos	Acilos grasos	Ácidos grasos y conjugados	1	0.3%
	Glicerofosfolípidos	Glicerofosfo-colinas	2	0.7%
	Lípidos prenoles	Diterpenoides	55	17.9%
No clasificado	No clasificado	No clasificado	18	5.9%
Nucleósidos, nucleótidos y análogos	Nucleósidos de purina	Subclase no identificada	2	0.7%
Ácidos orgánicos y derivados	Ácidos carboxílicos y derivados	Aminoácidos, péptidos y análogos	93	30.3%
		Ácidos tetracarboxílicos y derivados	1	0.3%
	Ácidos fosfóricos orgánicos y derivados	Ésteres de fosfato	2	0.7%
	Peptidomiméticos	Depsipéptidos	92	30.0%
Compuestos de nitrógeno orgánico	Compuestos organonitrogenados	Aminas	16	5.2%
Polímeros orgánicos	Polipéptidos	Subclase no identificada	24	7.8%
Total			307	100.0%

5.2.2. Bacteria 3CA.

Los perfiles cromatográficos por HPLC de los extractos activos 01003-88-30 al 01003-88-33 de la cepa 3CA se ilustran en la **Figura 18**. Se puede observar que todas las muestras presentan una gran similitud cromatográfica. De acuerdo con estos resultados y considerando el rendimiento obtenido del extracto 01003-88-31, se inició su estudio químico. La separación por HPLC de esta muestra (**Figura 19**) generó un conjunto de 16 fracciones (**Tabla 6**).

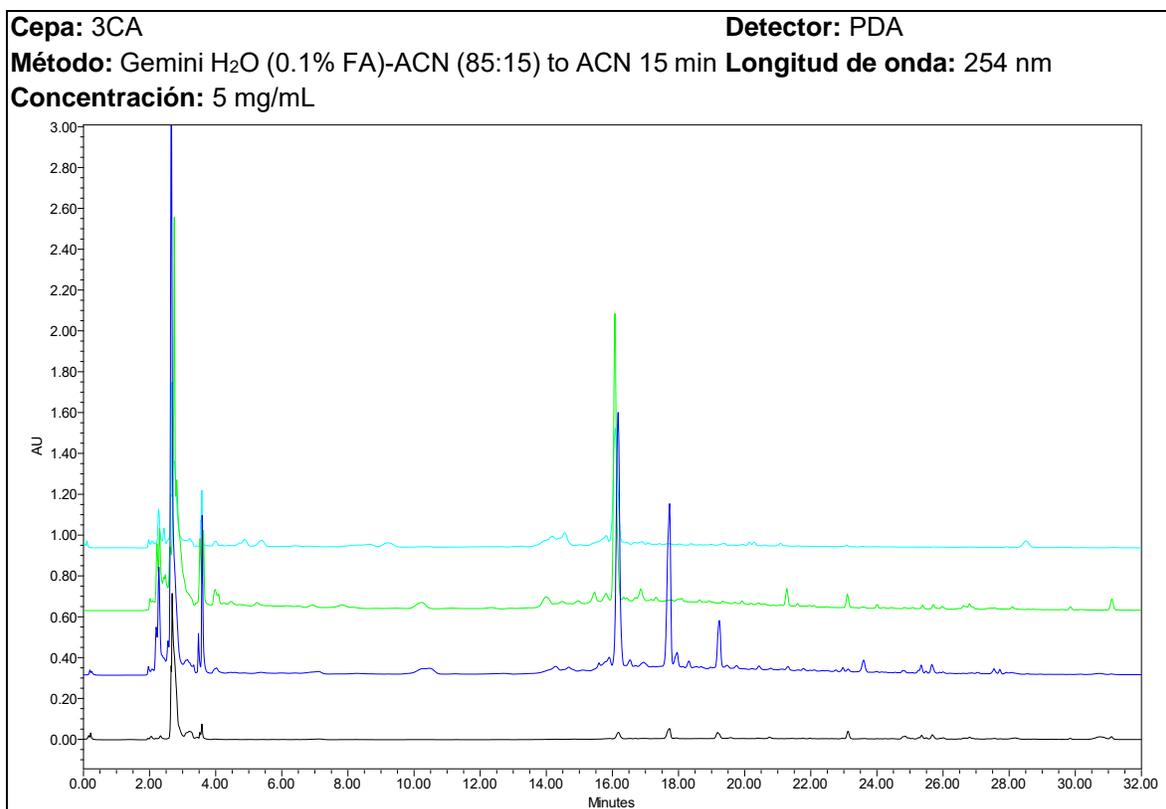


Figura 18. Cromatogramas por HPLC a nivel analítico de los extractos activos de la bacteria 3CA. En orden descendente: 01003-88-33, 01003-88-32, 01003-88-31, 01003-88-30.

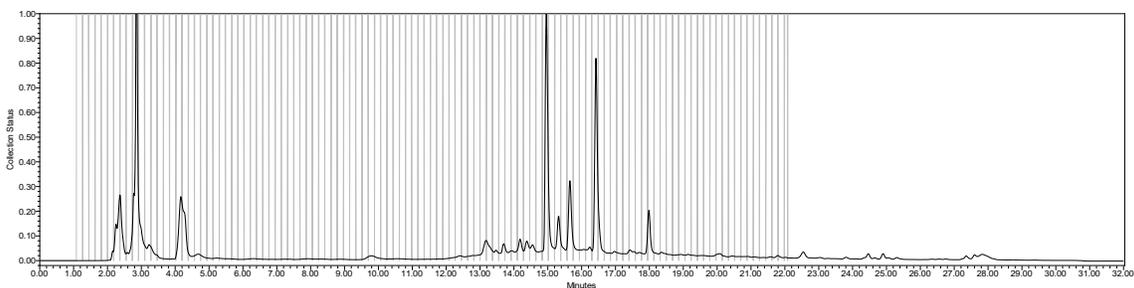


Figura 19. Cromatograma del fraccionamiento primario del extracto 01003-88-31 por HPLC (detección: λ 254 nm).

Tabla 6. Fraccionamiento primario del extracto 01003-88-31 por HPLC.

Clave del extracto	Fracción	Clave de la fracción	Rendimiento (mg)
01003-88-31	5-8	01003-120-01	0.4
	10-11	01003-120-02	0.3
	12-13	01003-120-03	0.5
	17-18	01003-120-04	0.0
	47-49	01003-120-05	0.3
	66-67	01003-120-06	0.1
	69-70	01003-120-07	0.0
	72	01003-120-08	0.1
	73	01003-120-09	0.0
	74	01003-120-10	0.2
	76-77	01003-120-11*	0.2
	78	01003-120-12	0.1
	80-81	01003-120-13*	0.2
	84-85	01003-120-14*	0.3
	92-93	01003-120-15	0.2
	103-104	01003-120-16	0.5
	115-End	01003-120-17	1.8
	Restante	01003-120-18	2.6
		Recuperado (mg)	7.8
		Rendimiento (%)	62.4

*Fracciones analizadas por ^1H RMN.

Como se puede observar en la **Tabla 6** los rendimientos de las fracciones obtenidas son muy bajos para poder ser analizados por ^1H RMN, por lo que se realizó el análisis comparativo de los espectros en el UV y de los tiempos de retención de los componentes mayoritarios presentes, de manera que se pudieran encontrar componentes en común en algunas muestras obtenidas a partir de otros extractos, tanto de esta bacteria como de las otras tres bacterias estudiadas. Los resultados de este análisis se encuentran en proceso.

Por otra parte, los extractos 01003-88-32 y 01003-88-33 fueron reunidos para su posterior fraccionamiento con base en los resultados obtenidos a partir de la evaluación biológica además de la similitud cromatográfica (**Figura 18**). Los resultados del fraccionamiento por HPLC se resumen en la **Figura 20** y **Tabla 7**.

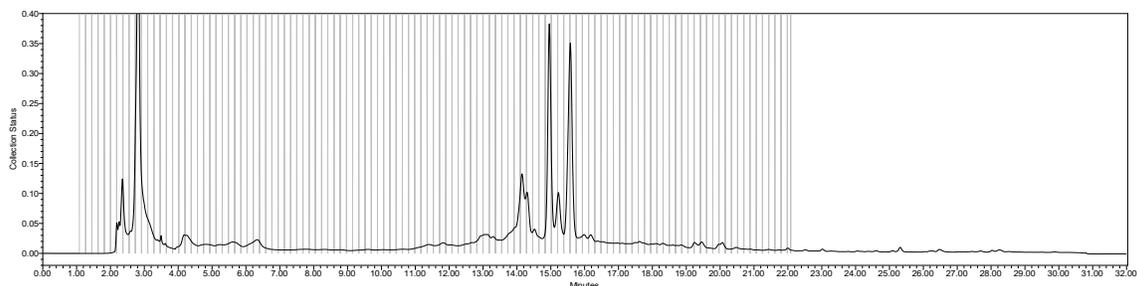


Figura 20. Cromatograma por HPLC del fraccionamiento primario de las fracciones 01003-88-32-01003-88-33 (Detección: UV λ 365 nm).

Tabla 7. Fraccionamiento primario los extractos 01003-88-32 y 01003-88-33 por HPLC.

Clave del extracto	Fracción	Clave de la fracción	Rendimiento (mg)
01003-88-32 – 01003-88-33	7-8	01003-121-01	0.3
	9-11	01003-121-02	1.3
	17-19	01003-121-03	0.6
	24-26	01003-121-04	0.9
	28-30	01003-121-05	1.6
	65-67	01003-121-06	1.1
	71-73	01003-121-07*	1.8
	76	01003-121-08*	0.2
	78	01003-121-09	0.5
	79-80	01003-121-10*	0.7
	115-End	01003-121-11	5.2
	Restante	01003-121-12	11.0
		Recuperado (mg)	25.2
		Rendimiento (%)	102.0

*Fracciones analizadas por ^1H RMN.

De la misma forma que para la bacteria 1CA, se realizó la red molecular a partir de los con datos de HRESIMS del extracto (**Figura 21**). Los resultados obtenidos a partir de este análisis permitieron identificar a 7 clases químicas, predominando la de los peptidomiméticos. Cabe destacar que este análisis no permitió clasificar estructuralmente a la mayoría de los compuestos agrupados en la red.

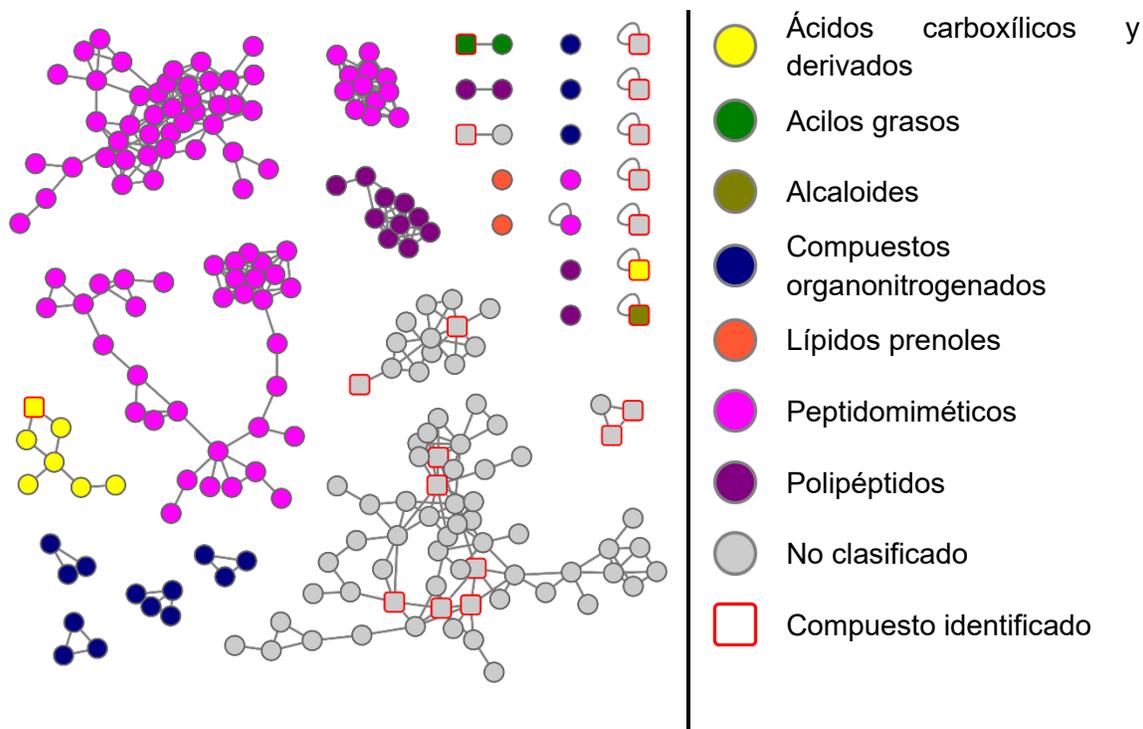


Figura 21. Red molecular de los extractos de la bacteria 3CA. Los nodos de cada clase química son coloreados con base en lo indicado en la leyenda.

El análisis cuantitativo de las clasificaciones estructurales de esta red (**Tabla 8**) permitió clasificar al 63.1% de los nodos en 5 superclases, 7 clases y 6 subclases, predominando la superclase de los ácidos orgánicos y derivados con un 46.7% de los nodos, para la cual se encuentra como única clase mayoritaria la de los peptidomiméticos con la subclase de depsi péptidos. Adicionalmente, se encontró la presencia de un nodo de la superclase de los alcaloides y derivados.

El análisis comparativo de la diversidad química de esta cepa con respecto a las otras estudiadas, nos permite concluir que esta cepa presentó la tercera mayor diversidad en número de clases y de nodos atribuibles a su perfil químico, además de ser la única en la cual se observó la presencia de la subclase híbridos péptidos-peptoides (0.5%) (**Tabla 8**). De igual forma que en la bacteria 1CA, no se identificaron otros metabolitos para este organismo mediante la anotación automática por GNPS, por lo que representa otro candidato adecuado para estudios químicos posteriores.

Tabla 8. Resultados cuantitativos de la clasificación química estructural atribuible al perfil químico de la bacteria 3CA.

Superclase	Clase	Subclase	Nodos	Porcentaje
Alcaloides y derivados	Alcaloides de tipo Corinanteanos	Subclase no identificada	1	0.5%
Lípidos y moléculas similares a lípidos	Acilos grasos	Ácidos grasos y conjugados	2	0.9%
	Lípidos prenoles	Diterpenoides	2	0.9%
No clasificado	No clasificado	No clasificado	79	36.9%
Ácidos orgánicos y derivados	Ácidos carboxílicos y derivados	Aminoácidos, péptidos y análogos	8	3.7%
		Depsipéptidos	91	42.5%
	Peptidomiméticos	Híbridos péptidos-peptoides	1	0.5%
Compuestos de nitrógeno orgánico	Compuestos organonitrogenados	Aminas	16	7.5%
Polímeros orgánicos	Polipéptidos	Subclase no identificada	14	6.5%
Total			214	100.0%

5.2.3. Bacteria 8CA.

Con base en los resultados obtenidos a partir de la evaluación biológica de la bacteria 8CA, así como del análisis del perfil cromatográfico de sus extractos 01003-88-7 y 01003-88-27 (**Figura 22**), se realizó la reunión de éstas últimas muestras para su posterior separación por HPLC. Los resultados de este proceso cromatográfico se resumen en la **Tabla 9** y en la **Figura 23**.

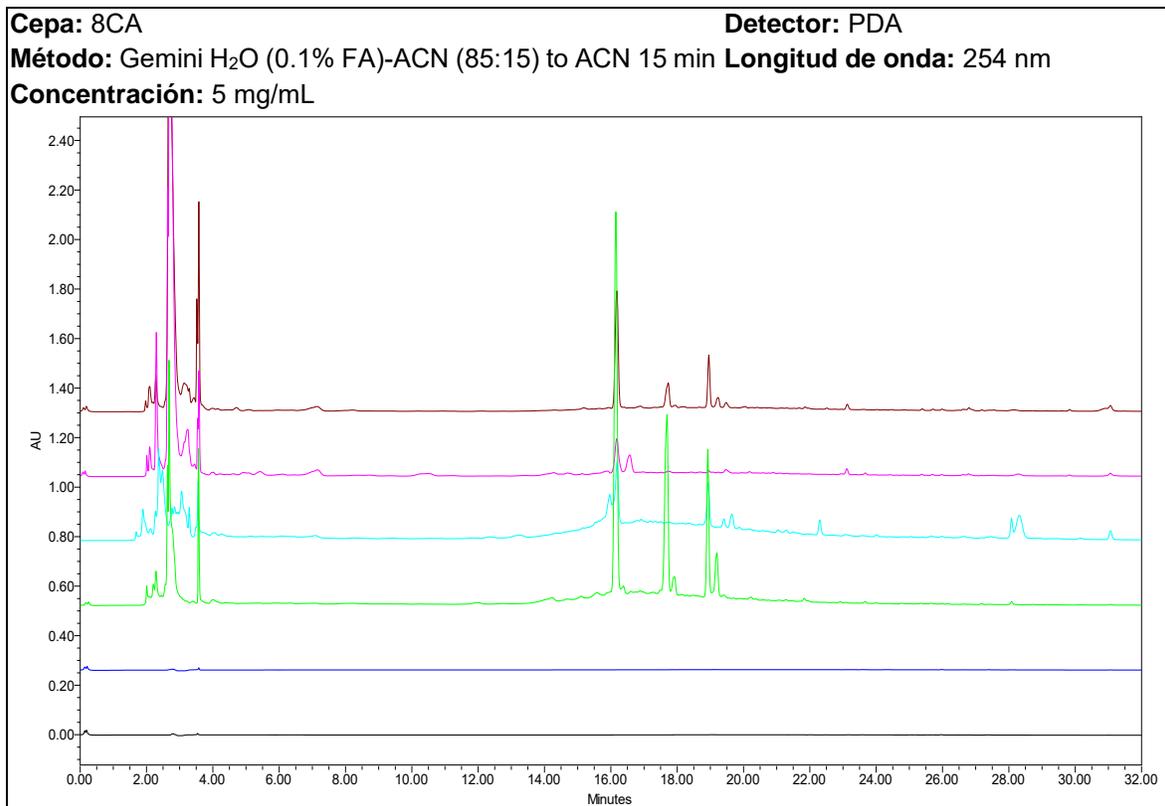


Figura 22. Cromatogramas por HPLC a nivel analítico de los extractos activos de la bacteria 8CA. En orden descendente 01003-88-27, 01003-88-26, 01003-88-08, 01003-88-07, 01003-88-02, 01003-88-01.

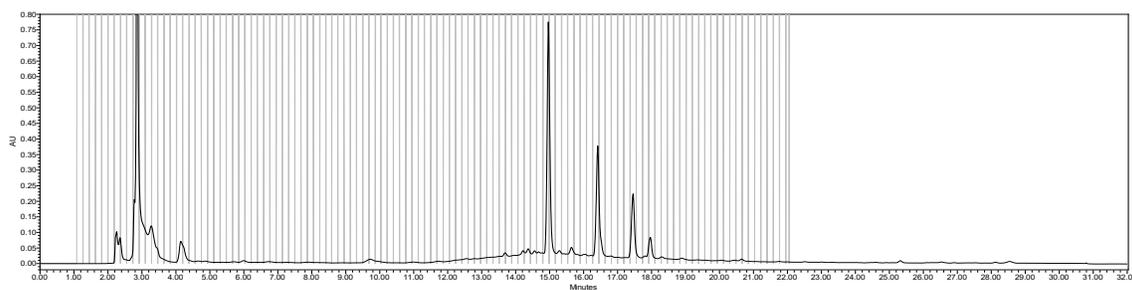


Figura 23. Cromatograma por HPLC del fraccionamiento primario de la reunión 01003-88-07 y 01003-88-27 (Detección: UV λ 365 nm).

Tabla 9. Fraccionamiento primario los extractos 01003-88-7 y 01003-88-27 por HPLC.

Clave del extracto	Fracción	Clave de la fracción	Rendimiento (mg)
01003-88-07	7-8	01003-119-01	0.3
	10-11	01003-119-02	1.0
	12-14	01003-119-03	0.5
	17-18	01003-119-04	0.0
	27-29	01003-119-05	0.3
	46-49	01003-119-06	0.6
	76-77	01003-119-07*	0.5
01003-88-27	80	01003-119-08	0.1
	84-85	01003-119-09*	0.4
	89-90	01003-119-10	0.2
	93	01003-119-11	0.0
	115-End	01003-119-12	3.0
	Restante	01003-119-13	6.8
Recuperado (mg)			13.7
Rendimiento (%)			96.5

*Fracciones analizadas por ¹H RMN.

La red molecular generada con los datos de HRESIMS de los extractos activos de esta bacteria (**Figura 24**) permitió identificar 10 clases químicas, predominando la de los ácidos carboxílicos y derivados y la de los compuestos organonitrogenados. Por otra parte, la mayoría de los compuestos identificados no pudieron ser clasificados estructuralmente. El análisis cuantitativo de la diversidad química de las muestras permitió identificar la clasificación del 65.8% de los nodos presentes, distribuidos en 8 superclases, 10 clases y 9 subclases.

Para esta bacteria predomina la superclase de los ácidos orgánicos y derivados con un 31.9% de los nodos, siendo la clase mayoritaria la de los ácidos carboxílicos y derivados y su subclase aminoácidos, péptidos y análogos (**Tabla 10**). Cabe resaltar que para esta bacteria al igual que para la cepa 3CA, se encontró la presencia de la clase de alcaloides en dos nodos (0.6% del total) en la red molecular. Por otra parte, la diversidad química observada para esta cepa con respecto a las otras cepas analizadas nos permite concluir que este organismo presenta la mayor diversidad en cuanto a número de clases y número de nodos atribuibles a su perfil químico, además de ser la única en la cual se observó la presencia de las superclases de compuestos orgánicos heterocíclicos, fenilpropanoides y policétidos, con las respectivas clases de dioxanos (0.6%) y macrolactamas (2.6%). Adicionalmente, en esta bacteria solamente se encontraron las subclases de 1,2-dioxanos (0.6%), de ácidos carboxílicos y derivados (0.9%), de amidas grasas (10.8%) y de péptidos híbridos (1.1%).

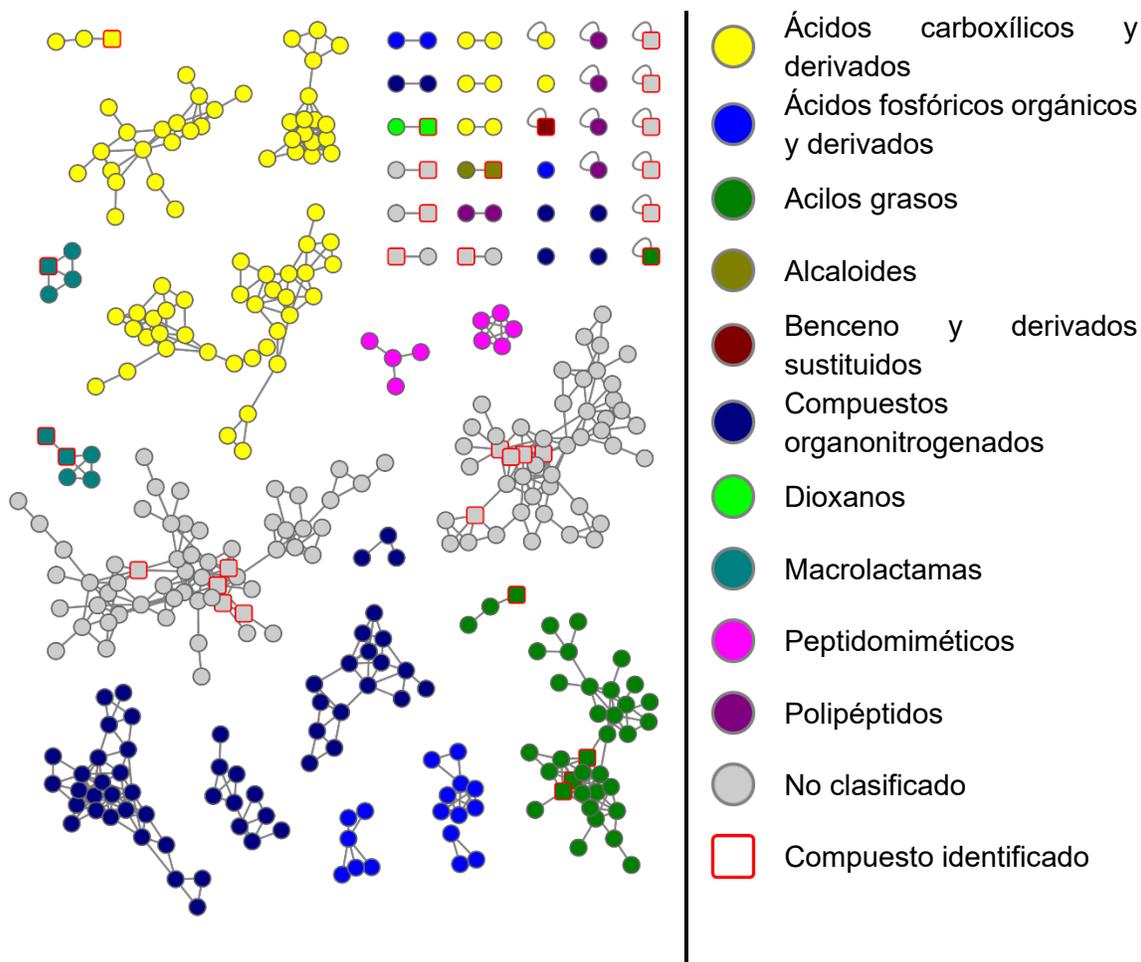


Figura 24. Red molecular de los extractos de la bacteria 8CA. Los nodos de cada clase química son coloreados con base en lo indicado en la leyenda.

Cabe destacar que para esta bacteria se anotaron cuatro compuestos mediante GNPS (**Tabla 11**). La macrolactama bisucaberina es un sideróforo que aumenta la sensibilidad de células tumorales a la citosis mediada por macrófagos (Fujita *et al.*, 2013). Este compuesto ha sido previamente aislado de los microorganismos marinos *Alteromonas haloplanktis*, *Shewanella algae* y *Vibrio salmonicida*, así como del actinomiceto terrestre CKK784. La macrolactama deferoxamina E también es un sideróforo, antitumoral, antioxidante y antimicrobiano contra micobacterias (Matsubara *et al.*, 1998). Este compuesto ha sido previamente aislado de *Nocardia* sp., *Pseudomonas stutzeri*, *S. hygrosopicus*, el actinomiceto terrestre CKK 784, *Citricoccus* sp. KMM 3890 y *Streptomyces* sp. M1087. La deferoxamina tiene actividades inmunosupresoras, anti-VIH y antineoplásicas, además es un agente quelante para la movilización de hierro con baja toxicidad oral (Bower *et al.*, 1984). Este compuesto ha sido previamente aislado de *S. pilosus*. Por último, se identificó a la feroxamina B, agente antibacteriano contra organismos Gram positivo (Kornreich-Leshem *et al.*, 2005) aislado de *S. pilosus*.

Tabla 10. Resultados cuantitativos de la clasificación química estructural atribuible al perfil químico de la bacteria 8CA.

Superclase	Clase	Subclase	Nodos	Porcentaje
Alcaloides y derivados	Alcaloides de tipo Corinanteanos	Subclase no identificada	2	0.6%
Bencenoides	Benceno y derivados sustituidos	Ácidos benzoicos y derivados	1	0.3%
Lípidos y moléculas similares a lípidos	Acilos grasos	Amidas grasas	38	10.8%
No clasificado	No clasificado	No clasificado	120	34.2%
Ácidos orgánicos y derivados	Ácidos carboxílicos y derivados	Aminoácidos, péptidos y análogos	80	22.8%
		Ácidos carboxílicos y derivados	3	0.9%
	Ácidos fosfóricos orgánicos y derivados	Ésteres de fosfato	20	5.7%
	Peptidomiméticos	Depsipéptidos	5	1.4%
		Péptidos híbridos	4	1.1%
Compuestos de nitrógeno orgánico	Compuestos organonitrogenados	Aminas	61	17.4%
Polímeros orgánicos	Polipéptidos	Subclase no identificada	6	1.7%
Compuestos orgánicos heterocíclicos	Dioxanos	1,2-dioxanos	2	0.6%
Fenilpropanoides y policétidos	Macrolactamas	Subclase no identificada	9	2.6%
Total			351	100.0%

Tabla 11. Compuestos con actividad biológica identificados en la red molecular de los extractos de la bacteria 8CA.

Compuesto	Superclase [score]; Clase [Score]	Masa parental [Aducto]	Cosine [Librería]	Error (ppm)	Referencia
Bisucaberina	Fenilpropanoides y policétidos [0.2]; Macrolactamas [0.2]	401.239 [M+H] ⁺	0.86 [3]	2.4339	(Fujita et al., 2013)
Deferoxamina E	Fenilpropanoides y policétidos [0.2]; Macrolactamas [0.2]	601.355 [M+H] ⁺	0.86 [3]	1.7254	(Matsubara et al., 1998)
Deferoxamina	Lípidos y moléculas similares a lípidos [0.03]; Acilos grasos [0.03]	561.36 [M+H] ⁺	0.93 [3]	1.7396	(Bowern et al., 1984)
Feroxamina B	Lípidos y moléculas similares a lípidos [1]; Acilos grasos [1]	614.271 [M+H] ⁺	0.77 [3]	1.5898	(Kornreich-Leshem et al., 2005)

5.2.4. Bacteria 510.

El estudio químico de la bacteria 510 se inició mediante el fraccionamiento preliminar de la reunión de los extractos 01003-88-22 y 01003-88-23 considerando la similitud cromatográfica (**Figura 25**). Los resultados de este proceso cromatográfico se resumen en la **Tabla 12** y en la **Figura 26**. De igual forma que para las bacterias 3CA y 8CA, las cantidades obtenidas de este fraccionamiento no permitieron realizar el análisis por ¹H RMN de ninguna de las fracciones primarias.

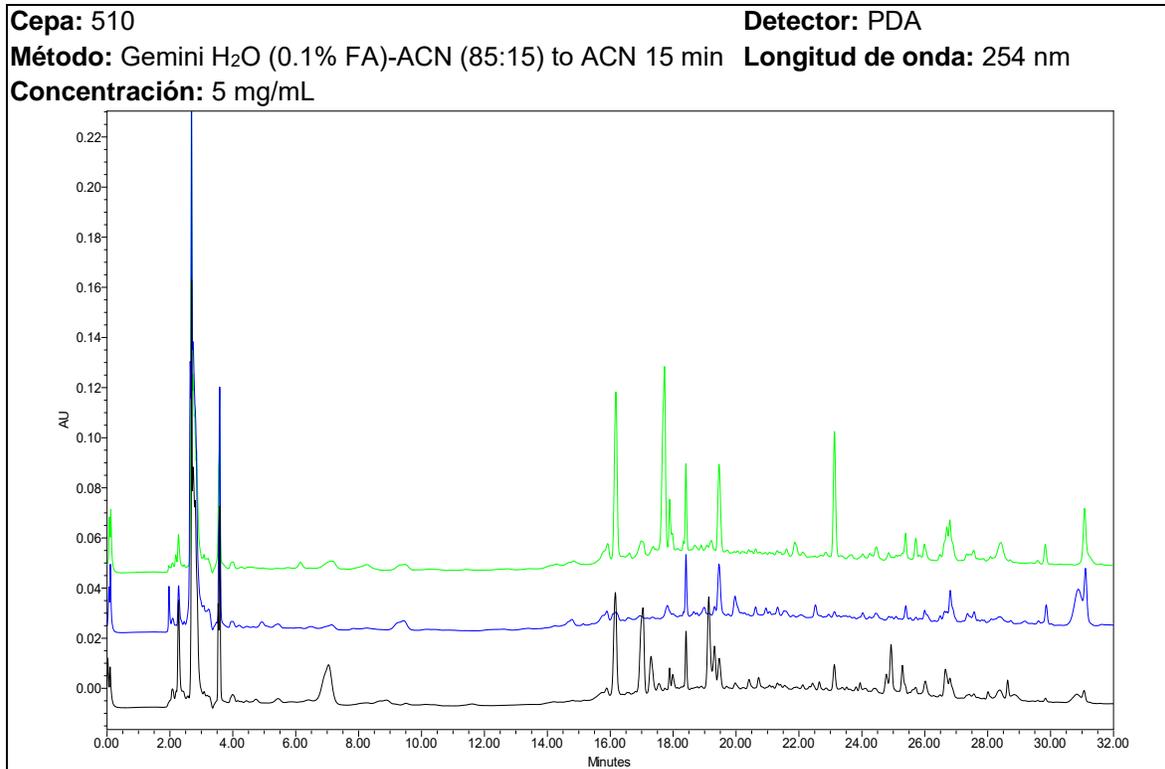


Figura 25. Cromatogramas por HPLC a nivel analítico de los extractos activos procedentes de la bacteria 510. En orden descendente: 01003-88-24, 01003-88-23, 01003-88-22.

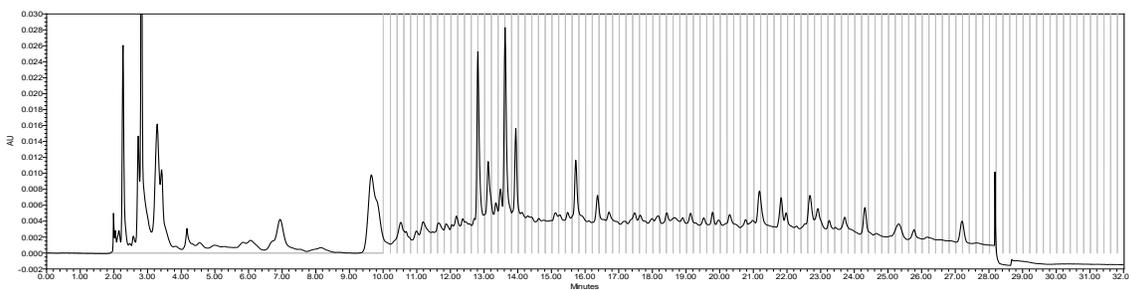


Figura 26. Cromatograma por HPLC del fraccionamiento primario de la reunión 01003-88-22 y 01003-88-23 (Detección: UV λ 365 nm).

Tabla 12. Fraccionamiento primario los extractos 01003-88-22 y 01003-88-23 por HPLC.

Clave del extracto	Fracción	Clave de la fracción	Rendimiento (mg)
01003-88-22 – 01003-88-23	3-4	01003-123-01	0.9
	14-15	01003-123-02	0.0
	16	01003-123-03	0.4
	18-19	01003-123-04	0.2
	20	01003-123-05	0.0
	24	01003-123-06	0.1
	32-33	01003-123-07	0.4
	56-57	01003-123-08	0.4
	64	01003-123-09	0.0
	69	01003-123-10	0.3
	72	01003-123-11	1.2
	86-87	01003-123-12	2.4
	Restante	01003-123-13	20.2
		Recuperado (mg)	26.5
		Rendimiento (%)	84.4

Por otra parte, los resultados de la red molecular generada con los datos de HRESIMS de los extractos activos de esta bacteria se ilustran en la **Figura 27**. Se observa la presencia de 6 clases químicas, siendo las principales la de los lípidos prenoles y los polipéptidos.

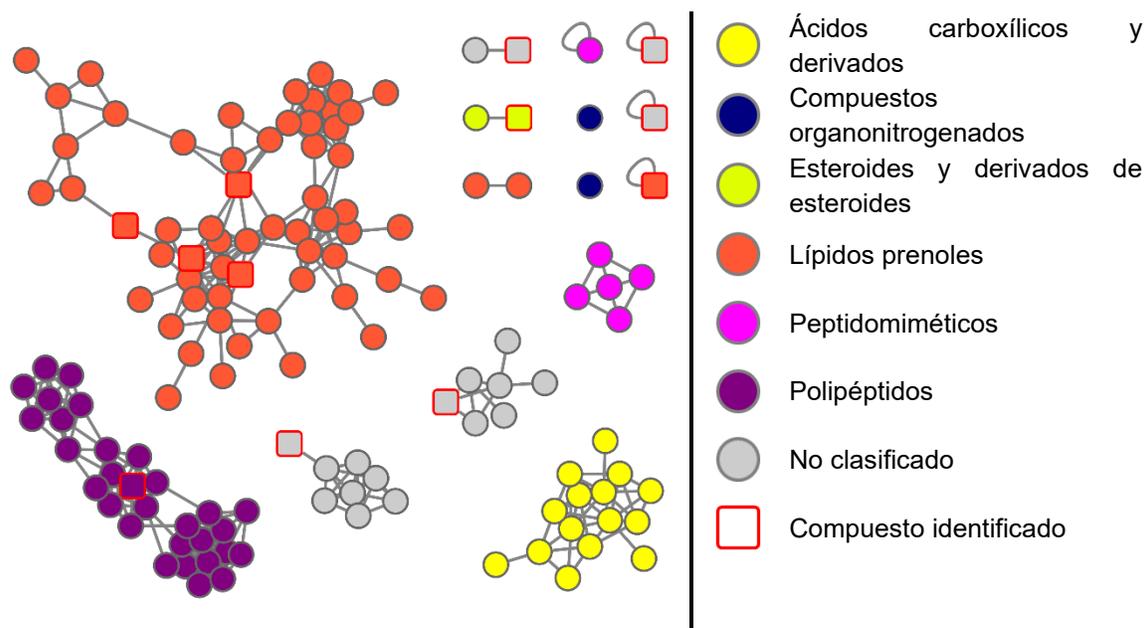


Figura 27. Red molecular de los extractos de la bacteria 510. Los nodos de cada clase química son coloreados con base en lo indicado en la leyenda.

Los resultados de la diversidad química de este organismo se resumen en la **Tabla 15**, en donde logró clasificar el 86.0% de los nodos, los cuales se agruparon en 3 superclases, 6 clases y 6 subclases. De estos, predominan dos superclases: la de los lípidos y moléculas similares a lípidos, siendo la clase mayoritaria la de los prenoles y la subclase de diterpenoides (44.9%); y la de los ácidos orgánicos y derivados, la cual a su vez es dividida en dos clases, la de los ácidos carboxílicos y derivados y la subclase de aminoácidos, péptidos y análogos (11.0%) y la de los polipéptidos (22.1%).

Tabla 13. Resultados cuantitativos de la clasificación química estructural atribuible al perfil químico de la bacteria 510.

Superclase	Clase	Subclase	Nodos	Porcentaje
Lípidos y moléculas similares a lípidos	Lípidos prenoles	Diterpenoides	61	44.9%
		Sesquiterpenoides	1	0.7%
	Esteroides y derivados de esteroides	Ácidos biliares, alcoholes y derivados	2	1.5%
Ácidos orgánicos y derivados	Ácidos carboxílicos y derivados	Aminoácidos, péptidos y análogos	15	11.0%
	Peptidomiméticos	Depsipéptidos	6	4.4%
	Polipéptidos	Subclase no identificada	30	22.1%
Compuestos de nitrógeno orgánico	Compuestos organonitrogenados	Aminas	2	1.5%
No clasificado	No clasificado	No clasificado	19	14.0%
Total			136	100%

Esta bacteria presentó la menor diversidad en cuanto a número de clases y de nodos atribuibles a su perfil químico. El único compuesto identificado por GNPS para esta bacteria fue la lobofoarina A (**Tabla 14**). Este policétido antibiótico tipo spirotetronato (Xiao *et al.*, 2013) ha sido aislado de la cepa marina *S. olivaceus* FXJ7.023 y de *Streptomyces sp.* MS100061 y SCSIO 0112.

Tabla 14. Compuestos con actividad biológica identificados en la red molecular de los extractos de la bacteria 510.

Compuesto	Superclase [score]; Clase [Score]	Masa parental [Aducto]	Cosine [Librería]	Error (ppm)	Referencia
Loboforina A	Ácidos orgánicos y derivados [0.07]; Polipéptidos [0.03]	1157.64 [M+H] ⁺	0.78 [1]	4.3234	(Xiao et al., 2013)

6. Conclusiones

- Se realizó el cultivo a microescala de cuatro cepas bacterianas y la preparación de sus respectivos extractos orgánicos en diferentes medios de cultivo.
- A partir de los resultados de la evaluación antimicrobiana utilizando el método de microdilución en placa con el colorante MTT sobre una batería de seis microorganismos de prueba, se seleccionaron a los extractos orgánicos que presentaron la mejor actividad biológica.
- El estudio preliminar de la diversidad química de los extractos activos mediante la plataforma GNPS y las herramientas *in silico* MS2LDA, DEREPLICATOR y MolNetEnhancer, permitió clasificar estructuralmente los nodos de las distintas bacterias en un total acumulativo de 9 superclases, 14 clases, y 16 subclases, así como identificar algunas entidades químicas con actividad biológica presentes en los extractos activos.
- El estudio químico de la cepa 1CA condujo al aislamiento de la yodinina (**1**), así como la identificación del precursor 1,6-fenazindiol (**3**) y del intermediario 5-óxido 1,6-fenazindiol (**4**) con base en los perfiles cromatográficos por UPLC y espectros de HRESIMS-MS/MS. Con base en lo descrito en la literatura, estos compuestos son los responsables o deben contribuir significativamente a la actividad antimicrobiana observada en los extractos orgánicos de esta bacteria, con lo que se responde la hipótesis planteada.

7. Bibliografía

- Aron, A. T., Gentry, E. C., McPhail, K. L., Nothias, L.-F., Nothias-Esposito, M., Bouslimani, A., Petras, D., Gauglitz, J. M., Sikora, N., Vargas, F., van der Hooff, J. J. J., Ernst, M., Kang, K. B., Aceves, C. M., Caraballo-Rodríguez, A. M., Koester, I., Weldon, K. C., Bertrand, S., Roullier, C., & Sun, K. (2020). Reproducible molecular networking of untargeted mass spectrometry data using GNPS. *Nature Protocols*, 15(6), 1954–1991. <https://doi.org/10.1038/s41596-020-0317-5>
- Bashan, Y., Puente, M. E., Rodriguez-Mendoza, M. N., Toledo, G., Holguin, G., Ferrera-Cerrato, R., & Pedrin, S. (1995). Survival of *Azospirillum brasilense* in the Bulk Soil and Rhizosphere of 23 Soil Types. *Applied and Environmental Microbiology*, 61(5), 1938–1945. <https://doi.org/10.1128/aem.61.5.1938-1945.1995>
- Bowern, N., Ramshaw, I., Badenoch-Jones, P., & Doherty, P. (1984). EFFECT OF AN IRON-CHELATING AGENT ON LYMPHOCYTE PROLIFERATION. *Australian Journal of Experimental Biology and Medical Science*, 62(6), 743–754. <https://doi.org/10.1038/icb.1984.70>
- Chávez, R., Fierro, F., García-Rico, R. O., & Vaca, I. (2015). Filamentous fungi from extreme environments as a promising source of novel bioactive secondary metabolites. *Frontiers in Microbiology*, 6. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00903>
- CONABIO. (2021). *Sexto Informe Nacional (6IN) de México*. Biodiversidad Mexicana. <https://www.biodiversidad.gob.mx/planeta/internacional/cbd/sexto-informe>
- De Anda, V., Zapata-Peñasco, I., Blaz, J., Poot-Hernández, A. C., Contreras-Moreira, B., González-Laffitte, M., Gámez-Tamariz, N., Hernández-Rosales, M., Eguiarte, L. E., & Souza, V. (2018). Understanding the Mechanisms Behind the Response to Environmental Perturbation in Microbial Mats: A Metagenomic-Network Based Approach. *Frontiers in Microbiology*, 9. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02606>
- Dictionary of Natural Products 29.2 Chemical Search*. (2021). Dnp.chemnetbase.com. <http://dnp.chemnetbase.com/faces/chemical/ChemicalSearch.xhtml>
- Ding, T., Yang, L.-J., Zhang, W.-D., & Shen, Y.-H. (2019). The secondary metabolites of rare actinomycetes: chemistry and bioactivity. *RSC Advances*, 9(38), 21964–21988. <https://doi.org/10.1039/c9ra03579f>
- Djombou Feunang, Y., Eisner, R., Knox, C., Chepelev, L., Hastings, J., Owen, G., Fahy, E., Steinbeck, C., Subramanian, S., Bolton, E., Greiner, R., & Wishart, D. S. (2016). ClassyFire: automated chemical classification with a comprehensive, computable taxonomy. *Journal of Cheminformatics*, 8(1). <https://doi.org/10.1186/s13321-016-0174-y>
- Dror, B., Jurkevitch, E., & Cytryn, E. (2020). State-of-the-art methodologies to identify antimicrobial secondary metabolites in soil bacterial communities-A review. *Soil Biology and Biochemistry*, 147, 107838. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2020.107838>
- Ernst, M., Kang, K. B., Caraballo-Rodríguez, A. M., Nothias, L.-F., Wandy, J., Chen, C., Wang, M., Rogers, S., Medema, M. H., Dorrestein, P. C., & van der Hooff, J. J. J. (2019). MolNetEnhancer: Enhanced Molecular Networks by Integrating Metabolome Mining and Annotation Tools. *Metabolites*, 9(7), 144.

- <https://doi.org/10.3390/metabo9070144>
- Escalante, A. E., Eguiarte, L. E., Espinosa-Asuar, L., Forney, L. J., Noguez, A. M., & Souza Saldivar, V. (2008). Diversity of aquatic prokaryotic communities in the Cuatro Ciénegas basin. *FEMS Microbiology Ecology*, 65(1), 50–60. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2008.00496.x>
- Fujita, M., Nakano, K., & Sakai, R. (2013). Bisucaberin B, a Linear Hydroxamate Class Siderophore from the Marine Bacterium *Tenacibaculum mesophilum*. *Molecules*, 18(4), 3917–3926. <https://doi.org/10.3390/molecules18043917>
- Gohain, A., Manpoong, C., Saikia, R., & De Mandal, S. (2020). Actinobacteria: diversity and biotechnological applications. *Recent Advancements in Microbial Diversity*, 217–231. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-821265-3.00009-8>
- González-Medina, M., Owen, J. R., El-Elimat, T., Pearce, C. J., Oberlies, N. H., Figueroa, M., & Medina-Franco, J. L. (2017). Scaffold Diversity of Fungal Metabolites. *Frontiers in Pharmacology*, 8. <https://doi.org/10.3389/fphar.2017.00180>
- González-Medina, M., Prieto-Martínez, F. D., Naveja, J. J., Méndez-Lucio, O., El-Elimat, T., Pearce, C. J., Oberlies, N. H., Figueroa, M., & Medina-Franco, J. L. (2016). Chemoinformatic expedition of the chemical space of fungal products. *Future Medicinal Chemistry*, 8(12), 1399–1412. <https://doi.org/10.4155/fmc-2016-0079>
- Herbert, R. B., Holliman, F. G., Ibberson, P. N., & Sheridan, J. B. (1979). The biosynthesis of phenazines: incorporation of [¹⁴C]shikimic acid. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1*, 2411. <https://doi.org/10.1039/p19790002411>
- Igbinosa, E. O., Beshiru, A., & Igbinosa, I. H. (2020). Mechanism of action of secondary metabolites from marine-derived Streptomyces on bacterial isolates by membrane permeability. *Microbial Pathogenesis*, 149, 104532. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2020.104532>
- Jiang, J., Guiza Beltran, D., Schacht, A., Wright, S., Zhang, L., & Du, L. (2018). Functional and Structural Analysis of Phenazine O-Methyltransferase LaPhzM from *Lysobacter antibioticus* OH13 and One-Pot Enzymatic Synthesis of the Antibiotic Myxin. *ACS Chemical Biology*, 13(4), 1003–1012. <https://doi.org/10.1021/acschembio.8b00062>
- Kinghorn, A. D. (2001). Pharmacognosy in the 21st century*. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 53(2), 135–148. <https://doi.org/10.1211/0022357011775334>
- Koki Horikoshi. (2011). *Extremophiles Handbook. Vol. 1*. Tokyo Springer.
- Kornreich-Leshem, H., Ziv, C., Gumienna-Kontecka, E., Arad-Yellin, R., Chen, Y., Elhabiri, M., Albrecht-Gary, A.-M., Hadar, Y., & Shanzer, A. (2005). Ferrioxamine B Analogues: Targeting the FoxA Uptake System in the Pathogenic *Yersinia enterocolitica*. *Journal of the American Chemical Society*, 127(4), 1137–1145. <https://doi.org/10.1021/ja035182m>
- Li, Q., Chen, X., Jiang, Y., & Jiang, C. (2016). Morphological Identification of Actinobacteria. *Actinobacteria - Basics and Biotechnological Applications*. <https://doi.org/10.5772/61461>
- López-Lozano, N. E., Echeverría Molinar, A., Ortiz Durán, E. A., Hernández Rosales, M., & Souza, V. (2020). Bacterial Diversity and Interaction Networks of Agave lechuguilla Rhizosphere Differ Significantly From Bulk Soil in the Oligotrophic Basin of Cuatro Ciénegas. *Frontiers in Plant Science*, 11. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.01028>

- López-Lozano, N. E., Eguiarte, L. E., Bonilla-Rosso, G., García-Oliva, F., Martínez-Piedragil, C., Rooks, C., & Souza, V. (2012). Bacterial Communities and the Nitrogen Cycle in the Gypsum Soils of Cuatro Ciénegas Basin, Coahuila: A Mars Analogue. *Astrobiology*, 12(7), 699–709. <https://doi.org/10.1089/ast.2012.0840>
- Martínez-Carranza, E., Ponce-Soto, G. Y., Díaz-Pérez, A. L., Cadenas, E., Souza, V., & Campos-García, J. (2017). Involvement of cyclodipeptides in the competition of bacterial communities in the oligotrophic Churince aquatic system of Cuatro Ciénegas Basin dominated by Gammaproteobacteria. *Extremophiles*, 22(1), 73–85. <https://doi.org/10.1007/s00792-017-0978-3>
- MATSUBARA, K., SAKUDA, S., KONDO, T., TANAKA, M., NISHIMURA, T., & SUZUKI, A. (1998). Morphological Changes in Insect BM-N4 Cells Induced by Nocardamine. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 62(10), 2049–2051. <https://doi.org/10.1271/bbb.62.2049>
- Minckley, W. L. (1992). Three Decades near Cuatro Ciénegas, México: Photographic Documentation and a Plea for Area Conservation. *Journal of the Arizona-Nevada Academy of Science*, 26(2), 89–118. <https://www.jstor.org/stable/40024874>
- Mohimani, H., Gurevich, A., Mikheenko, A., Garg, N., Nothias, L.-F., Ninomiya, A., Takada, K., Dorrestein, P. C., & Pevzner, P. A. (2016). Dereplication of peptidic natural products through database search of mass spectra. *Nature Chemical Biology*, 13(1), 30–37. <https://doi.org/10.1038/nchembio.2219>
- Newman, D. J., & Cragg, G. M. (2020). Natural Products as Sources of New Drugs over the Nearly Four Decades from 01/1981 to 09/2019. *Journal of Natural Products*. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.9b01285>
- Pajares, S., Bonilla-Rosso, G., Travisano, M., Eguiarte, L. E., & Souza, V. (2012). Mesocosms of Aquatic Bacterial Communities from the Cuatro Cienegas Basin (Mexico): A Tool to Test Bacterial Community Response to Environmental Stress. *Microbial Ecology*, 64(2), 346–358. <https://doi.org/10.1007/s00248-012-0045-7>
- Palazzolo, A. M. E., Simons, C. L. W., & Burke, M. D. (2017). The natural productome. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 114(22), 5564–5566. <https://doi.org/10.1073/pnas.1706266114>
- Puente, M. E., Li, C. Y., & Bashan, Y. (2009). Rock-degrading endophytic bacteria in cacti. *Environmental and Experimental Botany*, 66(3), 389–401. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2009.04.010>
- Pye, C. R., Bertin, M. J., Lokey, R. S., Gerwick, W. H., & Lington, R. G. (2017). Retrospective analysis of natural products provides insights for future discovery trends. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 114(22), 5601–5606. <https://doi.org/10.1073/pnas.1614680114>
- Sivalingam, P., Hong, K., Pote, J., & Prabakar, K. (2019). Extreme Environment Streptomyces: Potential Sources for New Antibacterial and Anticancer Drug Leads? *International Journal of Microbiology*, 2019, 1–20. <https://doi.org/10.1155/2019/5283948>
- Souza, V., Espinosa-Asuar, L., Escalante, A. E., Eguiarte, L. E., Farmer, J., Forney, L., Lloret, L., Rodríguez-Martínez, J. M., Soberón, X., Dirzo, R., & Elser, J. J. (2006). An endangered oasis of aquatic microbial biodiversity in the Chihuahuan desert.

- Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(17), 6565–6570. <https://doi.org/10.1073/pnas.0601434103>
- Souza, V., Siefert, J. L., Escalante, A. E., Elser, J. J., & Eguiarte, L. E. (2012). The Cuatro Ciénegas Basin in Coahuila, Mexico: An Astrobiological Precambrian Park. *Astrobiology*, 12(7), 641–647. <https://doi.org/10.1089/ast.2011.0675>
- Stevenson, A., & Hallsworth, J. E. (2014). Water and temperature relations of soil Actinobacteria. *Environmental Microbiology Reports*, 6(6), 744–755. <https://doi.org/10.1111/1758-2229.12199>
- Tsujibo, H., Sato, T., Inui, M., Yamamoto, H., & Inamori, Y. (1988). Intracellular Accumulation of Phenazine Antibiotics Produced by an Alkalophilic Actinomycete. I. Taxonomy, Isolation and Identification of the Phenazine Antibiotics. *Agricultural and Biological Chemistry*, 52(2), 301–306. <https://doi.org/10.1080/00021369.1988.10868681>
- van der Hoof, J. J. J., Wandy, J., Barrett, M. P., Burgess, K. E. V., & Rogers, S. (2016). Topic modeling for untargeted substructure exploration in metabolomics. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 113(48), 13738–13743. <https://doi.org/10.1073/pnas.1608041113>
- Wang, M., Carver, J. J., Phelan, V. V., Sanchez, L. M., Garg, N., Peng, Y., Nguyen, D. D., Watrous, J., Kapono, C. A., Luzzatto-Knaan, T., Porto, C., Bouslimani, A., Melnik, A. V., Meehan, M. J., Liu, W.-T., Crüsemann, M., Boudreau, P. D., Esquenazi, E., Sandoval-Calderón, M., & Kersten, R. D. (2016). Sharing and community curation of mass spectrometry data with Global Natural Products Social Molecular Networking. *Nature Biotechnology*, 34(8), 828–837. <https://doi.org/10.1038/nbt.3597>
- WHO. (2018). *Antimicrobial resistance*. Who.int; World Health Organization: WHO. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/antimicrobial-resistance>
- Wolaver, B. D., Crossey, L. J., Karlstrom, K. E., Banner, J. L., Cardenas, M. B., Ojeda, C. G., & Sharp, J. M. (2012). Identifying origins of and pathways for spring waters in a semiarid basin using He, Sr, and C isotopes: Cuatrociénegas Basin, Mexico. *Geosphere*, 9(1), 113–125. <https://doi.org/10.1130/ges00849.1>
- World Health Organization. (2018). *Antibiotic resistance*. ; <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/antibiotic-resistance>
- Xiao, J., Zhang, Q., Zhu, Y., Li, S., Zhang, G., Zhang, H., Saurav, K., & Zhang, C. (2013). Characterization of the sugar-O-methyltransferase LobS1 in lobophorin biosynthesis. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 97(20), 9043–9053. <https://doi.org/10.1007/s00253-013-5083-7>
- Zhao, Y., Qian, G., Ye, Y., Wright, S., Chen, H., Shen, Y., Liu, F., & Du, L. (2016). Heterocyclic Aromatic N-Oxidation in the Biosynthesis of Phenazine Antibiotics from *Lysobacter antibioticus*. *Organic Letters*, 18(10), 2495–2498. <https://doi.org/10.1021/acs.orglett.6b01089>