

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**



**DIVERSIDAD Y BIOPROSPECCIÓN DE ACTINOBACTERIAS DE
CUATRO CIÉNEGAS, COAHUILA CON POTENCIAL FARMACÉUTICO**

POR

HÉCTOR FERNANDO AROCHA GARZA

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS CON ORIENTACIÓN EN BIOTECNOLOGÍA**

JULIO, 2018

DIVERSIDAD Y BIOPROSPECCIÓN DE ACTINOBACTERIAS DE CUATRO
CIÉNEGAS, COAHUILA CON POTENCIAL FARMACÉUTICO

Comité de tesis

Dra. Susana De La Torre Zavala

Presidente

Dr. Hamlet Avilés Arnaut

Secretario

Dr. Benito Pereyra Alférez

Vocal

Dra. Lucila Adriana Galán Franco

Vocal

Dr. Sergio A. Galindo Rodríguez

Vocal

DIVERSIDAD Y BIOPROSPECCIÓN DE ACTINOBACTERIAS DE CUATRO
CIÉNEGAS, COAHUILA CON POTENCIAL FARMACÉUTICO

Dirección de tesis

Dra. Susana De La Torre Zavala

Director

Dra. Valeria Souza Saldívar

Director externo

AGRADECIMIENTOS

A mis padres, por su gran ejemplo y apoyo incondicional, que me ha enseñado que los sueños con esfuerzo y tenacidad se pueden hacer realidad.

A mi familia y amigos por siempre estar presentes.

A la Dra. Susana De la Torre, quien ha guiado mis pasos de aprendizaje, que nunca me dejó solo, formando parte fundamental de mi desarrollo profesional. Así como al Dr. Hamlet Avilés, por su enseñanza y consejos durante mi estancia en el laboratorio.

A la Dra. Valeria Souza, Dra. Gabriela Olmedo, Dr. Luis Eguiarte, por su apoyo, buenos consejos y por siempre estar al pendiente del proyecto.

A todos los integrantes del laboratorio 9 que de alguna manera se involucraron en el proyecto (Mercedes, Nahui, Carlos, Cinthya, Faviola, Katia, Alberto, Josué, Javi, Cristal, Tere, Abby, Rosa, Vilchis, Perla...) , por su apoyo y por los buenos momentos compartidos.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo económico para realizar este proyecto, mediante el programa Ciencias básicas 2013 otorgado a la Dra. Susana De la Torre Zavala (proyecto 221963).

A la alianza WWF-Fundación Carlos Slim por financiamiento del proyecto *“Conocimiento y conservación de la biodiversidad del Churince, Cuatro Ciénegas Coahuila”* del cual esta tesis es parte.

Al Centro de Bachillerato Tecnológico Agropecuario No 22, por permitirnos el acceso a sus instalaciones para el procesamiento de las muestras durante las temporadas de muestreo.

Al museo del Desierto por el amable acceso a la poza la Becerra y a PRONATURA Noreste por el acceso al rancho pozas azules.

DEDICATORIA

A mis padres quienes siempre me han dado la oportunidad de soñar y junto a mis hermanas, cuñados y sobrinos, han sido cómplices de mis logros y felicidad.

A Dios por ponerme en el camino indicado.

Y a mi querido Valle de Cuatro Ciénegas, que gracias a su naturaleza fue posible realizar este trabajo. Mantengo latente mi esperanza de que aportará conocimiento y que ayudará a su conservación de manera sostenible.

“Cuando escribes tu sueño en un papel y le pones fecha, se convierte en un objetivo. Cuando divides tu objetivo en pequeños pasos, se convierte en un plan. Un plan respaldado por acciones se convierte en realidad”

- Greg Reid-

ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS	III
RESUMEN	VI
ABSTRACT	VIII
1. INTRODUCCIÓN	10
2. ANTECEDENTES	11
2.1. Actinobacterias	11
2.2. Antibióticos producidos por actinobacterias	12
2.3. Antibióticos con capacidad antitumoral producidos por actinobacterias	17
2.3.2. Actinomicina D	18
2.4. Resistencia a antibióticos y antitumorales	19
2.5. Actinobacterias marinas como fuente de nuevos metabolitos secundarios.....	24
2.6. Estrategias de cultivo actinobacterias “géneros raros”	28
2.7. Minería genómica.....	29
2.8. Nuevos enfoques: actinobacterias no cultivables	31
2.9. ¿Por qué realizar bioprospección en Cuatro Ciénegas?	32
3. JUSTIFICACIÓN.....	36
4. HIPÓTESIS	37
5. OBJETIVOS.....	38
5.1. Objetivo general	38
5.2. Objetivos específicos.....	38
6. MATERIALES Y MÉTODOS	39
6.1. Áreas de estudio.	39
6.2. Muestreo.....	40
6.3. Aislamiento primario de actinobacterias	42
6.4. Aislamiento Secundario de actinobacterias.....	43
6.5.1. Identificación microscópica	43
6.5.2. Identificación Molecular	43
6.6. Análisis filogenético.....	45
6.7. Ensayos antagonismo de doble capa	46
6.8. Producción metabolitos secundarios	47

6.10. Determinación de la concentración media inhibitoria (IC ₅₀)	50
7.1. Aislamiento selectivo de Actinobacterias	52
7.2. Aislamiento de actinobacterias por medio de cultivo	53
7.3. Aislamiento por punto de muestreo en la laguna intermedia sistema hidrologico Churince58	
7.4. Identificación molecular de los aislados	63
7.5. Análisis filogenético del total de las actinobacterias asiladas.	65
7.6. Análisis filogenético de los géneros de <i>Streptomyces</i> asilados de la laguna intermedia del sistema hidrológico el Churince	67
7.7. Ensayos de antagonismo	70
7.8. Ensayos de citotoxicidad	71
8. DISCUSIÓN.....	75
8.1. Aislamiento y análisis de diversidad de actinobacterias.	75
8.2. Análisis filogenético del género <i>Streptomyces</i> aislados de la LI.	79
8.3. Ensayos de antagonismo	80
8.4. Actividad citotóxica, identificación y determinación estructural de los componentes de los extractos de actinobacterias aisladas de CC.....	81
9. CONCLUSIONES	94
10. PERSPECTIVAS	95
11. BIBLIOGRAFÍA.....	96
12. RESUMEN BIBLIOGRÁFICO.....	109
ANEXO 1	112
ANEXO 2.....	119
ANEXO 3	126
ANEXO 4.....	135

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Tipos y número de metabolitos con actividad biológicamente activos producidos por actinobacterias.....	12
Tabla 2. Número de especies actinomicetos productoras de metabolitos bilógicamente activos.....	14
Tabla 3. Ejemplo de clases de antibióticos producidos por actinobacterias y su mecanismo de acción.	16
Tabla 4. Metabolitos producidos por actinobacterias marinas.....	26
Tabla 5. Tratamientos para el aislamiento selectivo de actinobacterias.....	29
Tabla 6. Geolocalización de las pozas donde se colectaron las muestras.	40
Tabla 7. Puntos de muestreo en la laguna intermedia del sistema hidrológico Churince (IL)	41
Tabla 8. Numero de aislados totales por poza en los dos periodos de aislamiento....	52
Tabla 9. Número de actinobacterias aisladas por pretratamientos por poza. A) Fenol 1.5%, B) tetraciclina 50 µg/ml, C) 85 °C por 30 minutos, D) sonicación por 10 minutos, E) ampicilina 50 µg/ml, F) 85°C por 30 minutos + tetraciclina 50 µg/ml, G) fenol al 1.5% + ampicilina 50µg/ml, H) gentamicina 50 µg/ml I) Kanamicina 50 µg/ml, J) tetraciclina 50 µg/ml + sonicación por 10 minutos.....	60
Tabla 10. Resultados del aislamiento de actinobacterias con el uso de pretratamientos por poza y por medio de cultivo utilizados.	60
Tabla 11. Numero de actinobacterias aisladas por género en cada una de las pozas.	64
Tabla 12. Resultados de la IC ₅₀ aproximada en µg/ml del escrutinio preliminar de diez extractos crudos obtenidos de las actinobacterias que produjeron halos de inhibición en el ensayo de doble capa.....	72
Tabla 13. Resultados de IC ₅₀ en µg/ml de las fracciones obtenidas del extracto de acetato de etilo en líneas tumorales, utilizando células de fibroblastos como control.	73
Tabla 14. Resultados de la estimación de IC ₅₀ en µg/ml de las fracciones obtenidas del extracto de acetato de etilo en la línea celular de cáncer de Ovario (HTB-161) y Fibroblastos	73

Tabla 15. Resultado de la identificación de los componentes de las fracciones PR33-F6, PR 33-F7, PR35-F5 y PR35-F6	74
Tabla 16. Extracción de agua en canales artificiales de las pozas de Cuatro Ciénegas	92
Tabla 17. Porcentajes de identidad y afiliación mediante la secuenciación del gen 16S ARNr de las actinobacterias de CC.....	119
Tabla 18. Medida de radio en centímetros de halos de inhibición de ensayos doble capa.....	126

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura de la Doxorubicina (Bhattacharjee, Verma et al. 2009).....	18
Figura 2. Estructura química de la Actinomicina D. Fuente: (Muller and Crothers 1968).....	19
Figura 3. Línea del tiempo del descubrimiento de antibióticos y el surgimiento de microorganismos resistentes. Resistentes (R), Extremadamente resistentes (XDR): resistencia a casi todos los antibióticos, Panresistentes (PDR): resistencia a todos los antibióticos. Fuente: adaptada de (Lee Ventola 2015).....	21
Figura 4. Frecuencia de descubrimiento de nuevos antibióticos en función del total de antibióticos aislados en suelo. Se muestran varios antibióticos con líneas apuntando a sus frecuencias de descubrimiento entre actinomicetos aleatorios, Act (Actinomicina D), Dap (Daptomicina), Ery (Eritromicina), Sm (Estreptomicina), Stn (Estreptotricina), Tet (Tetraciclina), Van (Vancomicina). Fuente: (Baltz 2007).....	24
Figura 5. Frecuencia de aislamiento de actinobacterias en ambientes marinos. Fuente: (Valliappan, Sun et al. 2014).....	27
Figura 6. Estrategias para la búsqueda de nuevos compuestos bioactivos mediante minería genómica. Fuente: adaptado de (Corre and L Challis 2009).....	30
Figura 7. Esquema que representa los dos acercamientos en el uso de la metagenómica	32
Figura 8. Mapa del Valle de Cuatro Ciénegas Coahuila ubicando las pozas donde se realizó la colecta de muestras: la laguna intermedia del sistema hidrológico El Churince (LI), Pozas Rojas (PR), Poza El Mojarral (MJ), Poza El Anteojo (AN), Pozas Azules (PA) El Arqueano (PAQ), Poza La Becerra (PB)	39
Figura 9. Puntos de Muestreo Ubicados en el mapa de Laguna intermedia sistema hidrológico Churince (LI).	41
Figura 10. Porcentaje total de aislamiento de actinobacterias por poza en los dos periodos de aislamiento	53
Figura 11. Aislamiento total de actinobacterias por medio de cultivo en los dos periodos de aislamiento	54

Figura 12. Porcentajes de actinobacterias aisladas en la laguna intermedia del sistema hidrológico el Churince (LI) por medio de cultivo utilizados.....	55
Figura 13. Porcentajes de actinobacterias aisladas de Pozas Rojas por medio de cultivo utilizados.	55
Figura 14. Porcentajes de actinobacterias aisladas de la poza el Mojarral por medio de cultivo utilizados.	56
Figura 15. Porcentajes de actinobacterias aisladas de poza el Anteojo por medio de cultivo utilizados.	56
Figura 16. Porcentajes de actinobacterias aisladas de Pozas Azules por medio de cultivo utilizados.	57
Figura 17. Porcentajes de actinobacterias aisladas del Arqueano por medio de cultivo utilizados.	57
Figura 18. Porcentajes de actinobacterias aisladas de Poza Becerra por medio de cultivo utilizados.	58
Figura 19. Porcentajes de actinobacterias aisladas por punto de muestreo en la laguna intermedia del sistema hidrológico el Churince (LI).	58
Figura 20. Porcentajes de actinobacterias aisladas utilizando pretratamientos (Pt): A) Fenol 1.5%, B) tetraciclina 50 µg/ml, C) 85 °C por 30 minutos, D) gentamicina 50 µg/ml E) ampicilina 50 µg/ml, F) 85°C por 30 minutos + tetraciclina 50 µg/ml, G) fenol al 1.5% + ampicilina 50 µg/ml, H) sonicación por 10 minutos, I) kanamicina 50 µg/ml, J) tetraciclina 50 µg/ml + sonicación por 10 minutos durante el periodo 2015-2016.....	59
Figura 21. Porcentaje de las actinobacterias aisladas que fueron secuenciadas por poza en los dos periodos de aislamiento.	63
Figura 22. Porcentajes del total de géneros aislados en las pozas.	64
Figura 23. A) Diversidad de los géneros aislados en la LI, B) Grafica de barras que presenta la diversidad aislada por punto de muestreo. C) Grafica que muestra la diversidad aislada por medio de cultivo.	65
Figura 24. Cladograma circular por el método de Neighbor-joining (NJ), representando la diversidad de los géneros aislados de las pozas de Cuatro Ciénegas.	66

Figura 25. Árbol filogenético del género <i>Streptomyces</i> basado en el gen 16S ARNr (1,074pb) de las secuencias aisladas de LI además de las especies más cercanas. Los valores de los soportes del árbol para maximum likelihood (ML) en el rango de 0.7-1 fueron marcados con círculos negros. El soporte de los nodos para el análisis Bayesiano en los rangos de 0.95-1 fueron marcados con triángulos rojos y para Neighbor-joining (NJ) en rangos de 0.6-1 en cuadrados azules.	69
Figura 26. Diversidad morfológica de los aislados que se agrupan dentro de los clados únicos y clados monofiléticos en la Filogenia de <i>Streptomyces</i> (Figura 25).	69
Figura 27. Diagrama de Venn que muestra los resultados de antagonismo de las actinobacterias probadas contra <i>E. coli</i> o157H:7, <i>C. albicans</i> y <i>S. aureus</i>	70
Figura 28. Ejemplo de ensayo de doble capa para identificar antagonismo de las actinobacterias A) <i>E. coli</i> o157H:7, B) <i>C. albicans</i> , C) <i>S. aureus</i> . Se utilizó estreptomicina (St) y Nistatina (Nis) como control positivo.	71
Figura 29. Perfil cromatográfico de la fracción PR33-F6 realizado por HPLC.	135
Figura 30. Perfil cromatográfico de la fracción PR33-F7 realizado por HPLC.	136
Figura 31. Perfil cromatográfico de la fracción PR35-F5 realizado por HPLC.	137
Figura 32. Perfil cromatográfico de la fracción PR35-F6 realizado por HPLC.	138
Figura 33. Análisis por UPLC-PDA-HRMS-MS/MS: del extracto crudo de la cepa de <i>Streptomyces</i> PR33	139
Figura 34. Análisis por UPLC-PDA-HRMS-MS/MS: del extracto crudo de la cepa de <i>Streptomyces</i> PR33	140
Figura 35. Análisis por UPLC-PDA-HRMS-MS/MS: del extracto crudo de la cepa de <i>Streptomyces</i> PR33	140
Figura 36. Análisis por UPLC-PDA-HRMS-MS/MS: del extracto crudo de la cepa de <i>Streptomyces</i> PR35	140
Figura 37. Análisis por UPLC-PDA-HRMS-MS/MS: del extracto crudo de la cepa de <i>Streptomyces</i> PR35	140
Figura 38. Resumen resultados del análisis por UPLC-PDA-HRMS-MS/MS de las fracciones de los extractos de las cepas PR33 y PR35.	141

LISTA DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS

Act: Actinomicina
ADN: Ácido desoxirribonucleico
AIM1-9: Medio de cultivo para el aislamiento de Actinobacterias
AN: Poza el Anteojo
ARGs: Genes de resistencia a antibióticos
ARN: Ácido ribonucleico
ARNr: Ácido ribonucleico ribosomal
ATCC: Colección Americana de cultivos tipo
BGCs: clústeres de genes biosintéticos
BLAST: Herramienta básica de búsqueda de alineación local
C: Citosina
CBTa No 22: Centro de Bachillerato Tecnológico Agropecuario No 22
CC: Cuatro Ciénegas
CONABIO: Comisión Nacional para el Conocimiento y uso de la Biodiversidad
DMEM: Medio mínimo esencial de Eagle modificado con Dulbecco
DMSO: Dimetilsulfóxido
EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético
ELSD: Detector evaporativo de dispersión de luz
FDA: Administración de alimentos y medicamentos
G: Guanina
HPLC: Cromatografía líquida de alta resolución
IC₅₀: Concentración mínima inhibitoria
ICBG: grupo cooperativo internacional de biodiversidad
LI: laguna intermedia del sistema hidrológico el Churince
M: Molar
MEGA: Análisis de Genética Evolutiva Molecular
mm: Milímetros
MTT: Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio
N:P: Nitrógeno:Fosforo
NaCl: Cloruro de sodio
NCBI: Centro Nacional de Información Biotecnológica
NCI: Instituto Nacional del cáncer de Estados Unidos
NJ: Neighbor-joining
OMS: Organización mundial de la salud
OTU's: Unidades taxonómicas operacionales

PA: Pozas Azules
PAQ: El Arqueano
PB: Poza la Becerra
PBS: Buffer de fosfatos
PDA: Detector de matriz de fotodiodos
PDR: Panresistentes
PJ: Poza el Mojarral
PR: Pozas rojas
QTP: Buffer de lisis
R: Resistentes
rpm: revoluciones por minuto
RPMI: Medio del instituto Roswell Park Memorial
SARM: *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina
SEMARNAT: Secretaria del Medio Ambiente y Recursos Naturales
UPLC-PDA-HRMS-MS/MS: Cromatografía de líquidos de ultra rendimiento, acoplado a un espectrómetro de masas en tándem de alta resolución con matriz de fotodiodos
XDR: Extremadamente resistentes

RESUMEN

Las actinobacterias son uno de los más grandes Phylum en el dominio de las bacterias Gram positivas, se encuentran ampliamente distribuidos en el planeta tierra, son habitantes de suelo, agua, simbioses de plantas, animales, patógenos humanos, etc. tienen una amplia plasticidad metabólica con capacidad de producir metabolitos con actividad de interés industrial, agrícola y farmacéutico como enzimas, surfactantes, insecticidas, promotores de crecimiento vegetal, antifúngicos, antibióticos, antitumorales, etc.

En nuestro estudio se lograron cultivar 268 actinobacterias morfológicamente diversas provenientes de pozas del valle de Cuatro Ciénegas, Coahuila, a partir de nueve medios de cultivo y dos técnicas de aislamiento (tradicional y con pretratamientos). 95 actinobacterias fueron secuenciadas mediante el gen 16S ARNr, clasificándolas en 10 géneros: *Streptomyces*, *Nocardiopsis*, *Blastococcus*, *Microbacterium*, *Micrococcus*, *Glycomyces*, *Verrucosipora*, *Arthrobacter*, *Kocuria*, *Modestobacter*, de los cuales, el género *Streptomyces*, fue el más abundante y ubicuo, pues fue aislado de las 7 pozas donde se realizaron muestreos, cuyos análisis filogenéticos por la formación de clados únicos y monofiléticos sugieren endemismo.

139 actinobacterias fueron incluidas en el ensayo de doble capa par identificar la producción de metabolitos secundarios con actividad contra *S. aureus*, *C. albicans* y *E. coli O157:H7*, de las cuales, el 50% inhibieron el crecimiento de al menos uno de los patógenos probados. Posteriormente, diez actinobacterias fueron seleccionadas para la extracción de sus metabolitos utilizando acetato de etilo como solvente, para determinar su IC₅₀, en la línea celular de cáncer de mama MCF-7 y Pulmón NCI-H460. Debido a que ninguno de los extractos resultaron activos, se seleccionaron dos actinobacterias del cepario de nuestro laboratorio cuyos extractos ya habían sido reportados como activos en ambas líneas celulares.

Se realizó el fraccionamiento por cromatografía flash de los metabolitos secundarios producidos por las cepas de *Streptomyces* PR33 y PR35. Dos fracciones de cada cepa (PR33-F6, PR 33-F7, PR35-F5 y PR35-F6) resultaron activas según los rangos establecidos por el NCI, con $IC_{50} < 0.6 \mu\text{g/ml}$ en las líneas celulares de cáncer de mama MCF-7, colon Caco-2, pulmón NCI-H460, melanoma SK-MEL-28, ovario OVCAR-3, Sangre K-562 e inactivas $>100 \mu\text{g/ml}$ en células de fibroblastos.

La identificación y determinación estructural de los compuestos de las fracciones biológicamente activas se realizó mediante UPLC-PDA-HRMS-MS/MS, resultando en las 4 fracciones mezcla de compuestos de la familia de las Actinomicinas.

ABSTRACT

Actinobacteria is one of the largest Phylum in the Bacteria domain; they are widely distributed gram-positive bacteria, inhabitants of soil, water, symbionts of plants, animals, human pathogens, among others. They have a broad metabolic plasticity with the ability to produce metabolites with industrial, agricultural and pharmaceutical interest such as enzymes, surfactants, insecticides, plant growth promoters, antifungals, antibiotics, and antitumor compounds.

In our study, 268 morphologically diverse actinobacteria were obtained from water ponds in the valley of Cuatro Ciénegas, Coahuila from nine culture media and two pretreatments isolation techniques. 95 actinobacteria were sequenced by the 16S rRNA gene, classifying them into 10 genera: *Streptomyces*, *Nocardiopsis*, *Blastococcus*, *Microbacterium*, *Micrococcus*, *Glycomyces*, *Verrucosipora*, *Arthrobacter*, *Kocuria*, *Modestobacter*, of which the genus *Streptomyces*, was found the most abundant and ubiquitous taxa, it was isolated from the 7 ponds where samplings were made, whose phylogenetic analysis reveal the formation of unique and monophyletic clades that's suggest endemism.

139 isolated actinobacteria were included in the double-layer assay to identify the production of secondary metabolites with activity against *S. aureus*, *C. albicans* and *E. coli* O157: H7, of which 50% inhibited the growth of at least one of the tested pathogens, ten actinobacteria were selected for the extraction of their metabolites using ethyl acetate as solvent, to determine their IC₅₀, in breast cancer cell line MCF-7 and Lung NCI-H460, however none of the extracts resulted active, so two actinobacteria were selected from our laboratory collection whose extracts had already been reported as active in breast and lung cancer cell lines

Fractionation of the secondary metabolites produced by *Streptomyces* PR33 and PR35 strains was performed by flash chromatography. Two fractions of each strain (PR33-F6, PR 33-F7, PR35-F5 and PR35-F6) were active according to the ranges established by the NCI, with IC₅₀ <0.6 µg / ml in breast cancer cell line, MCF- 7, colon Caco-2,

lung NCI-H460, melanoma SK-MEL-28, ovary OVCAR-3, blood K-562 and inactive > 100 µg / ml in fibroblast cell line.

The identification and structural determination of the compounds of the biologically active fractions was carried out by UPLC-PDA-HRMS-MS / MS, the identified compounds in the 4 fractions, were a mixture of compounds of the Actinomycin family.

1. INTRODUCCIÓN

Las enfermedades causadas por microorganismos multidrogoresistentes y el cáncer son unas de las principales causas de muertes en el mundo, se estima que en los próximos años el número de muertes causadas por bacterias resistentes a los antibióticos disponibles actualmente aumente de 700,000 a 10 millones de muertes anuales. En el caso particular del cáncer, se estima que en las próximas dos décadas el número de muertes ascienda a los 22 millones, siendo que, para el 2050 estas serán las dos principales causas de muerte a nivel mundial. Lo anterior ha desatado una búsqueda incansable en los últimos años de tratamientos naturales para encontrar solución a dichas enfermedades, tratando de retomar la llamada “era dorada de los antibióticos”, en la cual la población mundial se vio beneficiada por las bondades de dichos productos y la mortandad se redujo de manera considerable en el mundo.

La principal fuente de productos naturales utilizada como antibióticos y antitumorales, son los metabolitos secundarios producidos por las actinobacterias. De los más de 30,000 metabolitos con aplicaciones biológicas que se conocen, el 70% es producido por este tipo de bacterias. Sin embargo, en las últimas décadas los esfuerzos de bioprospección realizados no han tenido éxito debido a la redundancia en el aislamiento de géneros y especies responsables de la producción de metabolitos ya conocidos.

Con la necesidad de encontrar nuevas fuentes de microorganismos productores de metabolitos no reportados, que pudiesen combatir las enfermedades por patógenos resistentes y diferentes tipos de cáncer, se iniciaron esfuerzos de muestreo en sitios poco explorados como ambientes marinos, o lugares con un alto grado de diversidad y endemismo como el valle de Cuatro Ciénegas, que sin duda nos permitirán evitar caer en la redundancia de aislamiento y producción de metabolitos ya reportados.

2. ANTECEDENTES

2.1. Actinobacterias

Las actinobacterias son uno de los más grandes Phylum en el dominio de las bacterias Gram positivas, tienen un alto contenido de guanina (G) y citosina (C) en su ADN, pudiendo llegar a contener más de un 70% como los géneros *Streptomyces* y *Frankia*. Presentan morfologías sumamente heterogéneas que van desde cocos, bacilos, cocobacilos a las que forman micelio, hifas fragmentadas y esporas. (Ventura, Canchaya et al. 2007, Li, Chen et al. 2016). Se encuentran ampliamente distribuidos en el planeta tierra, son habitantes de suelo, agua, simbioses de plantas, animales, patógenos humanos, etc.(Lewin, Carlos et al. 2016)

A la fecha se han registrado 5 subclases, 10 órdenes 56 familias y 286 géneros (Euzéby 2008, Ludwig, Euzéby et al. 2012, Ait Barka, Vatsa et al. 2015, Azman, Othman et al. 2016), siendo el orden de los Actinomycetales, el de mayor interés dada su plasticidad metabólica, con capacidad de producir metabolitos con actividad de interés industrial, agrícola y farmacéutico como enzimas, surfactantes, insecticidas, promotores de crecimiento vegetal, antifúngicos, antibióticos, antitumorales, etc. (Ait Barka, Vatsa et al. 2015, Lewin, Carlos et al. 2016). La mayoría son utilizados por su amplia capacidad de inhibir el crecimiento de patógenos humanos, particularmente bacterias Gram positivas, (Tabla 1)(A and Prabakaran 2011, Vijayakumar 2015)

Tabla 1. Tipos y número de metabolitos con actividad biológicamente activos producidos por actinobacterias.

Actividad	No.
Antimicrobianos	
Gram positivos	12,000
Gram negativos	5,000
Micobacterias	1,000
Antifúngicos	
Levaduras	3,500
Hongos fitopatógenos	1,800
Otros hongos	4,000
Atiprotzoarios	1,000
Quimioterapéuticos	
Antitumorales	5,500
Antivirales	1,600
Inhibidores enzimáticos	3,200
Supresores/moduladores inmunológicos	8,000
Antiinflamatorios	2,500

Fuente: Adaptado de (A and Prabakaran 2011)

2.2. Antibióticos producidos por actinobacterias

El género *Streptomyces* pertenece al orden de los Actinomycetales y es uno de los productores del característico olor a “tierra mojada” por el compuesto volátil conocido como geosmina (A and Prabakaran 2011). Es considerada como la bacteria con mayor potencial biotecnológico de nuestra era. De los 30,000 compuestos biológicamente activos producidos por microorganismos, que se han descubierto en los últimos 50 años por técnicas tradicionales que implican el aislamiento y la fermentación de los organismos unicelulares, más del 70% es producido por este

género y el 26 % de los considerados actinomicetos “Raros” (Tabla 2) (Hoskisson 2008, Berdy 2012, Solecka, Ziemska et al. 2012, Takano, Nishiyama et al. 2015, Vijayakumar 2015, Jackson, Crossman et al. 2018). De éstos, aproximadamente el 66% tienen actividad contra bacterias Gram-positivas, 30% contra Gram-negativas, 5% contra micobacterias y 34% con actividad antifúngica (Bérdy 2005, Solecka, Ziemska et al. 2012). Algunas cepas de *Streptomyces*, pueden llegar a producir una enorme gama de compuestos (Ait Barka, Vatsa et al. 2015).

Tabla 2. Número de especies actinomicetos productoras de metabolitos biológicamente activos.

Especies Actinomicetos	No.	Especies Actinomicetos	No.
<i>Streptomycetaceae:</i>		<i>Thermomonosporaceae</i>	
<i>Streptomyces</i>	8000	<i>Actinomadura</i>	345
<i>Streptoverticillium</i>	258	<i>Saccharothrix</i>	68
<i>Kitasatospora</i>	37	<i>Mycrobispora</i>	58
<i>Chainia</i>	30	<i>Actinosynema</i>	51
<i>Microellobosporia</i>	11	<i>Nocardiosis</i>	41
<i>Nocardioides</i>	9	<i>Nonomuria</i>	21
<i>Micromonosporaceae:</i>		<i>Thermomonospora</i>	19
<i>Micromonospora</i>	740	<i>Micropolyspora</i>	13
<i>Actinoplanes</i>	248	<i>Thermoactinomyces</i>	14
<i>Dactylosporangium</i>	58	<i>Thermoplyspora</i>	1
<i>Ampullariella</i>	9	<i>Thermoactinopolyspora</i>	1
<i>Glycomyces</i>	2	<i>Mycobacteriaceae:</i>	
<i>Catenuloplanes</i>	3	<i>Nocardia</i>	357
<i>Catellatospora</i>	1	<i>Mycobacterium</i>	57
<i>Pseudonocardiaceae:</i>		<i>Arthrobacter</i>	25
<i>Saccharopolyspora</i>	131	<i>Brevibacterium</i>	17
<i>Amycolatopsis</i>	120	<i>Proactinomyces</i>	14
<i>Kibdellosporangium</i>	34	<i>Rhodococcus</i>	13
<i>Pseudonocardia</i>	27	<i>Otros:</i>	
<i>Amycolata</i>	12	<i>Actinosporangium</i>	30
<i>Saccharomonospora</i>	2	<i>Microellobosporia</i>	11
<i>Actinopolyspora</i>	1	<i>Frankia</i>	7
<i>Streptosporangiaceae:</i>		<i>Synnenomyces</i>	4
<i>Streptosporangium</i>	79	<i>Sebekia</i>	3
<i>Streptoalloteicus</i>	48	<i>Elaktomyces</i>	3
<i>Spirillospora</i>	11	<i>Excelsospora</i>	3

<i>Planobispora</i>	10	<i>Waksmania</i>	3
<i>Kutzneria</i>	4	<i>Alkalomyces</i>	1
<i>Planomonospora</i>	2	<i>Catellatospora</i>	1
		<i>Erytrosporangium.</i>	1
		<i>Streptoplanospora</i>	1
		<i>Microechinospora</i>	1
		<i>Salinospora</i>	1

Fuente: Adaptada de (A and Prabakaran 2011).

Uno de los primeros hallazgos registrados del uso de los metabolitos secundarios en la medicina producidos por actinobacterias, se dio el 19 de octubre de 1943 por los bioquímicos Estadounidenses Selman Waksman, Albert Schatz, con el aislamiento de *Streptomyces griseus*, productor del primer aminoglucósido, la estreptomina, tratamiento inicial para la tuberculosis (S Edson and Keys 1983, Wainwright 1991), con lo cual se generó un gran interés de la comunidad científica a nivel mundial para la búsqueda y aislamiento de microorganismos pertenecientes a este Phylum con capacidades metabólicas para producir metabolitos con actividad antibiótica y antifúngica. A lo largo de los años se lograron aislar géneros y especies de actinobacterias productoras de diferentes clases de antibióticos, principalmente por la familia Streptomycetaceae, conociéndose como la “era dorada de los antibióticos”, que duró un lapso de un poco más de veinte años (Mahajan and Balachandran 2012). Entre ellos se encuentran diferentes clases de antibióticos: aminoglucósidos, β -lactámicos, glicopéptidos, macrólidos (eritromicina), péptidos de síntesis no ribosomal, policétidos, nucleósidos (Pentostatina), entre otros (Nanjwade, Chandrashekhara et al. 2010, Genilloud 2017).

Cada tipo tiene un mecanismo de acción diferente (Tabla 3), dándole a algunos de estos una alta especificidad para combatir ciertos patógenos o conferirles la capacidad de ser de amplio espectro.

Tabla 3. Ejemplo de clases de antibióticos producidos por actinobacterias y su mecanismo de acción.

Tipo	Ejemplo de antibióticos	Mecanismo de acción
Aminoglucósidos	Estreptomina y kanamicina	Inhibición de la síntesis de proteínas
β -lactámicos	Tienamicina	Inhiben la síntesis de peptidoglicano de la pared celular
Glicopéptidos	Vancomicina	Inhiben la síntesis de peptidoglicano de la pared celular
Macrólidos	Eritromicina	Inhiben síntesis proteica
Péptidos no ribosomales	Actinomicina D	Inhibe síntesis de ARN
Policétidos	Actinorrodina, anfotericina	Alteración en la permeabilidad de la membrana celular
Nucleósidos	Pentostatina	Inhibe síntesis de ADN
Tetraciclinas	Tetraciclina	Inhibe la traducción

Fuente: adaptado de (A and Prabakaran 2011, Mahajan and Balachandran 2012, Xu, T. Flavin et al. 2012, Ogawara 2016)

2.3. Antibióticos con capacidad antitumoral producidos por actinobacterias

Debido a su alta toxicidad en células humanas, ciertos antibióticos producidos por actinobacterias quedaron en desuso, sin embargo, esta toxicidad generó atención para utilizar dichos compuestos como agentes antitumorales.

El primer compuesto antibiótico producido por *Streptomyces caespitosus* que fue aprobado en 1956 por la Administración de alimentos y medicamentos de los Estados Unidos (FDA) para su uso como antitumoral fue la Mitomicina C (Galm, Hager et al. 2005). Esto incitó una vez más en los últimos 40 años la exploración en suelos para el aislamiento de nuevos géneros y especies de actinobacterias, con la finalidad de obtener nuevas clases de antitumorales entre las que se encuentran glicopéptidos, péptidos no ribosomales, nucleósidos, isoprenoides, indolcarbazoles, etc. (Singh, Gupta et al. 2018); cuyos mecanismos de acción fuesen variables, con el objetivo de lograr mayor efectividad en diferentes tipos de cáncer.

2.3.1. Doxorrubicina

Uno de los metabolitos secundarios más ampliamente utilizados a nivel mundial como quimioterapia, es la doxorrubicina, pertenece a la familia de las antraciclinas (Figura 1), producida por *Streptomyces peucetius*, considerado por la FDA como uno de los tratamientos de origen bacteriano más efectivos contra el cáncer de mama, colon, pulmón, ovario, hueso, entre otros (Jiang, Cao et al. 2010). A pesar de su habilidad extremadamente rápida de combatir el crecimiento de las células en división induciendo apoptosis. Si bien el mecanismo de acción de dicha molécula no se ha logrado describir con seguridad, a grandes rasgos se sabe que la doxorrubicina se intercala con el ADN inhibiendo la biosíntesis de ácidos nucleicos, pues evita que la enzima topoisomerasa II funcione de manera correcta en el proceso de replicación (F. Thorn, Oshiro et al. 2011), siendo dicha acción una de sus principales limitaciones en su uso puesto que su acción es no selectiva, actuando también en células no cancerosas causando efectos secundarios no deseados como vómito, mareos, pérdida de cabello, etc. (Wang, Konorev et al. 2004, Niraula, Kim et al. 2010).

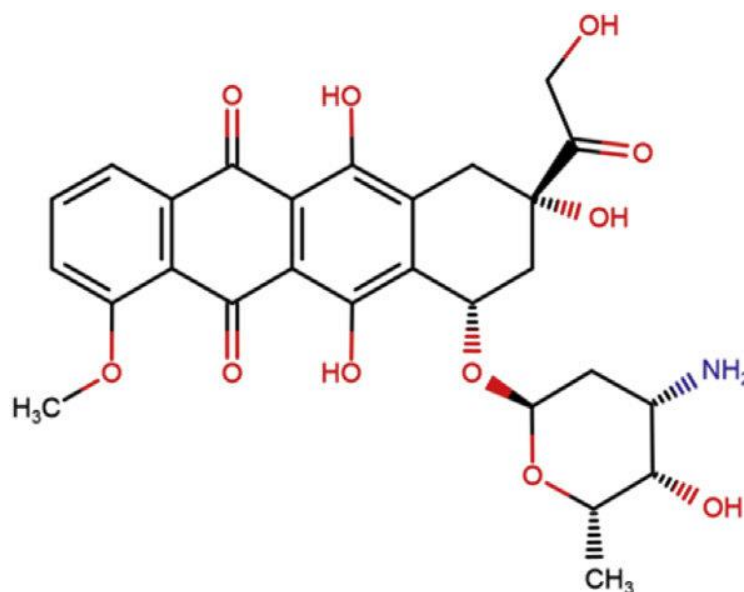


Figura 1.Estructura de la Doxorubicina (Bhattacharjee, Verma et al. 2009)

2.3.2. Actinomicina D

La actinomicina D, es un péptido no ribosomal (Figura 2), con actividad antibiótica y antineoplásica producida por diferentes cepas de *Streptomyces* (Crnovcic, Rückert et al. 2017), aprobada en 1964 para su uso como quimioterapia. Se encuentra dentro de la lista de medicamentos esenciales para el tratamiento del cáncer por la organización mundial de la salud (OMS) (Robertson, Barr et al. 2016). Es un potente inhibidor del crecimiento de las células con división rápida, ampliamente utilizado en el tratamiento contra diferentes tipos de cáncer como: riñón, testículos, melanoma, rabdomiosarcomas, sarcoma de Ewing, neuroblastomas, retinoblastomas, sarcomas uterinos, sarcoma de Kaposi, sarcoma botrioides, sarcoma del tejido blando, entre otros. El mecanismo de acción de la actinomicina D es la inhibición de la síntesis de ARN mediante la intercalación en el ADN bicatenario molde (Jones 2000, Guo, Fan et al. 2012). La capacidad de intercalación al ADN también ha sido utilizada para generar sintéticamente un derivado llamado 7-aminoactinomicina D (7-AAD), un fluorocromo ampliamente utilizado en estudios de citometría de flujo para

discriminar las células vivas (impermeables al colorante) de aquellas en procesos de apoptosis y necrosis (Schmid, Uittenbogaart et al. 2007)

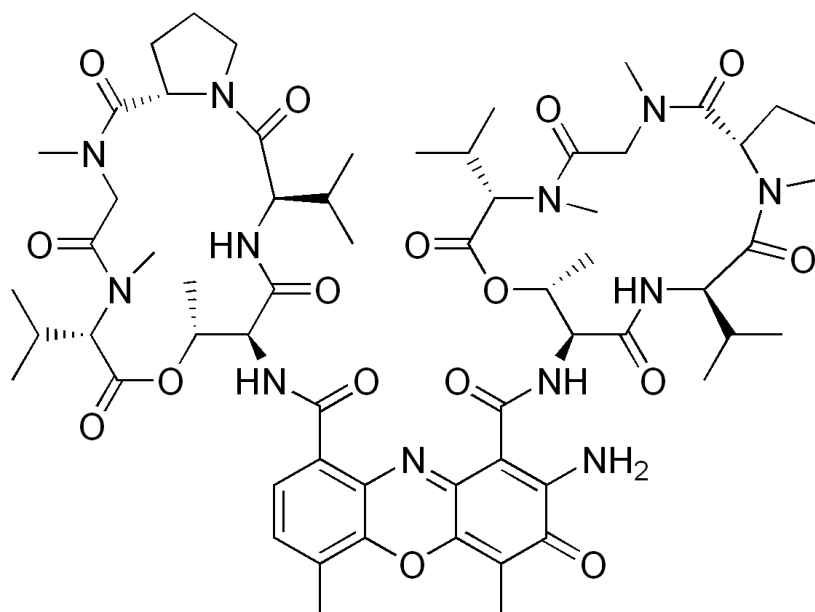


Figura 2. Estructura química de la Actinomicina D. Fuente: (Muller and Crothers 1968)

2.4. Resistencia a antibióticos y antitumorales

Los antibióticos producidos por microorganismos han existido durante miles de millones de años, dándole ventaja a las cepas productoras contra los microorganismos sensibles a estos metabolitos, inhibiéndolos o eliminándolos, para de esta manera no tener competencia contra los nutrientes presentes en su hábitat (D Wright and Poinar 2012), así como para la señalización entre células (Davies 2006, Aminov 2009, von Wintersdorff, Penders et al. 2016). Y así como los antibióticos son ancestrales, también lo es la resistencia a ellos, la cual se da principalmente por mutaciones en el ADN, y también por transferencia horizontal de genes de resistencia a antibióticos (ARGs), con la que los organismos receptores adquieren una gran ventaja adaptativa. Esta es, de hecho, el principal factor causante de las pandemias que han surgido en los últimos años (Bhullar, Waglechner et al. 2012, Lee Ventola 2015, von Wintersdorff, Penders et al. 2016).

Si bien con el descubrimiento de la estreptomicina en 1943 y en los años subsecuentes con otros tipos de antibióticos, principalmente producidos por miembros del género *Streptomyces* se diezmó la mortandad del ser humano a nivel mundial (Springer, G. Kidan et al. 2001), rápidamente surgieron patógenos resistentes a estas clases de antibióticos. En el año de 1959 se registraron los primeros casos de *Shigella sp.* resistente a tetraciclina, mientras que en 1962, en Reino Unido, se detectó *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (SARM) (Sengupta, Chattopadhyay et al. 2013), lo que llevó a realizar esfuerzos de aislamiento con la finalidad de encontrar nuevos metabolitos cuya actividad antibiótica no estuviese limitada por patógenos drogo resistentes. Con el avance en el descubrimiento de nuevos antibióticos, también han surgido microorganismos resistentes (figura 3), hasta llegar a las “super bacterias”, clasificadas como Panresistentes (PDR) a todos los antibióticos comerciales (Magiorakos, Srinivasan et al. 2011, Lee Ventola 2015).

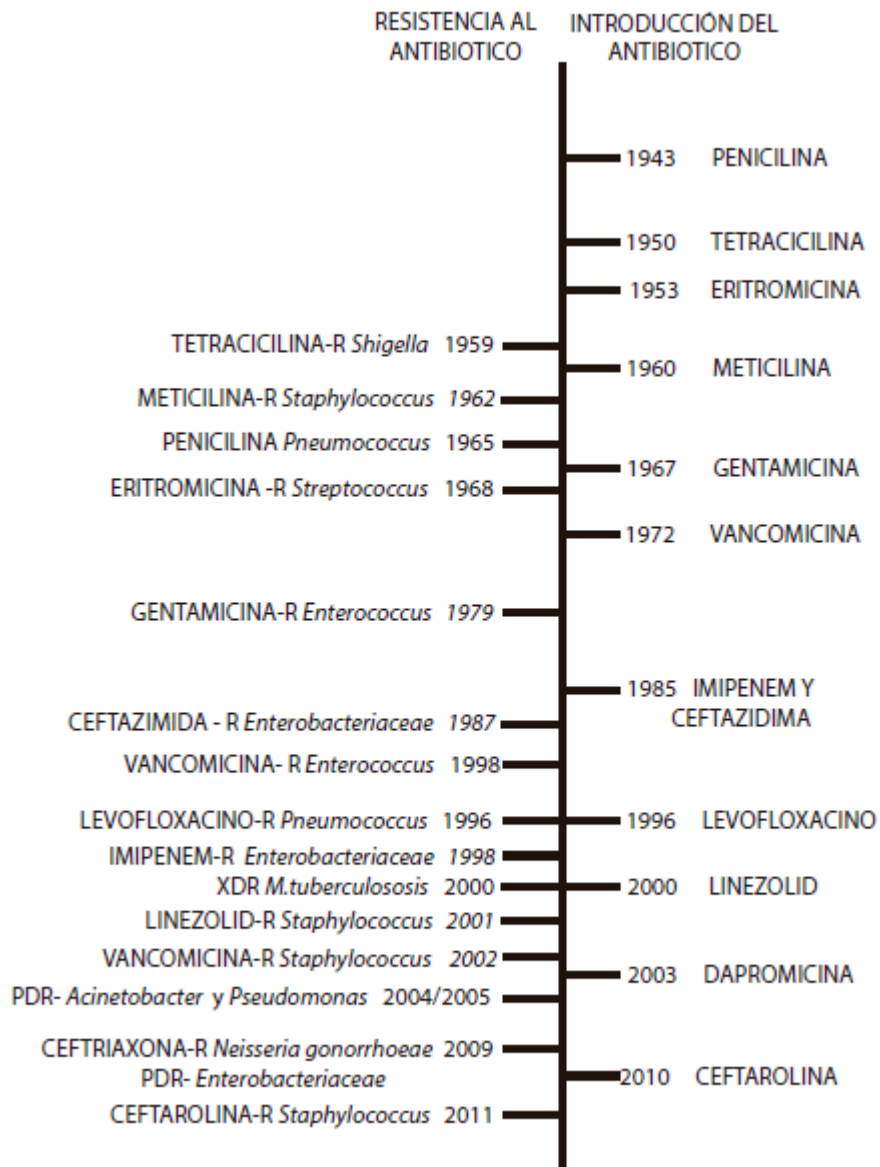


Figura 3. Línea del tiempo del descubrimiento de antibióticos y el surgimiento de microorganismos resistentes. Resistentes (R), Extremadamente resistentes (XDR): resistencia a casi todos los antibióticos, Panresistentes (PDR): resistencia a todos los antibióticos. Fuente: adaptada de (Lee Ventola 2015)

Con el surgimiento de las “Super bacterias”, fue creciendo la preocupación de las comunidades médicas, científicas y gubernamentales sobre el futuro de la salud. La organización mundial de la salud (OMS) declara que el número de muertes causadas por este tipo de patógenos ha ido en constante aumento. En el 2016 se registraron 2.8 millones de casos, desencadenándose en más de 700,000 muertes, estimando que para el año 2050 será la primera causa de muerte en el mundo. (WHO 2018)

Por otra parte, la OMS reporta que el cáncer ocasionó 8.2 millones de muertes en el año 2012, principalmente por afecciones causadas en el pulmón, hígado, estómago, colon y mama, estimando que en las próximas dos décadas el número de muertes se elevará a más de 22 millones, quedando posicionada únicamente por debajo de las enfermedades causadas por microorganismos multidrogoresistentes en las principales causas de muerte a nivel mundial. Tan solo en el año 2010, se estima se gastaron más de 1.16 trillones de dólares en tratamientos a nivel mundial, presentándose en un 70% en países sub desarrollados (WHO 2018).

Si bien existen múltiples formas de combatir esta enfermedad, como cirugía, radioterapia, quimioterapia, anticuerpos monoclonales, etc. (Urruticochea, Alemany et al. 2010), su tratamiento es sumamente complicado. Los procedimientos quirúrgicos pueden llegar a ser sumamente invasivos y las quimioterapias resultar ser tóxicas para las células sanas, ocasionando efectos adversos como náuseas, caída de cabello, inmunosupresión, etc. (Chakraborty and Rahman 2012). Aun así, actualmente la quimioterapia es uno de los principales tratamientos utilizados, sin embargo, a pesar de ser sustancias altamente tóxicas, las células cancerosas al tener una tasa altísima de reproducción, generan mutaciones de manera muy acelerada ocasionando que los tratamientos convencionales dejen de funcionar, pudiendo llegar a tener resultados muy variables en pacientes diferentes a pesar de tener la enfermedad localizada en el mismo tejido u órgano (Gerber 2008, DeSantis, Lin et al. 2014). Sin embargo, en las últimas dos décadas únicamente han sido aprobados cinco nuevos compuestos naturales para contrarrestar esta enfermedad (Gerber 2008, Hirsch, Scagliotti et al. 2017).

A pesar de que se sabe que el número de muertes causadas por patógenos resistentes a los antibióticos y el cáncer van en aumento exponencial, los esfuerzos de

bioprospección para el aislamiento de actinobacterias productoras de nuevas clases de antibióticos y antitumorales realizados en los últimos 50 años no han dado resultados muy favorables, debido a que se estaba cayendo en una redundancia en el aislamiento de cepas productoras de compuestos similares. Esto ha ocasionado el abandono de las compañías farmacéuticas, y para el 2010, únicamente 4 compañías se encontraban invirtiendo en la búsqueda de nuevos compuestos (A Cooper and Shlaes 2011).

Esta aparente falta de nuevos compuestos antimicrobianos está haciendo cuestionar a la comunidad científica: “¿Se acabaron las fuentes de nuevos antibióticos y antitumorales? ¿Por qué esa redundancia?”. En el caso particular de los antibióticos, investigaciones muestran las frecuencias en las que se da la producción de ciertos antibióticos relacionadas a la frecuencia en el aislamiento de actinobacterias en suelo (Figura 4), por ejemplo: La estreptotricina se puede encontrar en aproximadamente el 10% de los *Streptomyces*, la estreptomycinina en el 1%, actinomicina en el 0.1%, eritromicina y vancomicina en 10^{-5} aislados de actinobacterias (Baltz 2007, Ait Barka, Vatsa et al. 2015) y al ser los antitumorales pertenecientes a la familias de este tipo de compuestos, seguramente está sucediendo lo mismo. Las cifras que se han obtenido de dichas investigaciones han resultado reveladoras y ayudan a explicar esos cuestionamientos, generando una respuesta prácticamente obvia. Después de más de cinco décadas de exploración y como resultado de esos esfuerzos de aislamiento, se tiene que el 98 % de los metabolitos bioactivos conocidos, fueron obtenidos de bacterias aisladas del suelo (Subramani and Aalbersberg 2012). Por lo tanto era estrictamente necesario buscar nuevas áreas de estudio como fuente de microorganismos con nuevos potenciales biotecnológicos, como la exploración de lugares con un alto grado de endemismo o ambientes extremos como los desiertos (Radhakrishnan, Gopikrishnan et al. 2013, Encheva, Stoyanova et al. 2014), que permitieran evitar la redundancia en el aislamiento. Los ambientes marinos también representan nuevas fuentes de microorganismos, dado que son una fuente casi inagotable de estos recursos, pues cubren el 70% de nuestro planeta y las condiciones de pH, salinidad, temperatura, nutrientes, y presión son muy diferentes a las condiciones terrestres. Son en estos nuevos ambientes donde pudiesen

existir nuevos géneros y especies de microorganismos con la capacidad de producir compuestos antimicrobianos y antitumorales no antes reportados (Manivasagan, Kanga et al. 2014, Kannan, Sivaperumal et al. 2018, Rajagopal and Kannan 2018).

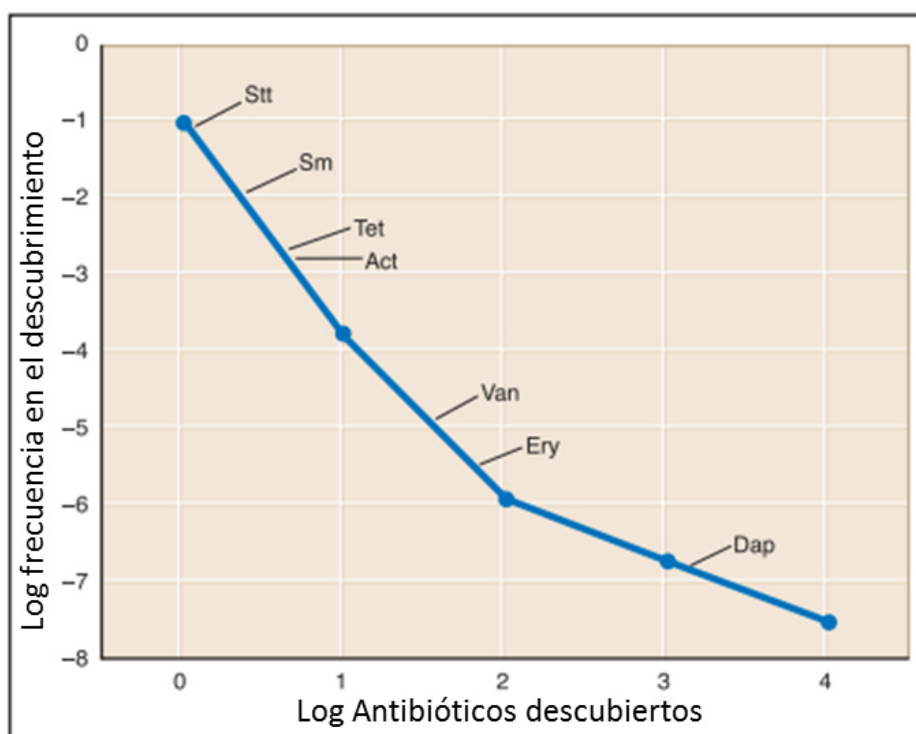


Figura 4. Frecuencia de descubrimiento de nuevos antibióticos en función del total de antibióticos aislados en suelo. Se muestran varios antibióticos con líneas apuntando a sus frecuencias de descubrimiento entre actinomicetos aleatorios, Act (Actinomicina D), Dap (Daptomicina), Ery (Eritromicina), Sm (Streptomycina), Stn (Streptotricina), Tet (Tetraciclina), Van (Vancomicina). Fuente: (Baltz 2007)

2.5. Actinobacterias marinas como fuente de nuevos metabolitos secundarios

Los océanos en el mundo cubren más del 70% de la superficie en el planeta tierra, son el reservorio más grande de microorganismos que existe. Los hábitats de esta índole debido a la presión ecológica en la que se encuentran constantemente, como la competencia por espacio, depredación y las propiedades físicas como la salinidad, presión, temperaturas (que van de 0 a más de 100°C), pH, etc., han ocasionado que

los microorganismos que habitan este ecosistema tan exigente desarrollen adaptación a dichas condiciones, llevándolos a producir metabolitos secundarios con múltiples actividades biológicas, como diferentes clases de antibióticos, antitumorales, enzimas, etc. diferenciándolos de sus contrapartes terrestres (Cumsille, Undabarrena et al. 2017, Sarmiento-Vizcaino, Gonzalez et al. 2017).

En los últimos años, estudios diversidad y biogeografía de actinobacterias marinas, señalan que al igual que en el suelo, este tipo de microorganismos es cosmopolita en ambientes acuáticos, estando presentes en agua, costas, ventas hidrotermales, sedimento, ambientes hipersalinos, asociadas a corales, esponjas marinas, algas, animales, estromatolitos etc., representando en algunas ocasiones el 10% de los aislados de muestreo de esas zonas (Stach and Bull 2005, Ward and Bora 2006, Manivasagan, Venkatesan et al. 2014). Uno de los datos que demuestran la ubicuidad de las actinobacterias y de su ancestría en nuestro planeta, es su presencia hasta en un 9% en las comunidades microbianas que forman los estromatolitos (considerados fósiles vivientes, responsables de la oxigenación de nuestro planeta y la formación de la capa de ozono, datan de hace más de 3,500 millones de años) (Ward and Bora 2006, Baumgartner, Spear et al. 2009)

Una de las primeras evidencias de la existencia de especies diferentes a las cultivadas en ambientes terrestres fue el aislamiento y caracterización de la primera actinobacteria marina: *Rhodococcus marinonascens* (Subramani and Aalbersberg 2012, Manivasagan, Venkatesan et al. 2014). En los años subsecuentes se han logrado aislar géneros como *Streptomyces*, *Dietzia*, *Marinophilus*, *Solwaraspora*, *Williamsia*, *Verrucosipora*, *Salinibacterium*, *Aeromicrobium*, *Salinispora*, *Marinispora* (Jensen, Gontang et al. 2005). Entre estos, algunos de los hallazgos más importantes fue el aislamiento de *Aeromicrobium marinum*, la cual necesita sal como requisito obligatorio para crecer, o el caso del género *Salinibacterium* que puede tolerar arriba del 10% de concentración en NaCl y por último dos géneros recientemente descritos *Salinispora* y *Marinispora*, las cuales requieren de agua de mar para crecer, demostrándose que existen géneros y especies autóctonas (Jensen, Gontang et al. 2005, Subramani and Aalbersberg 2012, Sirisha, Haritha et al. 2013, Kamjam,

Sivalingam et al. 2017) productoras de metabolitos con múltiples actividades biológicas, entre los que se encuentran los antibióticos y antitumorales, de los cuales podemos observar algunos ejemplos en la Tabla 4.

Tabla 4. Metabolitos producidos por actinobacterias marinas.

Género	Compuesto	Actividad
<i>Actinoalloteichus</i>	Neomaclafungina	Antifúngico
<i>Actinoalloteichus</i>	Cyanogramidas	Antibiótico
<i>Alcinomadura</i>	Bendigoles	Antibiótico, citotóxico
<i>Marinactinospora</i>	Marinacarbolicinas A–D,	Actividad antiplasmoidal
<i>Marinactinospora</i>	Marinacarbolicinas	Anti malaria
<i>Marinispota</i>	Marinimoicinas	Citotóxico
<i>Microbacterium</i>	Microbacterinas A	Antitumoral
<i>Micromonospora</i>	Levantilidas	Citotóxico
<i>Micromonospora</i>	Levantilida C	Anti proliferativo
<i>Micromonospora</i>	Juvenimicina C	Agente anticáncerígeno
<i>Nocardiopsis</i>	Nocardiopsinas A y B	Antitumoral, antimaterial
<i>Nocardiopsis</i>	Nocapiranonas	Reduccion factor pro-inflamación
<i>Pseudonocardia</i>	Pseudonocardiocinas A–C	Antibiótico, antitumoral
<i>Salinispora</i>	Salinosporamida A	antitumoral
<i>Salinispora</i>	Salinoquinonas	Citotóxico
<i>Salinispora</i>	Saliniketales	Prevención carcinogénesis
<i>Salinispora</i>	Arenicolidas	Citotóxico
<i>Salinispora</i>	Salinipostinas	Anti malaria
<i>Serinicoccus</i>	Alcaloide indol	Anti bacterial
<i>Streptomyces</i>	Manumicina	Antibiótico, antitumoral
<i>Streptomyces</i>	Chalcomicina	Antibiótico, antitumoral
<i>Streptomyces</i>	Grincamicinas B–F	Anti-cáncer
<i>Streptomyces</i>	Marfuraquinocinas	Antibiótico, citotóxico
<i>Streptomyces</i>	Tetroazolemicinas A y B	Fijación iones metálicos
<i>Streptomyces</i>	D potámidas B-D	Antibiótico
<i>Streptomyces</i>	Benzoxacistol	Actividad inhibitoria contrala enzima glucógeno sintasa quinasa-3b
<i>Streptomyces</i>	Carbomicina	Antibiótico vs Gram negativos
<i>Streptomyces</i>	Streptopirrolidina	Anti-angiogénesis
<i>Streptomyces</i>	Strepesquitrio	Actividad inhibitoria contra la producción de

		TNF α inducida por lipopolisacáridos
<i>Streptomyces</i>	Estreptoclorina	Antibiótico, antiinflamatorio, antiparásito, antitumoral
<i>Verrucosispora</i>	Abissomicinas J-L	Antibiótico

Fuente: adaptada (Dhakai, Pokhrel et al. 2017, Kamjam, Sivalingam et al. 2017)

Reportes basados en el aislamiento de actinobacterias marinas durante los años 1991-2013, señalan que el género *Streptomyces* es prácticamente ubicuo y conforma más del 50% de los aislados totales en los muestreos, así como es el que produce más del 66% de los compuestos bioactivos Figura 5 (Valliappan, Sun et al. 2014, Cumsille, Undabarrena et al. 2017).

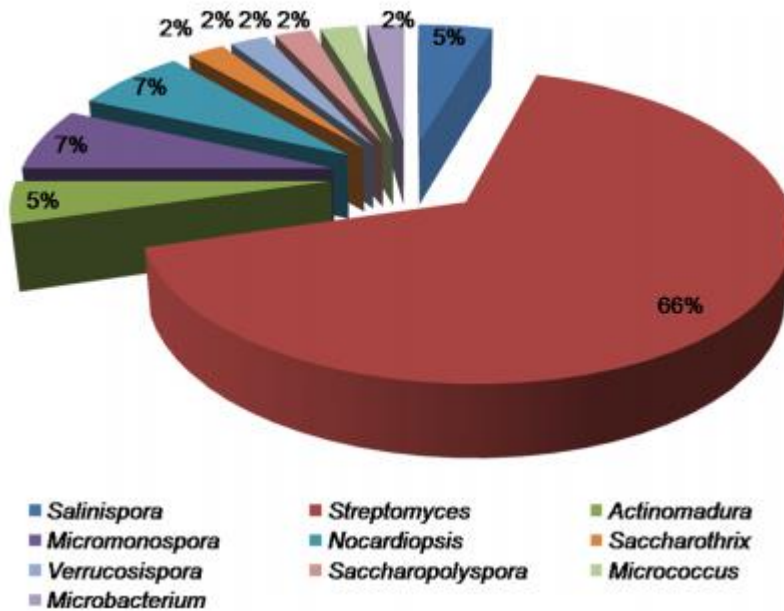


Figura 5. Frecuencia de aislamiento de actinobacterias en ambientes marinos. Fuente: (Valliappan, Sun et al. 2014)

Sin embargo, en estudios de diversidad mediante la secuenciación del gen 16S ARNr, se han encontrado >1,300 unidades taxonómicas operacionales (OTU's), de las cuales se estima que una gran proporción pertenece a nuevos géneros y especies que son muy complicadas de cultivar o aún no se han logrado y podrían tener la capacidad de producir compuestos bioactivos que nos ayuden a resolver la creciente necesidad para combatir diferentes enfermedades, entre otras cosas (T Bull and E.M. Stach 2007, De Corte, Srivastava et al. 2017), llevándonos a la necesidad de generar nuevas estrategias de cultivo.

2.6. Estrategias de cultivo actinobacterias “géneros raros”

Actualmente la búsqueda de nuevos metabolitos se está enfocando en el aislamiento de géneros “raros”, categorizando todos aquellos que no pertenezcan a la familia Streptomycetaceae, específicamente al género *Streptomyces*, o que su frecuencia de aislamiento sean muy bajos con parámetros de cultivo convencionales (Manivasagan, Venkatesan et al. 2014, Azman, Othman et al. 2016). Dado que este tipo de actinobacterias tienen capacidades metabólicas únicas, pueden conducirnos al desarrollo de nuevos antibióticos que tengan una mayor eficacia contra patógenos multidrogoresistentes o contra enfermedades como el cáncer (Hassan and Lateef Shaikh 2017, Jiang, Tuo et al. 2018).

Se asume que el aislamiento de géneros considerados como “Raros” tienen una mayor dificultad para cultivarse y baja presencia en las muestras, por lo que es necesario enriquecer los medios de cultivo convencionales de manera específica para cada grupo taxonómico, por ejemplo: con macromoléculas como fuente de carbono y nitrógeno: almidones, caseína, quitina, celulosa, harina de soya y ácidos húmicos como promotores de crecimiento (Hayakawa, Yoshida et al. 2004, Tiwari and K Gupta 2011, Arocha-Garza, Canales-Del Castillo et al. 2017), o bien, aplicando tratamientos físicos y químicos a las muestras, basándose principalmente en la resistencia del microorganismo o de sus esporas (Tabla 5).

Tabla 5. Tratamientos para el aislamiento selectivo de actinobacterias.

Tratamiento	Género
Químicos atrayentes: vainillina y bromuros	<i>Dactylosporangium</i> y <i>Catenuloplanes</i>
Radiación	<i>Rhodococcus</i> , <i>Nocardiopsis</i> , <i>Nocardia</i> y <i>Streptosporangium</i>
luz ultravioleta	<i>Nocardiopsis</i> , <i>Nocardia</i> y <i>Pseudonocardia</i>
Secado 120°C 1 h.	<i>Microbispora</i> y <i>Streptosporangium</i>
Calentamiento 60°C 30 min.	<i>Micromonospora</i>
Ultrasonido	<i>Streptomyces</i> (no convencionales)
Fenol 1.5%	<i>Micromonospora</i> , <i>Microbispora</i>
Cloramina-T	<i>Herbidospora</i> , <i>Microbispora</i> , <i>Microtetraspora</i> , <i>Nonomuraea</i> y <i>Streptosporangium</i>
120 °C por 1 h + fenol 1.5%	<i>Microtetraspora</i> y <i>Microbispora</i>
100 °C por 1 h + fenol 1.0%	<i>Actinomadura</i>
Tetraciclina	<i>Streptomyces</i> (no convencionales)
Anfotericina B	<i>Streptomyces</i> (no convencionales)

Fuente: (Hayakawa, Yoshida et al. 2004, Bredholt, A Galatenko et al. 2007, Hayakawa 2008, Jiang, Cao et al. 2010, Jinhua and Liping 2011, Tiwari and K Gupta 2011, Jiang, Li et al. 2016, Ranjan and J. Jadeja 2016, Ng and Yuan Annie Tan 2018).

2.7. Minería genómica

Con el inicio de la era genómica en 1995, se produjo una revolución en la genética y bioquímica de la biosíntesis de productos naturales.

La primera secuenciación de un genoma completo de una actinobacteria (*Streptomyces coelicolor*) en el 2002 (Bentley, Chater et al. 2002), hizo evidente la poca información que se tenía en términos de metabolitos secundarios del organismo

modelo en la producción de antibióticos. Para ese tiempo se sabía que producía actinorodina, metilenomicina y undecilprodigiosina. Con el desarrollo del programa bioinformático antiSMASH se han podido identificar un sin número de *clústers* biosintéticos presentes en los genomas de las actinobacterias (Weber, Blin et al. 2015, J. Hug, D. Bader et al. 2018), por ejemplo, se sabe que *Streptomyces coelicolor* puede producir más de 20 metabolitos secundarios bioactivos que se encuentran silenciados o se expresan en muy pequeñas cantidades (Gomez-Escribano and Bibb 2011). Los análisis *in silico* de los genomas permiten predecir BGCs, para su expresión heteróloga y su elucidación estructural. Las estrategias de biología sintética que las “ómicas” han permitido desarrollar, se resumen en la figura 6.

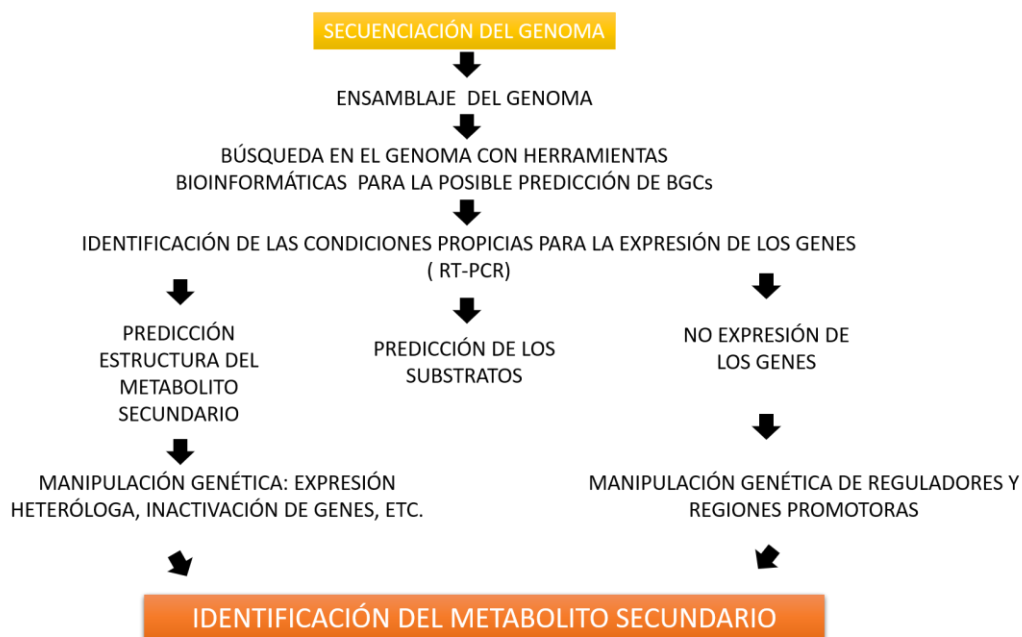


Figura 6. Estrategias para la búsqueda de nuevos compuestos bioactivos mediante minería genómica. Fuente: adaptado de (Corre and L Challis 2009)

2.8. Nuevos enfoques: actinobacterias no cultivables

De acuerdo con análisis del gen 16S ARNr, se sabe que tan solo el 1% de las bacterias son cultivables en condiciones de laboratorio. Es necesario utilizar nuevos métodos para poder acceder a la gran diversidad de metabolitos secundarios que producen los microorganismos que no se han logrado cultivar. Una manera de eludir las limitaciones causadas por las técnicas tradicionales cultivos dependientes, es el uso de la metagenómica, cuyo enfoque se basa en el análisis del ADN total que se encuentra en una muestra, ayudándonos de esta manera a tener acceso al reservorio oculto de las secuencias codificantes de los metabolitos secundarios que aún no se han identificado (Brady, Simmons et al. 2009, Vartoukian, Palmer et al. 2010).

En general existen dos vías principales para las técnicas metagenómicas, la estrategia más antigua se basa en el escrutinio individual de genes funcionales, la cual se lleva a cabo con la ayuda de enormes bibliotecas de cósmidos al azar, usualmente seleccionados por su bioactividad. La estrategia más reciente se basa en la similitud de las secuencias de ADN de los *clústers* de genes biosintéticos (BGCs) conservados, para hacer una comparación y tener acceso selectivo a BGCs potenciales dentro de una muestra ambiental (Figura 7). Sin embargo, al igual que en la minería genómica, uno de los principales obstáculos en el campo de la metagenómica es el uso de los organismos hospederos, pues actualmente el organismo modelo por excelencia utilizado para la expresión heteróloga es *E. coli*, el cual tiene capacidades limitadas de expresión de productos naturales complejos, dado principalmente por los tamaños de inserción y modificaciones post traduccionales, haciendo no factible la expresión de metabolitos secundarios con una arquitectura biosintética complicada como policétidos, péptidos no ribosomales, entre otros (Lok 2015, Owen, Charlop-Powers et al. 2015). Por lo cual actualmente se están probando nuevos hospederos con la capacidad de expresar este tipo de metabolitos secundarios (Brady, Simmons et al. 2009, Nah, Pyeon et al. 2017).

Sin embargo, a pesar de los grandes avances que se han desarrollado en la era de revolución genómica, únicamente la combinación de todas las técnicas disponibles e intercambio de conocimiento entre microbiología, biología molecular y química

ayudaran a descifrar y explotar todo el reservorio de metabolitos secundarios que aún están por descubrir entre los actinomicetos (J. Hug, D. Bader et al. 2018).

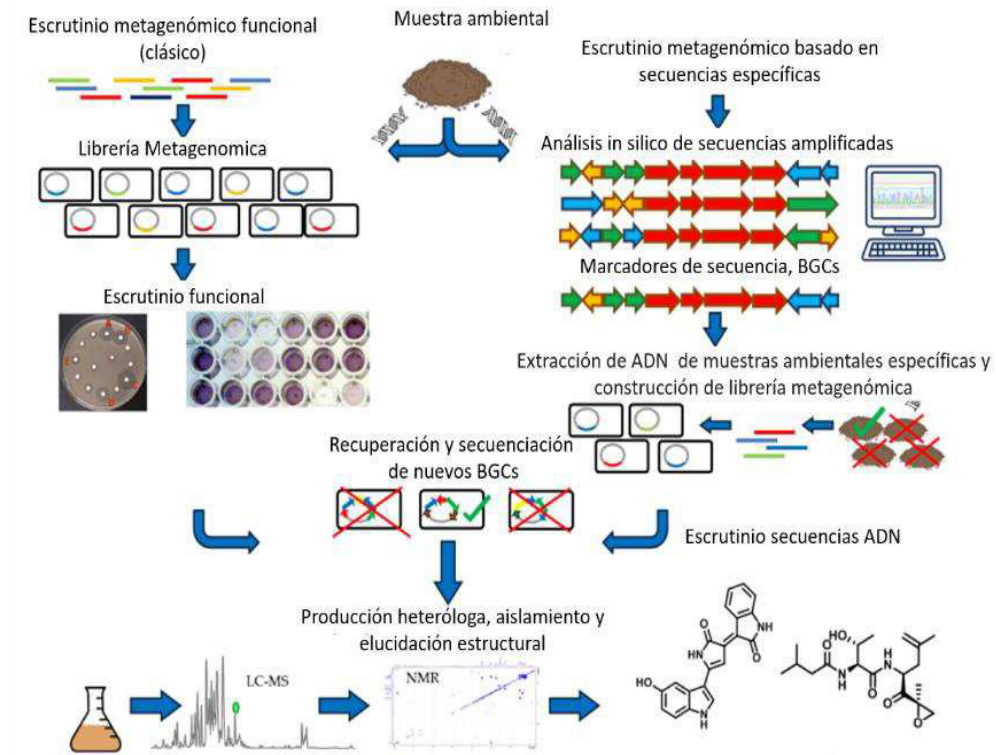


Figura 7. Esquema que representa los dos acercamientos en el uso de la metagenómica

2.9. ¿Por qué realizar bioprospección en Cuatro Ciénegas?

El valle de Cuatro Ciénegas, Coahuila, (CC) es un área de Protección de Flora y Fauna, de un poco más de 85 mil hectáreas decretada el 7 de noviembre de 1994, localizado a 740 m sobre el nivel del mar, se encuentra rodeado por montañas que forman parte de la Sierra Madre Oriental, que por su ubicación tiene escasa precipitación anual de ≈ 150 mm. El Valle de Cuatro Ciénegas es considerado el humedal más importante en el desierto Chihuahuense y una de las tres ecorregiones desérticas más importantes del mundo (Souza, Espinosa-Asuar et al. 2006). En el

lugar existen un gran número de cuerpos de agua, como pozas, ríos y lagunas, las cuales presentan características limnológicas variadas, además de diferencias notables en temperatura, salinidad y química del agua, con gran cantidad de sales de calcio y magnesio, muy bajo contenido de fósforo y nitrógeno. (Souza, Eguiarte et al. 2008, Pajares, Bonilla-Rosso et al. 2012)

En el valle de Cuatro Ciénegas, las proporciones de nitrógeno y fósforo (N:P) son extremadamente altas, dada la gran limitación de fósforo (P) (157:1) o a un muy bajo N (1.8:1). El desbalance estequiométrico es lo que caracteriza a este oasis extraordinario, es por esto que sus aguas son transparentes ya que las algas que requieren un equilibrio estequiométrico normal de N:P 16:1. CC no pueden crecer y por lo tanto permiten a las comunidades ancestrales desarrollarse ya que sus aguas asemejan las condiciones de los mares del precámbrico (Souza, Eguiarte et al. 2008, Breitbart, Hoare et al. 2009), lo que ha generado una adaptación, radiación evolutiva y dinámica poblacional de los organismos que le sobreviven muy diferente al resto del mundo, contribuyendo al endemismo biológico de la zona, la cual es la de mayor grado en todo América del norte (Souza, Espinosa-Asuar et al. 2006).

Gracias al aislamiento geográfico y las condiciones de oligotrofia extremas con las que cuenta esta zona, se ha desarrollado un nivel de especiación inusual al resto de nuestro planeta; a la fecha se han registrado más de 70 especies endémicas de flora y fauna, entre las que se incluyen peces, anfibios, reptiles, crustáceos, moluscos, caracoles e insectos, eso sin incluir la enorme diversidad de insectos, ácaros, hongos y por supuesto bacterias descendientes directos de los linajes más antiguos conocidos, aquellos que forman comunidades como tapetes microbianos y estromatolitos, considerados fósiles vivientes, pues han habitado nuestro planeta tierra desde hace más de 3,800 millones de años. Los estromatolitos y tapetes microbianos están formados por capas de colores, cada una con una función metabólica única, las cuales pasan de la fijación de carbono por las quimiolitotrofas (metanógenas y bacterias reductoras del azufre) a la fotosíntesis anaeróbica por las bacterias púrpuras y verdes del azufre y en la capa superior destacan las cianobacterias, quienes desarrollaron la fotosíntesis oxigénica y enriqueciendo lentamente la atmósfera con oxígeno y

formaron la capa de ozono (Souza, Espinosa-Asuar et al. 2006, Himmler, Smrzka et al. 2018, Moreno-Letelier, Souza et al. 2018, Sallstedt, Bengtson et al. 2018).

En los últimos 18 años de estudio en las pozas de Cuatro Ciénegas, se han logrado identificar múltiples comunidades de bacterias Gram-Positivas, Gram-negativas, hongos y virus, los cuales al ser analizados por técnicas moleculares en su gran mayoría son endémicos de la zona (Escalante, Eguiarte et al. 2008, Moreno-Letelier, Souza et al. 2018) Como es el caso de *Bacillus coahuilenses* que presenta elementos particulares en su genoma que le permite adaptarse a las condiciones de bajos nutrientes, en cuya membrana con sulfolípidos tiene una fotorodopsina que le permite obtener ATP a partir de la luz del sol. (Alcaraz, Olmedo et al. 2008)

Análisis de reloj moleculares basados en eventos geológicos, sugieren que la mayoría de las cepas cultivadas de cianobacterias y de *Bacillus* divergieron hace cientos de millones de años de sus parientes más cercanos. De los 2,500 *Bacillus* cultivados que fueron analizados de la laguna intermedia del sistema hidrológico el Churince (LI), se identificaron 256 cepas, con un porcentaje de identidad abajo del 97% en comparación con las especies reportados en las bases de datos internacionales, sugiriéndonos el alto grado de endemismo en la (IL), aportando casi en un 25% el número de nuevas especies de *Bacillus* conocidas en el mundo (Moreno-Letelier, Souza et al. 2018).

En cuanto al aislamiento de actinobacterias en las pozas de Cuatro Ciénegas en el año 2010 se reportó el cultivo exitoso de algunos termófilos de los géneros *Citroccocus*, *Kocuria*, *Arthrobacter*, *Cellulomonas*, *Nocardioides*, *Microbacterium* (Cerritos, Eguiarte et al. 2011). Comprobando de esta manera la basta diversidad de actinobacterias cultivables en el valle.

Si bien en los últimos años una manera de analizar la diversidad microbiológica es mediante técnicas moleculares con estudios de metagenómica, en la laguna intermedia se realizaron estudios de metagenómica de tapetes microbianos de sedimentos de la poza, que al ser analizados y comparados con metagenomas de diferentes partes del mundo como los obtenidos de un “ Hot spot” de biodiversidad como el rio perla en China o Guerrero Negro en México, el índice de Shannon de la

IL del sistema Churince presenta un mayor grado de diversidad microbiológica (Moreno-Letelier, Souza et al. 2018).

Todo lo anterior nos indica que las pozas de Cuatro Ciénegas son un lugar ideal para aislar microorganismos únicos como las actinobacterias, cuyas propiedades metabólicas las han convertido en el blanco perfecto para la investigación con aplicaciones biotecnológicas. Además, la búsqueda de nuevos recursos naturales en la naturaleza no debería divorciarse del estudio de la biodiversidad y los esfuerzos de conservación. Las necesidades de bioprospección demandan un esfuerzo diestro e innovador de los científicos para que la generación de nuevo conocimiento empuje el desarrollo de las ciencias aplicadas como la farmacéutica y la medicina de una manera responsable y justa en la explotación de los recursos biológicos.

Es importante mencionar que este trabajo considera que los resultados obtenidos, producto de los experimentos, estarán sujetos a los lineamientos establecidos por el protocolo de Nagoya, y bajo el Convenio sobre la Diversidad Biológica (CDB), del cual México forma parte, cuyos objetivos principales son: i) la conservación de la diversidad biológica, ii) la utilización sostenible de sus componentes y iii) la participación justa y equitativa en los beneficios que se deriven de la utilización de los recursos genéticos en las generaciones actuales y futuras (Coolsaet, Batur et al. 2015, Smith, Silva et al. 2017).

Las implicaciones de lo anterior suponen que, de obtenerse productos que lleven beneficios económicos a partir de la biodiversidad recuperada del Área Natural Protegida, los beneficios deberán ser compartidos con la población de Cuatro Ciénegas, o bien, con los propietarios de las tierras donde se encuentren localizadas las pozas donde se realizan los muestreos, por ejemplo, las pozas que pertenecen al Ejido *El Venado*.

3. JUSTIFICACIÓN

Se estima que para el año 2050 el cáncer y las enfermedades causadas por microorganismos multidrogosresistentes se convertirán en las dos principales causantes de muertes a nivel mundial. En el caso del cáncer se prevé que de 8.2 millones se eleve a más de 22 millones de muertes y que las enfermedades por patógenos resistentes pasen de 700, 000 a más de 10 millones de muertes.

Existe una necesidad urgente de buscar nuevas fuentes de antibióticos y antitumorales para contrarrestar dichas enfermedades; se sabe que las actinobacterias son la principal fuente de metabolitos bioactivos, pues producen más de la mitad de los fármacos naturales utilizados actualmente, un 70% de estos son producidos por el género *Streptomyces*.

Es necesario realizar esfuerzos de bioprospección en lugares poco explorados o con un alto grado de endemismo, como el valle de Cuatro Ciénegas, Coahuila, el cual sin duda será una fuente inmensa para cultivar microorganismos productores de metabolitos que no hayan sido reportados anteriormente y que puedan ser utilizados contra microorganismos multidrogosresistentes y diferentes tipos de cáncer.

4. HIPÓTESIS

Existe una extensa diversidad de actinobacterias endémicas, cultivables, mesófilas, de origen marino en Cuatro Ciénegas, Coahuila, que producen compuestos con actividad antimicrobiana y/o antitumoral *in vitro*.

5. OBJETIVOS

5.1. Objetivo general

Aislar y analizar la diversidad genética de Actinobacterias cultivables de Cuatro Ciénegas Coahuila, productoras de metabolitos secundarios con actividad antimicrobiana y/o antitumoral.

5.2. Objetivos específicos

-Cultivar y aislar actinobacterias mesófilas provenientes de las pozas de Cuatro Ciénegas Coahuila.

-Identificar por medio de la secuenciación del gen 16S las actinobacterias aisladas de las pozas de Cuatro Ciénegas Coahuila.

-Identificar actinobacterias con actividad antimicrobiana contra *Escherichia coli* O157:H7, *Staphylococcus aureus* y *Candida albicans* ATCC 14053.

-Determinar la concentración mínima inhibitoria 50 (IC₅₀) de los metabolitos secundarios producidos por las actinobacterias aisladas contra células de adenocarcinoma mamario MCF-7 (ATCC® HTB-22™), adenocarcinoma en colon Caco-2 (ATCC® HTB-37™), carcinoma en pulmón NCI-H460 (ATCC® HTB-177™), melanoma maligno SK-MEL-28 (ATCC® HTB-72™), adenocarcinoma en ovario OVCAR-3 (ATCC® HTB-161™), leucemia mielógena crónica K-562 (ATCC® CCL-243™), y células normales de Fibroblastos de piel Detroit 548 (ATCC® CCL-116) como control.

-Purificar los compuestos biológicamente activos por técnicas cromatográficas.

-Identificación y determinación estructural de los compuestos biológicamente activos por espectrometría de masas

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1. Áreas de estudio.

Las muestras de agua/sedimento se colectaron en la laguna intermedia del sistema hidrológico El Churince (LI), Pozas Rojas (PR), Poza El Mojarral (MJ), Poza El Anteojo (AN), Pozas Azules (PA), El Arqueano (PAQ), Poza La Becerra (PB) ubicadas en el área natural protegida del valle de Cuatro Ciénegas Coahuila. (Figura 8) del mapa con la ubicación de las pozas) Tabla 6. en un periodo de dos años 2014-2016.

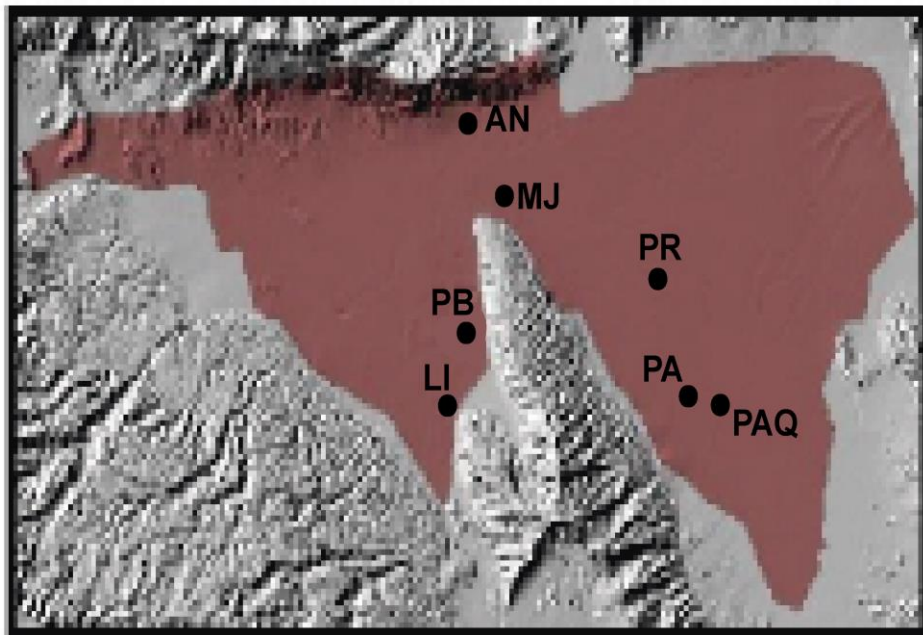


Figura 8. Mapa del Valle de Cuatro Ciénegas Coahuila ubicando las pozas donde se realizó la colecta de muestras: la laguna intermedia del sistema hidrológico El Churince (LI), Pozas Rojas (PR), Poza El Mojarral (MJ), Poza El Anteojo (AN), Pozas Azules (PA) El Arqueano(PAQ), Poza La Becerra (PB)

Tabla 6. Geolocalización de las pozas donde se colectaron las muestras.

NOMBRE DE LA POZA	COORDENADAS
Laguna intermedia Churince (LI)	26°50'53.79" N, 102°08'30.29" O
Pozas Rojas (PR)	26°52'16.8" N, 102°1'11.3" O
Poza el Mojarral (MJ)	26°55'23" N, 102°07'06." O
Poza El Anteojo (AN)	26°58'08" N, 102°07'14." O
Pozas Azules (PA)	26°49'39.01" N, 102°01'26." O
El Arqueano (PAQ)	26°49'41.7" N, 102°01'28.7" O
Poza La Becerra (PB)	26°52'40.99" N, 102°8'17.41" O

6.2. Muestreo.

Para la toma de muestras se definieron puntos de muestreo (Tabla 1) se colectó agua con sedimento de no más de 0.2 cm de profundidad en tubos estériles de 50 ml. Para el caso de la laguna intermedia del Churince se colectaron muestras en 6 puntos de muestreo (Tabla 7, Figura 9) y para el resto de las pozas se realizó colecta en un solo punto. Las muestras colectadas fueron transportadas inmediatamente a temperatura ambiente, al laboratorio de biología molecular del Centro de bachillerato tecnológico agropecuario No 22 en Cuatro Ciénegas, Coahuila (CBTa No 22) para ser tratadas y sembradas. (Permiso de muestreo SEMARNAT SGPA/DGVS/03121/15 y Reglamento contractual de investigación Rancho Pozas Azules PRONATURA NORESTE AC) firmado en cada ocasión en que se colectaron muestras.

Tabla 7. Puntos de muestreo en la laguna intermedia del sistema hidrológico Churince (IL)

PUNTO DE MUESTREO	COORDENADAS
A	26°50'53.79" N, 102°08'30.29" O
B	26°50'53.53" N, 102°08'31.81" O
C	26°50'54.37" N, 102°08'32.96" O
D	26°50'55.30" N, 102°08'33.63" O
E	26°50'55.63" N, 102°08'35.28" O
F	26°50'56.57" N, 102°08'36.03" O

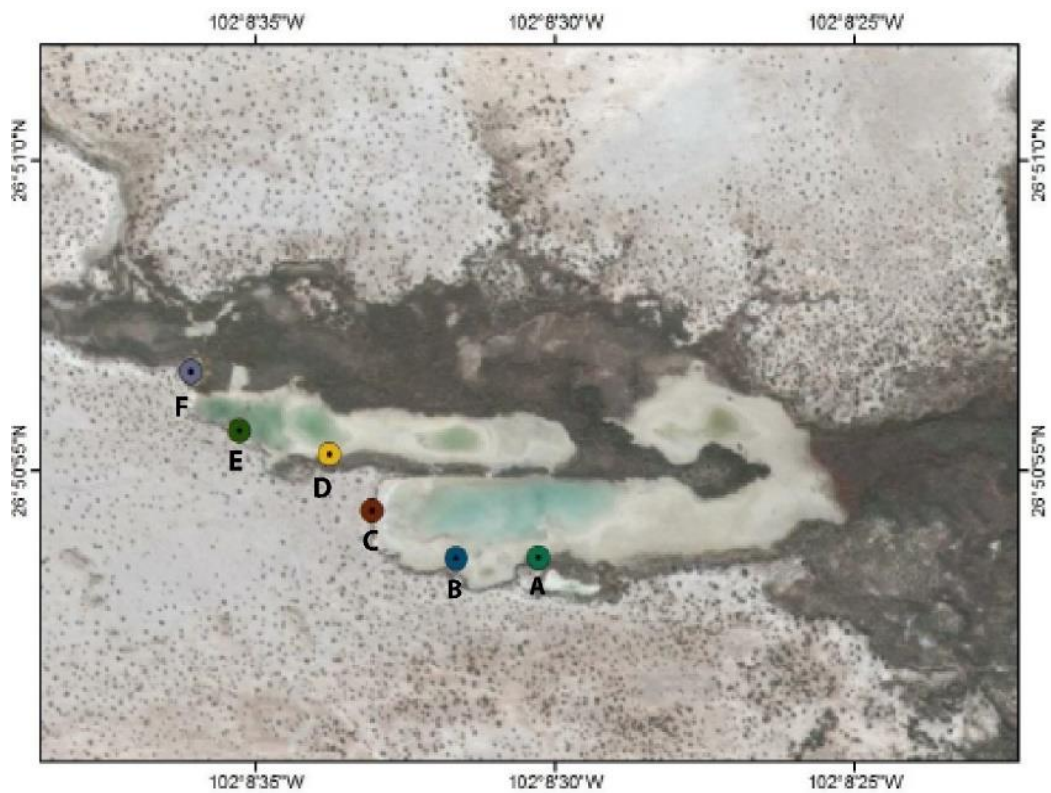


Figura 9. Puntos de Muestreo Ubicados en el mapa de Laguna intermedia sistema hidrológico Churince (LI).

6.3. Aislamiento primario de actinobacterias.

Para la primera etapa de aislamiento de este proyecto (periodo 2014-2015), con la finalidad de obtener la mayor diversidad de géneros de actinobacterias posible, se diseñaron nueve medios de cultivo **AIM1** ([Por litro]: 21 g agar extracto levadura, 10g extracto de malta, 4g dextrosa, 25g sales marinas de Kent (Atkinson 1982); **AIM2** ([Por litro]: 20g manitol, 20g harina de soya, 25g de sales marinas de Kent); **AIM3** ([Por litro]: 10g de quitina, 25g agar bacteriológico, 25g sales marinas de Kent); **AIM4** ([Por litro]: 10g almidón, 1g caseína, 15g agar bacteriológico, 25g sales marinas de Kent); **AIM5** ([Por litro]: 20g avena, 0.001 g Fe₂(SO₄)₃, 0.001 g MgCl₂, 0.001 g ZnSO₄, 18g agar bacteriológico , 25g de sales marinas de Kent); **AIM6** ([Por litro]: 10g almidón, 1g K₂HPO₄; 1g Mg SO₄·7H₂O, 2g (NH₄)₂SO₄, 1g NaCl, 2g CaCO₃, 0.001 g FeSO₄· 7 H₂O, 0.001 g MgCl₂, 0.001 g ZnSO₄, 20g agar bacteriológico, 25g sales marinas de Kent); **AIM7** ([Por litro]: 40g agar tripticaseina de soya, 25g de sales marinas de Kent); **AIM8** ([Por litro]: 10g peptona bacteriológica, 5g extracto levadura, 16g agar bacteriológico, 25g sales marinas de Kent); **AIM9** ([Por litro]: 100 ml ácidos húmicos, 0.02 g CaCO₃, 0.5 g Na₂HPO₄, 0.5 g MgSO₄, 1.7 g KCl, 0.01 g FeSO₄, 0.5 mg Vitamina B12, 18g agar bacteriológico, 25g de sales marinas de Kent) adicionados con 100 µl/ml de ácido nalidíxico para inhibir el crecimiento de bacterias Gram negativas y 50 µl/ml de Nistatina como antifúngico. Los medios fueron inoculados con 200µl de muestra previamente homogenizada y esparcidas sobre la superficie de los medios de cultivo utilizando perlas de vidrio estériles. Se incubaron por hasta 21 días a 27 °C.

Para la segunda etapa de aislamiento correspondiente al periodo (2015-2016) se colectó agua/ sedimento en los puntos de muestreo definidos en la primera etapa del aislamiento y se les realizó pretratamientos a las muestras: fenol al 1.5% , tetraciclina 50 µg/ml, 85 °C por 30 minutos (Jiang, Li et al. 2016), sonicación por 10 minutos (Jiang, Cao et al. 2010), ampicilina 50 µg/ml, 85 °C por 30 minutos + tetraciclina 50 µg/ml, fenol al 1.5% + ampicilina 50 µg/ml, gentamicina 50 µg/ml, kanamicina 50 µg/ml, tetraciclina 50 µg/ml + sonicación por 10 minutos con la finalidad de

realizar el enriquecimiento y dirigir el aislamiento de actinobacterias de géneros “Raros” o poco aislados.

6.4. Aislamiento Secundario de actinobacterias

Para el aislamiento secundario, se seleccionaron las colonias que por las características registradas en la literatura mostraron evidencia de pertenecer a la familia de las actinobacterias, las cuales fueron asiladas y sembradas por estría cruzada para generar cultivos axénicos

6.5. Identificación de las actinobacterias aisladas

6.5.1. Identificación microscópica

Se realizaron preparaciones en fresco y tinciones de Gram a los cultivos axénicos, todos los cultivos que presentaron filamentos, principal característica morfológica de los actinomicetos o aquellos que resultaron Gram positivos fueron criopreservados a temperaturas de -20 en glicerol estéril a una concentración del 50% (Shepherd, Kharel et al. 2010) , adicionalmente se hizo un respaldo a -80°C y -150°C.

6.5.2. Identificación Molecular

Para confirmar la identidad de los aislados a nivel taxonómico de género, se realizó la extracción de ADN genómico, partiendo de cultivos en sólido a punto de esporular, utilizando el método de fenol-cloroformo (Cheng and Jiang 2006) con las siguientes modificaciones: La pastilla celular de cada uno de los aislados fue lavada con sacarosa al 10% en dos ocasiones con la finalidad de crear un shock osmótico y hacer más sensible la pared celular de las actinobacterias a la lisis celular (Nikodinovic, Barrow et al. 2003), posterior al lavado, la pastilla celular se resuspendió en el

siguiente buffer de lisis QTP [Por litro (40ml Triton X-100, 100ml SDS al 20%, 20 ml NaCl 5M, 10 ml Tris 2M pH 8, 7ml EDTA 500Mm pH8, aforado a 1l con agua Mili Q), en un agitador orbital con temperatura para microtubos de 2ml marca (Eppendorf Thermomixer R) en agitación a 65°C por 20 minutos.

La concentración del ADN obtenido fue medida en un espectrofotómetro (nanodrop Thermo Scientific 2000) a una absorbancia de 260nm. Con la finalidad de confirmar la integridad del ADN 3µl de cada muestra se tiñeron Gel Red 1:10,000, para posteriormente ser cargados en un gel de agarosa a una concentración del 1% preparada con un a solución de TBE 1x ([10X litro]:108g tris base 1M, 55g ácido bórico, 7.5g EDTA). Como estándar de referencia se utilizaron 2 µl de marcador de peso molecular 1Kb Bioline, los cuales fueron corridos en una cámara de electroforesis durante 30 minutos a 120v. para posteriormente ser observados en un transiluminador de luz ultravioleta (Fisher Scientific UVP MultiDoc-It™ Imaging System modelo 97019201).

Una vez confirmada la integridad del ADN genómico, se enviaron muestras a Macrogen, Inc., USA para realizar la amplificación y secuenciación bidireccional por tecnología Sanger del gen 16S ARNr , utilizando oligonucleótidos universales para bacterias, 27F (5'-GAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') y 1492R (5'-TACGGYTACCTTGTTACGACTT-3') (Farris and Olson 2007), y oligos específicos para el Phylum Actinobacteria, S-C-Act-235-a-S-20 (5'-CGCGGCCTATCAGCTTGTTG-3') (Stach, Maldonado et al. 2003) y 23SR (5'-AGGCATCCACCGTGCGCCCT-3') (Yoon, Lee et al. 1997). La mayoría de las corridas, se llevaron a cabo dos veces por cada lado. La calidad de los electroferogramas resultantes fue analizada para posteriormente editar las secuencias por rasurado y ensamblados mediante el programa CodonCode Aligner 5.1 (CodonCode Corp., Dedham, MA).

Las secuencias consenso obtenidas se alinearon en la base de datos del centro nacional para la información biotecnológica mediante la herramienta bioinformática de alineamiento de secuencias BLAST (herramienta básica de búsqueda de alineación local) con el fin de identificar a los aislados a nivel de género.

6.6. Análisis filogenético

Para representar la diversidad de las actinobacterias que fueron aisladas de las pozas de Cuatro Ciénegas. Se seleccionaron secuencias representativas de cada uno de los géneros cultivados en conjunto con secuencias de actinobacterias obtenidas de la base de datos del centro nacional de información biotecnológica (NCBI) que presentaron porcentajes de identidad cercanos a las aisladas del valle de Cuatro Ciénegas, con lo que se construyó un cladograma circular con el método Neighbor-joining (NJ) con 1,000 réplicas mediante programa bioinformático MEGA versión 7 (Kumar, Stecher et al. 2016).

Las secuencias del gen 16S ARNr de los microorganismos aislados de la laguna intermedia del sistema hidrológico el Churince (LI) aisladas durante los periodos 2014-2015, 2015-2016, así como los aislados el cepario del laboratorio 9 del Instituto de Biotecnología de la facultad de Ciencias biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León, que después de la identificación molecular mostraron afiliación filogenética con la familia Streptomycetaceae, fueron alineadas por el método de Clustal W (Higgins 1994) con un grupo de 635 secuencias de cepas previamente utilizadas en un análisis filogenético de dicha familia reportado por (Labeda, Dunlap et al. 2017) utilizando el programa de análisis filogenético evolutivo molecular MEGA versión 7 (Kumar, Stecher et al. 2016). Después de su alineación y rasurado se calculó el modelo evolutivo por medio del programa TOPALi v2.5 (Milne, Lindner et al. 2009). Como un árbol filogenético preliminar que nos permitiera identificar las actinobacterias que presentaran una mayor afiliación filogenética con las aisladas de las pozas de Cuatro Ciénegas, se construyó un árbol filogenético de la familia Streptomycetaceae con 1,000 réplicas.

Las secuencias de las actinobacterias que mostraron mayor afiliación filogenética con las aisladas de (IL) fueron seleccionadas para realizar un segundo y tercer árbol filogenético por los métodos Neighbor-joining (NJ) y Maximum-likelihood (ML) Tamura Nei I + G con el programa Mega Versión 7(Kumar, Stecher et al. 2016) con 1,000 réplicas.

Finalmente, con el objetivo de generar un análisis filogenético más robusto y de mayor confiabilidad que diera un mayor soporte se construyó un cuarto árbol filogenético con un grupo de 136 secuencias (73 de referencia y 41 cepas aisladas de IL) recortadas a un tamaño de 1,074pb por el método Bayesiano, utilizando el programa MrBayes v3.2.5 (Ronquist, Teslenko et al. 2012) con 10,000,000 generaciones Markov Chain Monte Carlo (MCMC), utilizando el modelo evolutivo GTR CG obtenido a partir del programa Topali v2 (Milne, Lindner et al. 2009) con las siguientes especificaciones: nucomodel D 4 por 4 n corridas D 2, ncadenas D 4 con una frecuencia de muestras D 100. considerando un buen soporte nodal arriba del 95%.

6.7. Ensayos antagonismo de doble capa

Se realizaron ensayos de antagonismo mediante ensayos de doble capa en cajas de Petri tamaño 150 x 15 mm (Luo, Wang et al. 2013) modificado, las modificaciones consistieron en los tiempos de incubación de las actinobacterias, en nuestro caso se esperó un tiempo de 5-7 días a una temperatura de 27°C hasta que mostraron esporulación, se emplearon puntas amarillas de micropipeta de un volumen de 20-200µl, para generar el bocado usando la parte posterior. Para lo cual se utilizaron cuatro medios de cultivo diseñados en nuestro laboratorio para inducir la producción de metabolitos secundarios con actividad antimicrobiana: **M1** ([Por litro]: 0.5 g L-asparagina, 0.5 g K₂HPO₄, 0.2 g MgSO₄.7H₂O, 0.01 g FeSO₄.7H₂O, Manitol 0.5%, Glicerol 1%, 15 g Agar bacteriológico); **M2** ([Por litro]: 0.5 g L-asparagina, 0.5 g K₂HPO₄, 0.2 g MgSO₄.7H₂O, 0.01 g FeSO₄.7H₂O, Manitol 0.5%, Glicerol 1%, 25 g Sales marinas de Kent, 15 g Agar bacteriológico); **M3** ([Por litro]: Peptona 0.8%,

Almidón 1%, 15 g Agar bacteriológico); **M4** ([Por litro]: Peptona 0.8%, Almidón 1%, 25 g de sales marinas de Kent, 15 g agar bacteriológico). los cuales fueron inoculados con las actinobacterias aisladas previamente sembradas en medio **AIM6**, utilizando sacabocados, los cuales se posicionaron de manera radial en los cuatro medios de cultivo anteriormente mencionados, para ser incubados durante 7 días a 27 °C, una vez transcurrido el tiempo de incubación se generó una doble capa con agar Mueller-Hinton previamente inoculado con *Escherichia coli* O157:H7, *Staphylococcus aureus* y *Candida albicans* NIH 3172 (ATCC® 14053™), al 1% al 0.5 en escala de McFarland, utilizando como control positivo estreptomocina a una concentración de 100 µg/ml y Nistatina 50 µg/ml, según fuese el caso, después de haber sido incubados 24h a 37 °C, el radio de los halos resultantes fueron medidos comparados entre los cuatro medios de cultivo utilizados y registrados.

6.8. Producción metabolitos secundarios

Las actinobacterias que produjeron halos de inhibición más grandes en comparación al control positivo y en un mayor número de patógenos, fueron seleccionadas y crecidas en medio **ISP4** modificado e incubadas a 27 °C fueron monitoreadas de 5-7 días hasta que presentaran esporulación.

Con un sacabocados estéril, se obtuvo un volumen cilíndrico del crecimiento en agar de cada una de las actinobacterias ya esporuladas, fueron inoculadas en 150 ml de medio de cultivo utilizando para cada actinobacteria el medio de cultivo que resulto inducir la producción de metabolitos secundarios con mayor actividad. **M1**([Por litro]: 0.5 g L-asparagina, 0.5 g K₂HPO₄, 0.2 g MgSO₄.7H₂O, 0.01 g FeSO₄.7H₂O, Manitol 0.5%, Glicerol 1%); **M2** ([Por litro]: 0.5 g L-asparagina, 0.5 g K₂HPO₄, 0.2 g MgSO₄.7H₂O, 0.01 g FeSO₄.7H₂O, Manitol 0.5%, Glicerol 1%, 25 g Sales marinas; **M3** ([Por litro]: Peptona 0.8%, Almidón 1%); **M4** ([Por litro]: Peptona 0.8%, Almidón 1%, 25 g de sales marinas), se incubaron durante 10 días a una temperatura de 27°C con una agitación de 135 rmp. Después de transcurrido el tiempo de incubación los medios de cultivo fueron centrifugados a 2800 rpm por 25

minutos, el sobrenadante fue decantado y mezclado en proporción 1/1 con acetato de etilo, se mantuvo en agitación por 24 horas a 20°C y 150 rpm en una incubadora Thermo Scientific Max Q 8001, se recuperó la fase orgánica utilizando un embudo de separación y se eliminaron los restos acuosos en la muestra utilizando sales de sulfato de sodio.

La fase orgánica previamente filtrada fue concentrada utilizando un rota evaporador Yamato mod. RE801 con un baño de agua a condiciones de 20 rpm, 225 hPa de presión y 42°C., una vez concentrado se colocó en cámara de gases a temperatura ambiente durante 15 días para eliminar los restos del solvente por completo.

6.9. Ensayo de viabilidad celular de los extractos crudos

Los extractos crudos que se obtuvieron a partir de los aislados que produjeron metabolitos secundarios con actividad antimicrobiana se probaron en el siguiente panel de células de cáncer: adenocarcinoma mamario MCF-7 (ATCC® HTB-22™), adenocarcinoma de colon Caco-2 (ATCC® HTB-37™), carcinoma en pulmón NCI-H460 (ATCC® HTB-177™), melanoma maligno SK-MEL-28 (ATCC® HTB-72™), adenocarcinoma en ovario OVCAR-3 (ATCC® HTB-161™), leucemia mielógena crónica K-562 (ATCC® CCL-243™), y células normales de Fibroblastos de piel Detroit 548 (ATCC® CCL-116) como control.

Las células de mama, colon, pulmón, melanoma, sangre y fibroblastos se cultivaron en el medio de cultivo DMEM (medio mínimo esencial de Eagle modificado con Dulbecco) adicionado con 10% de suero fetal bovino; las células de ovario con medio RPMI (medio del instituto Roswell Park Memorial) adicionado con 10% de suero fetal bovino.

La citotoxicidad de los extractos se determinó mediante el ensayo de MTT (Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio) cuyo fundamento se basa en la reducción del compuesto del MTT por las deshidrogenasas mitocondriales de las células viables a cristales de formazán. La cantidad de los cristales es directamente

proporcional al número de células vivas. (Ehrich and Sharova 2001). Para los ensayos se prepararon diluciones de los extractos crudos pesando 10 mg y se disolvieron en 100 µl de dimetilsulfóxido (DMSO), obteniendo una concentración inicial de 1000 µg/ml. Esta solución se tomó como concentración inicial para generar las siguientes: 20, 200, y 400 µg/ml utilizando Buffer de fosfatos (PBS).

Para medir la viabilidad mediante el ensayo de MTT (van Meerloo, Kaspers et al. 2011) estandarizado a las condiciones del laboratorio; se crecieron las células en medio de cultivo DMEM con 10% de suero fetal bovino a una temperatura de 37 °C con 5% de CO₂, hasta que alcanzaron un mínimo de 80% de confluencia. Para deshacer la monocapa formada, se retiró el medio y se lavó la monocapa con 2 ml de PBS, para posteriormente agregarle 1ml de tripsina 1x marca cellgrowth. Se incubó (SANYO MCO-19AIC CO₂) por no más de 15 minutos a una temperatura de 37 °C con 5% de CO₂, se le agregaron 2ml de cultivo DMEM para inhibir la función enzimática de la tripsina, se colectó el medio con las células y se centrifugó a 900 rpm por 6 minutos a 22°C en un tubo cónico estéril de 15 ml en una centrífuga Eppendorf modelo 5010R. Se retiró el medio de cultivo y la pastilla celular se resuspendió en 1ml de medio DMEM. Para confirmar el buen estado de las células, se verificó su viabilidad realizándoles tinción con azul tripano, mediante un conteo celular que se realizó utilizando cámara de Neubauer y un microscopio invertido Olympus modelo IX71. El porcentaje de viabilidad se calculó con la siguiente fórmula:

$$\text{Porcentaje de viabilidad} = \frac{\text{Número de células vivas (blancas)}}{\text{Número de células totales}} \times 100$$

Una vez confirmada que la viabilidad fue mayor al 90%, se calculó el número de células por mililitro por la siguiente fórmula:

$$\text{Número de células}/\mu\text{l} = \left(\frac{\text{Número de células vivas (blancas)}}{4} \right) \times 2 \times 10,000/1,000$$

Los ensayos se realizaron por triplicado en placas estériles de 96 pozos. El número de células en cada pozo dependió de la línea celular utilizada. Para cáncer de Mama HTB-22: 4,000 células por pozo, colon HTB-37: 2,000 células, Pulmón HTB-177: 5,000, Melanoma HTB-72: 3,500, Ovario HTB-161: 30,000, K-562: medula ósea 20,000 y Fibroblastos 4,000 células respectivamente a una concentración de 20, 200, 400 $\mu\text{g/ml}$.

Siguiendo el criterio establecido por el Instituto Nacional del cáncer de Estados Unidos (NCI) que considera un extracto crudo activo a concentraciones igual o menores a 20 $\mu\text{g/ml}$ (Skehan, Storeng et al. 1990, Bolk 2003) , fueron seleccionados aquellos extractos que se encontraron en esos rangos, para ser fraccionados por cromatografía flash en un sistema CombiFlash Rf + Lumen (Teledyne Technologies, Inc., Lincoln, NE, EE. UU.) Usando columnas RediSep Rf Gold Si-gel (Teledyne Technologies, Inc.) con cloroformo grado analítico, n-hexano, metanol, acetato de etilo, acetonitrilo de calidad HPLC y agua, los cuales fueron adquiridos en J.T. Baker (Avantor Performance Materials, Center Valley, PA, EE. UU.), realizado en el departamento de farmacia de la facultad de ciencias químicas de la Universidad Autónoma de México. Las fracciones obtenidas fueron nuevamente probadas contra las células de cáncer de Mama HTB-22, Pulmón-HTB-177, Ovario, Colon, Melanoma, Sangre y Fibroblastos en concentraciones de 0.1, 0.5, 1.25 y 2.5 $\mu\text{g/ml}$. Como control positivo se utilizó el fármaco doxorubicina en concentraciones de .5, 1, 2, y 5 $\mu\text{g/ml}$. (Zytokil, PISA, México)

6.10. Determinación de la concentración media inhibitoria (IC_{50})

La determinación y estimación de la IC_{50} de las fracciones se realizó con los resultados obtenidos de la lectura de la absorbancia a una longitud de onda de 570nm con un espectrofotómetro Biotek Synergy 2, de los ensayos de MTT por triplicado utilizando diferentes concentraciones (0.065, 0.03, 0.01, 0.007 y 0.003 $\mu\text{g/ml}$) ,

mediante una regresión lineal de cuatro parámetros con el programa GraphPad Prism 7 (Sebaugh 2011).

Los valores de IC₅₀ obtenidos de las fracciones probadas en las diferentes células por el ensayo de MTT fueron analizadas mediante un ANOVA de una sola vía seguido por la prueba de Tukey, con un porcentaje de confiabilidad del 95%, con el programa GraphPad Prism 7 (Rubert Nogueira-Librelo, Mitjans et al. 2011, Sebaugh 2011), se comparó el efecto de las fracciones en cada línea celular.

6.11. Identificación compuestos bioactivos

Las fracciones que resultaron con la IC₅₀ menores a 20 µg/ml, fueron seleccionadas para su identificación, sub-fraccionado las muestras mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) marca Waters con una bomba cuaternaria modelo 2535, inyector automático 2707, con detector de matriz de fotodiodos (PDA) 2998 y un detector evaporativo de dispersión de luz (ELSD) 2424. Para posteriormente ser procesados por una cromatografía de líquidos de ultra rendimiento, acoplado a un espectrómetro de masas en tándem de alta resolución con matriz de fotodiodos (UPLC-PDA-HRMS-MS/MS) Waters modelo ACQUITY UPLC. Siguiendo el protocolo establecido por (A. Aparicio-Cuevas, Rivero-Cruz et al. 2017)

7. RESULTADOS

7.1. Aislamiento selectivo de Actinobacterias

Como resultado del aislamiento selectivo de actinobacterias en las pozas del valle de Cuatro Ciénegas, se obtuvieron 268 aislados (Tabla 8, Figura 10, Anexo 1), el 55% de los aislados fueron de la Laguna intermedia del sistema Churince. El total de las actinobacterias después de realizar comprobación de que se tenían cultivos puros, fueron criopreservadas por triplicado en glicerol a una concentración de 50% a temperaturas de -20, -80 y -150°C.

Tabla 8. Numero de aislados totales por poza en los dos periodos de aislamiento.

LUGAR DE AISLAMIENTO	NUMERO DE AISLADOS
Laguna Intermedia Churince	146
Pozas Rojas	22
Poza el Mojarral	31
Poza el Anteojo	21
Pozas Azules	25
Arqueano	11
Poza la Becerra	12

Nota. El número de aislados en la Laguna intermedia es mayor al compararlo con el resto de las pozas debido a que este lugar fue el que mayor número de puntos de muestreo cuenta (6) y se colectaron muestras durante todo el periodo de aislamiento. El resto de las pozas solo se colectaron muestras en dos ocasiones.

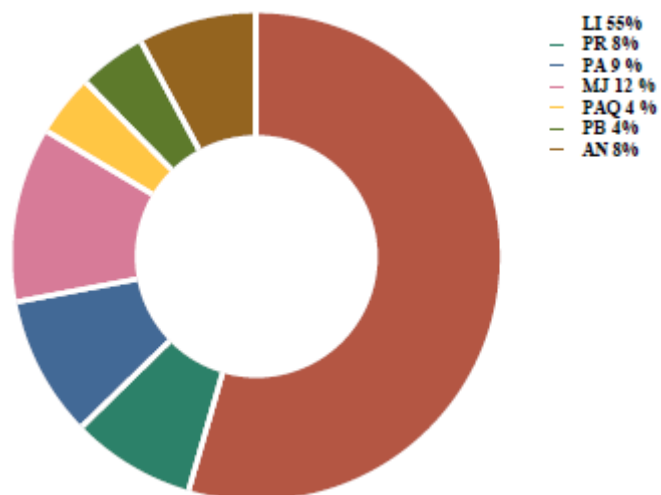


Figura 10. Porcentaje total de aislamiento de actinobacterias por poza en los dos periodos de aislamiento

7.2. Aislamiento de actinobacterias por medio de cultivo

En la primera etapa del aislamiento primario (periodo 2014-2015) con la finalidad de obtener la mayor diversidad de actinobacterias posible, se varió la fuente de carbono generando nueve medios de cultivo, en los cuales se obtuvo una diferencia notable en cuanto al porcentaje de actinobacterias aisladas (Fig. 11), siendo el medio AIM2 cuya fuente de carbono es la harina de soya en donde se obtuvo un mayor porcentaje de aislados (33%), seguido del medio AIM3 en un 25 % el cual su componente principal es quitina coloidal. Se puede observar claramente que el medio AIM9 compuesto por ácidos húmicos y vitaminas, es este uno de los medios diseñados con menor fuente de carbono en donde se obtuvo el menor número de aislados.

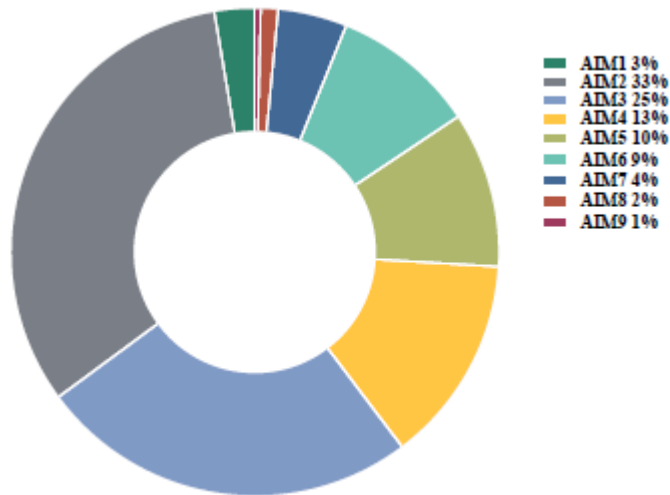


Figura 11. Aislamiento total de actinobacterias por medio de cultivo en los dos periodos de aislamiento

En las gráficas (Figuras 12-18) se puede observar el porcentaje de aislados por medio de cultivo utilizado en cada una de las pozas donde se realizó el muestreo, se puede ver claramente que la laguna intermedia es en donde hubo crecimiento en ocho de los nueve medios de cultivo utilizados. Resultando el medio AIM2 en la mayoría de las pozas el que presento mayor porcentaje de aislados, sin embargo, al comparar los porcentajes de aislamiento entre las pozas muestreadas, existe variación en el porcentaje de aislamiento y los medios de cultivo, lo que nos sugiere un crecimiento preferencial en diferentes fuentes de carbono dada por las condiciones que tiene cada una de las pozas.

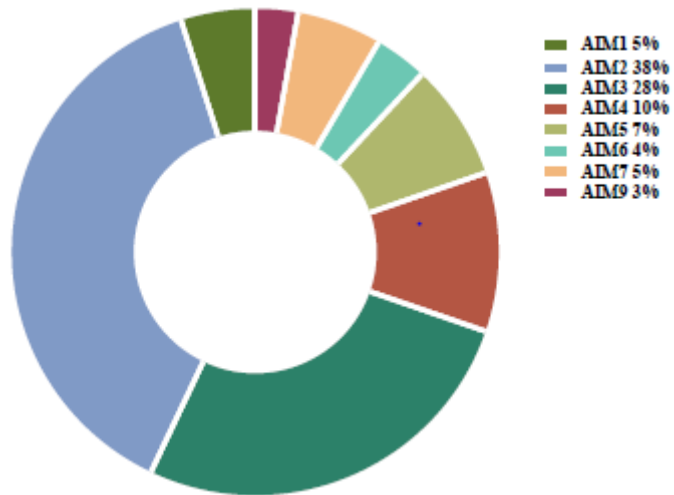


Figura 12. Porcentajes de actinobacterias aisladas en la laguna intermedia del sistema hidrológico el Churince (LI) por medio de cultivo utilizados

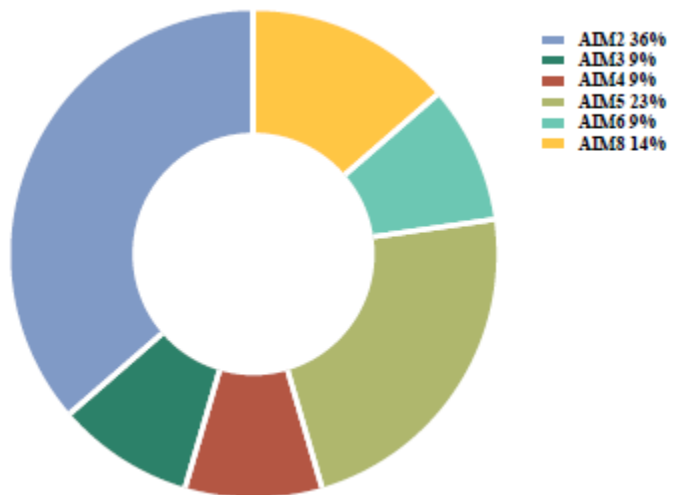


Figura 13. Porcentajes de actinobacterias aisladas de Pozas Rojas por medio de cultivo utilizados.

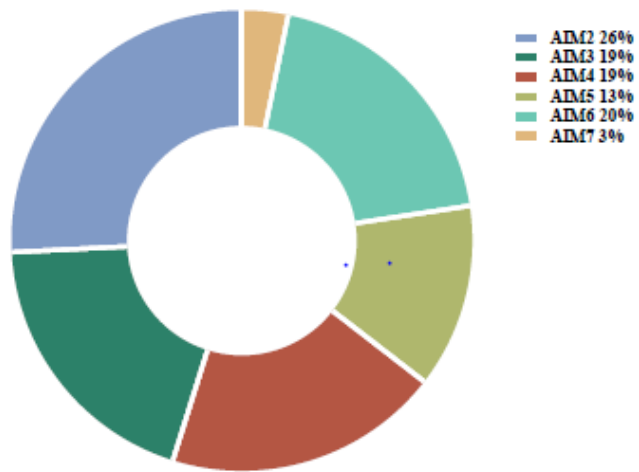


Figura 14. Porcentajes de actinobacterias aisladas de la poza el Mojarral por medio de cultivo utilizados.

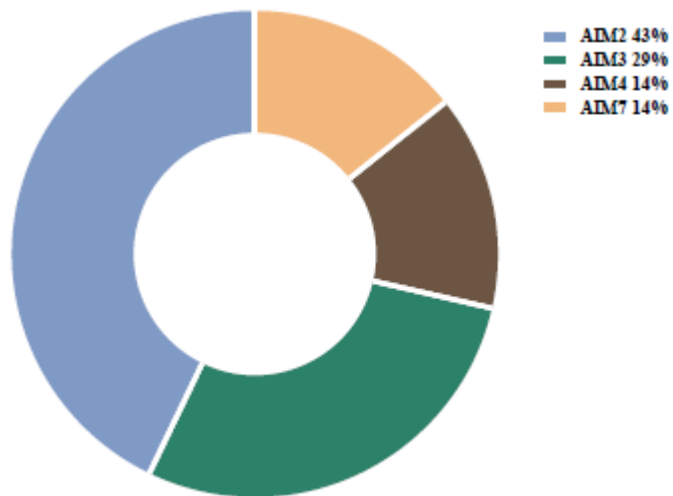


Figura 15. Porcentajes de actinobacterias aisladas de poza el Anteojo por medio de cultivo utilizados.

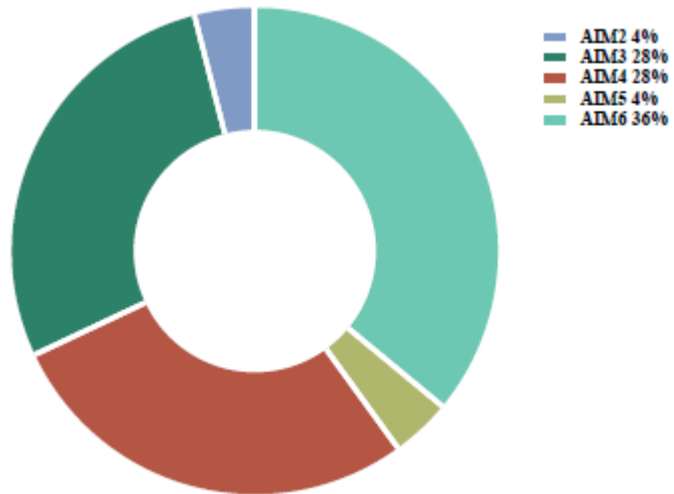


Figura 16. Porcentajes de actinobacterias aisladas de Pozas Azules por medio de cultivo utilizados.



Figura 17. Porcentajes de actinobacterias aisladas del Arqueano por medio de cultivo utilizados.

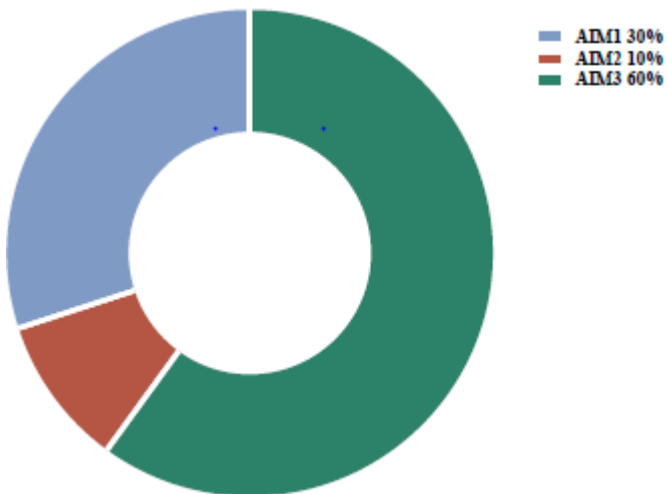


Figura 18. Porcentajes de actinobacterias aisladas de Poza Becerra por medio de cultivo utilizados.

7.3. Aislamiento por punto de muestreo en la laguna intermedia sistema hidrológico Churince

Para la laguna intermedia del sistema hidrológico Churince se utilizaron seis puntos de muestreo (Tabla 7). Podemos observar en la Fig. 19 que los puntos A y C son en los que se obtuvo un mayor número de aislamientos, siendo el punto F el que presenta un porcentaje considerablemente menor.

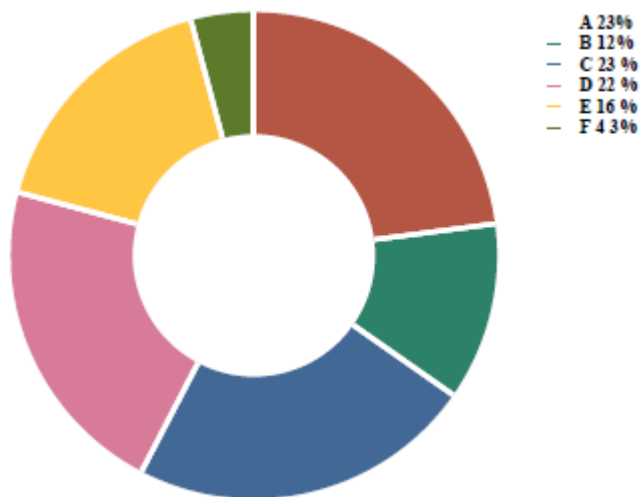


Figura 19. Porcentajes de actinobacterias aisladas por punto de muestreo en la laguna intermedia del sistema hidrológico el Churince (LI).

Para la segunda etapa de aislamiento (2015-2016) se le realizo a las muestras diez pretratamientos físicos y químicos con la finalidad de enriquecer el aislamiento de géneros de actinobacterias “raros”. En la figura 20 podemos observar que el pretratamiento en el cual se presentó un mayor porcentaje de crecimiento fue el H (Sonicación 10 minutos), siendo los pretratamientos E y J los que inhibieron en una mayor proporción el crecimiento. Cifras que se pueden observar a más detalle en la tabla 9 y 10.

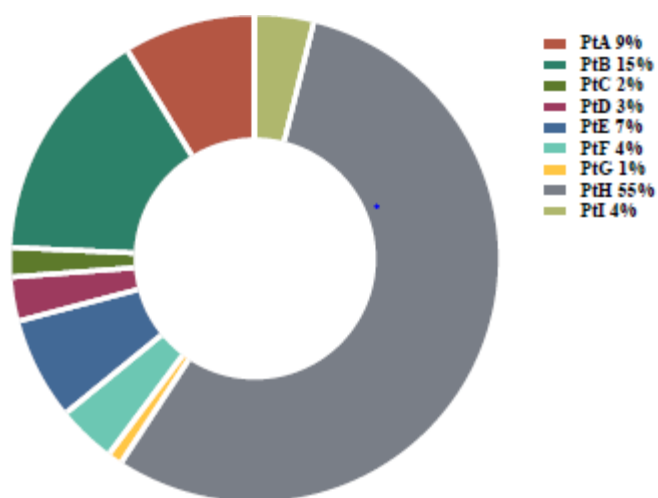


Figura 20. Porcentajes de actinobacterias aisladas utilizando pretratamientos (Pt): A) Fenol 1.5%, B) tetraciclina 50 µg/ml, C) 85 °C por 30 minutos, D) gentamicina 50 µg/ml E) ampicilina 50 µg/ml, F) 85°C por 30 minutos + tetraciclina 50 µg/ml, G) fenol al 1.5% + ampicilina 50 µg/ml, H) sonicación por 10 minutos, I) kanamicina 50 µg/ml, J) tetraciclina 50 µg/ml + sonicación por 10 minutos durante el periodo 2015-2016.

Tabla 9. Número de actinobacterias aisladas por pretratamientos por poza. A) Fenol 1.5%, B) tetraciclina 50 µg/ml, C) 85 °C por 30 minutos, D) sonicación por 10 minutos, E) ampicilina 50 µg/ml, F) 85°C por 30 minutos + tetraciclina 50 µg/ml, G) fenol al 1.5% + ampicilina 50µg/ml, H) gentamicina 50 µg/ml I) Kanamicina 50 µg/ml, J) tetraciclina 50 µg/ml + sonicación por 10 minutos.

NOMBRE DE LA POZA	PRETRATAMIENTOS									
	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J
Laguna intermedia Churince	3	13	2	0	0	0	0	48	0	0
Pozas Rojas	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
Poza El Mojarral	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
Pozas Azules	5	2	0	1	4	3	1	6	3	0
El Arqueano	1	1	0	2	3	1	0	1	1	0

Tabla 10. Resultados del aislamiento de actinobacterias con el uso de pretratamientos por poza y por medio de cultivo utilizados.

POZA	PRETRATAMIENTO	AISLADO	MEDIO DE CULTIVO
LI	C	641	AIM9
LI	A	685	AIM2
LI	A	695	AIM3
LI	B	604	AIM5
LI	B	608	AIM5
LI	B	610	AIM3
LI	B	614	AIM3
LI	B	618	AIM3
LI	B	620	AIM3
LI	B	626	AIM3
LI	B	647	AIM5
LI	B	656	AIM5
LI	B	658	AIM5
LI	B	659	AIM3
LI	B	673	AIM3
LI	B	676	AIM5
LI	C	655	AIM6
LI	C	696	AIM9
LI	H	602	AIM6
LI	H	603	AIM6
LI	H	605	AIM2
LI	H	606	AIM5
LI	H	607	AIM3

POZA	PRETRATAMIENTO	 AISLADO	MEDIO DE CULTIVO
LI	H	612	AIM3
LI	H	613	AIM3
LI	H	615	AIM5
LI	H	617	AIM3
LI	H	619	AIM3
LI	H	621	AIM3
LI	H	622	AIM2
LI	H	624	AIM3
LI	H	627	AIM2
LI	H	628	AIM3
LI	H	630	AIM3
LI	H	634	AIM2
LI	H	636	AIM3
LI	H	645	AIM2
LI	H	646	AIM2
LI	H	648	AIM3
LI	H	649	AIM3
LI	H	653	AIM3
LI	H	654	AIM3
LI	H	657	AIM5
LI	H	660	AIM2
LI	H	661	AIM2
LI	H	662	AIM2
LI	H	663	AIM2
LI	H	664	AIM2
LI	H	665	AIM3
LI	H	666	AIM2
LI	H	667	AIM6
LI	H	669	AIM6
LI	H	671	AIM3
LI	H	672	AIM5
LI	H	677	AIM9
LI	H	678	AIM5
LI	H	688	AIM2
LI	H	689	AIM6
LI	H	691	AIM5
LI	H	698	AIM3
LI	H	699	AIM6

POZA	PRETRATAMIENTO	 AISLADO	MEDIO DE CULTIVO
LI	H	700	AIM3
LI	H	701	AIM9
LI	H	702	AIM5
LI	H	704	AIM6
LI	H	690	AIM6
PR	H	660	AIM2
MJ	H	707	AIM3
PA	A	631	AIM6
PA	A	632	AIM4
PA	A	638	AIM4
PA	A	651	AIM4
PA	A	705	AIM2
PA	B	674	AIM6
PA	B	679	AIM6
PA	D	684	AIM3
PA	E	640	AIM4
PA	E	650	AIM4
PA	E	680	AIM3
PA	E	694	AIM4
PA	F	670	AIM6
PA	F	703	AIM6
PA	F	706	AIM6
PA	G	633	AIM4
PA	H	609	AIM3
PA	H	611	AIM3
PA	H	616	AIM3
PA	H	635	AIM3
PA	H	675	AIM3
PA	H	683	AIM6
PA	I	637	AIM4
PA	I	668	AIM6
PA	I	697	AIM6
PAQ	A	623	AIM2
PAQ	B	687	AIM3
PAQ	D	625	AIM3
PAQ	D	629	AIM3
PAQ	E	639	AIM4
PAQ	E	652	AIM3

POZA	PRETRATAMIENTO	AISLADO	MEDIO DE CULTIVO
PAQ	E	682	AIM3
PAQ	F	681	AIM6
PAQ	H	693	AIM6
PAQ	I	629	AIM6

7.4. Identificación molecular de los aislados

Noventa y cinco aislados fueron secuenciados exitosamente de forma bidireccional utilizando los oligonucleótidos universales para bacterias (27F y 1492 R) y los específicos para el Phylum Actinobacteria (S-C-Act-235-a-S-20 y 23SR). Lográndose identificar diez géneros diferentes, con porcentajes de identidad que rondan del 98-100%, los cuales en su mayoría tienen afiliación a actinobacterias de origen marino. (Anexo 2).

El 78% de las actinobacterias secuenciadas fueron aisladas de la laguna intermedia del sistema hidrológico Churince, siendo Poza azul y el Arqueano de las cuales se secuenció el menor porcentaje de actinobacterias (Figura 21).

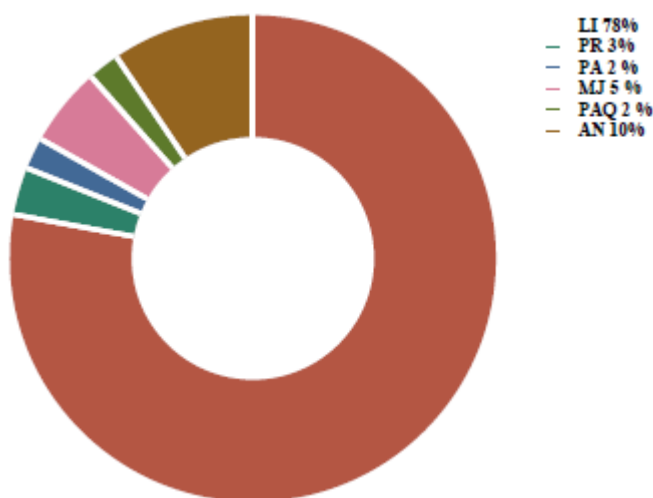


Figura 21. Porcentaje de las actinobacterias aisladas que fueron secuenciadas por poza en los dos periodos de aislamiento.

En cuanto a la diversidad de actinobacterias aisladas que fueron secuenciadas por poza, se obtuvieron 10 géneros diferentes que corresponden a *Streptomyces*, *Nocardiopsis*, *Blastococcus*, *Microbacterium*, *Micrococcus*, *Glycomyces*, *Verrucosisspora*, *Arthrobacter*, *Kocuria*, *Modestobacter*. En figura 22 y las tabla 11 se puede observar claramente que el género *Streptomyces* fue el más abundante y el único que se aisló en todas las pozas.

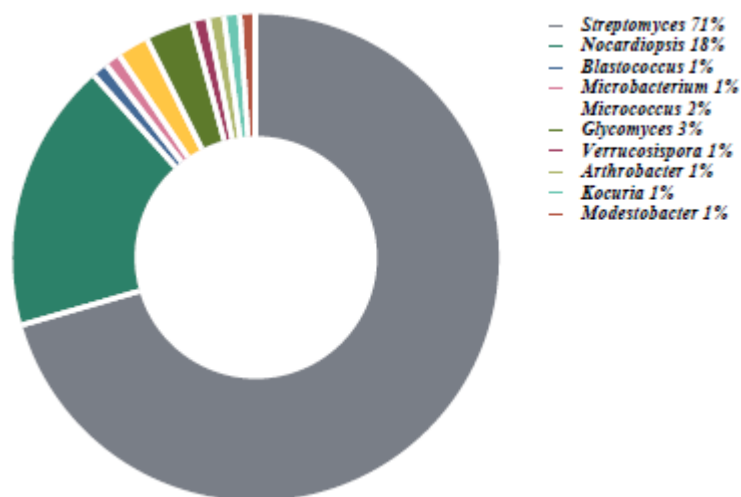


Figura 22. Porcentajes del total de géneros aislados en las pozas.

Tabla 11. Numero de actinobacterias aisladas por género en cada una de las pozas.

	LI	AN	MJ	PAQ	PR	PA
<i>Streptomyces</i>	52	6	3	2	2	2
<i>Glycomyces</i>	1	1	1	-	-	-
<i>Nocardiopsis</i>	14	2	-	-	2	-
<i>Modestobacter</i>	-	-	1	-	-	-
<i>Arthrobacter</i>	1	-	-	-	-	-
<i>Kocuria</i>	1	-	-	-	-	-
<i>Microbacterium</i>	1	-	-	-	-	-
<i>Micrococcus</i>	1	-	-	-	-	-
<i>Blastococcus</i>	1	-	-	-	-	-
<i>Verrucosisspora</i>	1	-	-	-	-	-

Particularmente para la LI se analizó la diversidad global de las cepas, el género *Streptomyces* fue el más abundante (73%), fue el único género que se aisló de los 6 puntos de muestreo y se cultivó en 7 de los nueve medios de cultivo (Figura 23).

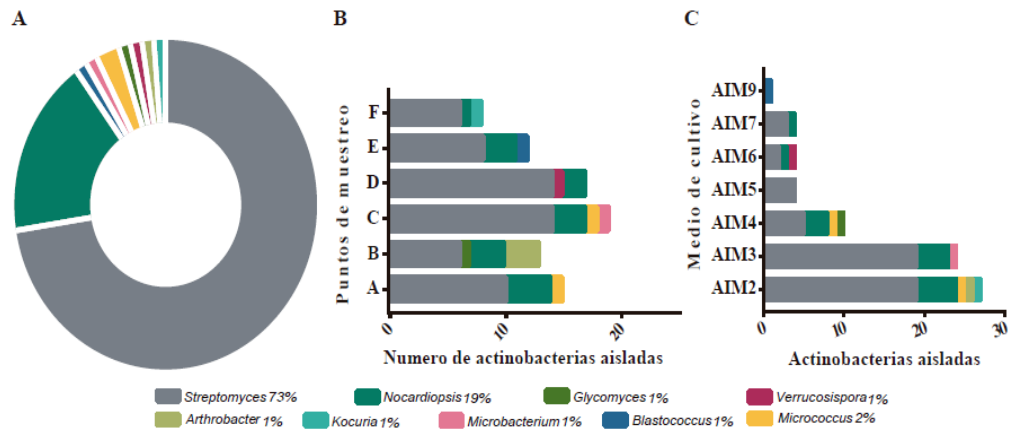


Figura 23. A) Diversidad de los géneros aislados en la LI, B) Grafica de barras que presenta la diversidad aislada por punto de muestreo. C) Grafica que muestra la diversidad aislada por medio de cultivo.

7.5. Análisis filogenético del total de las actinobacterias aisladas.

Con la finalidad de presentar la diversidad total de las actinobacterias aisladas se realizó una cladograma circular por el método de Neighbor-joining (NJ) con secuencias representativas de cada género aislado aunadas a las secuencias con las que presentaron mayor afinidad filogenética en la base de datos del NCBI (Figura 24)

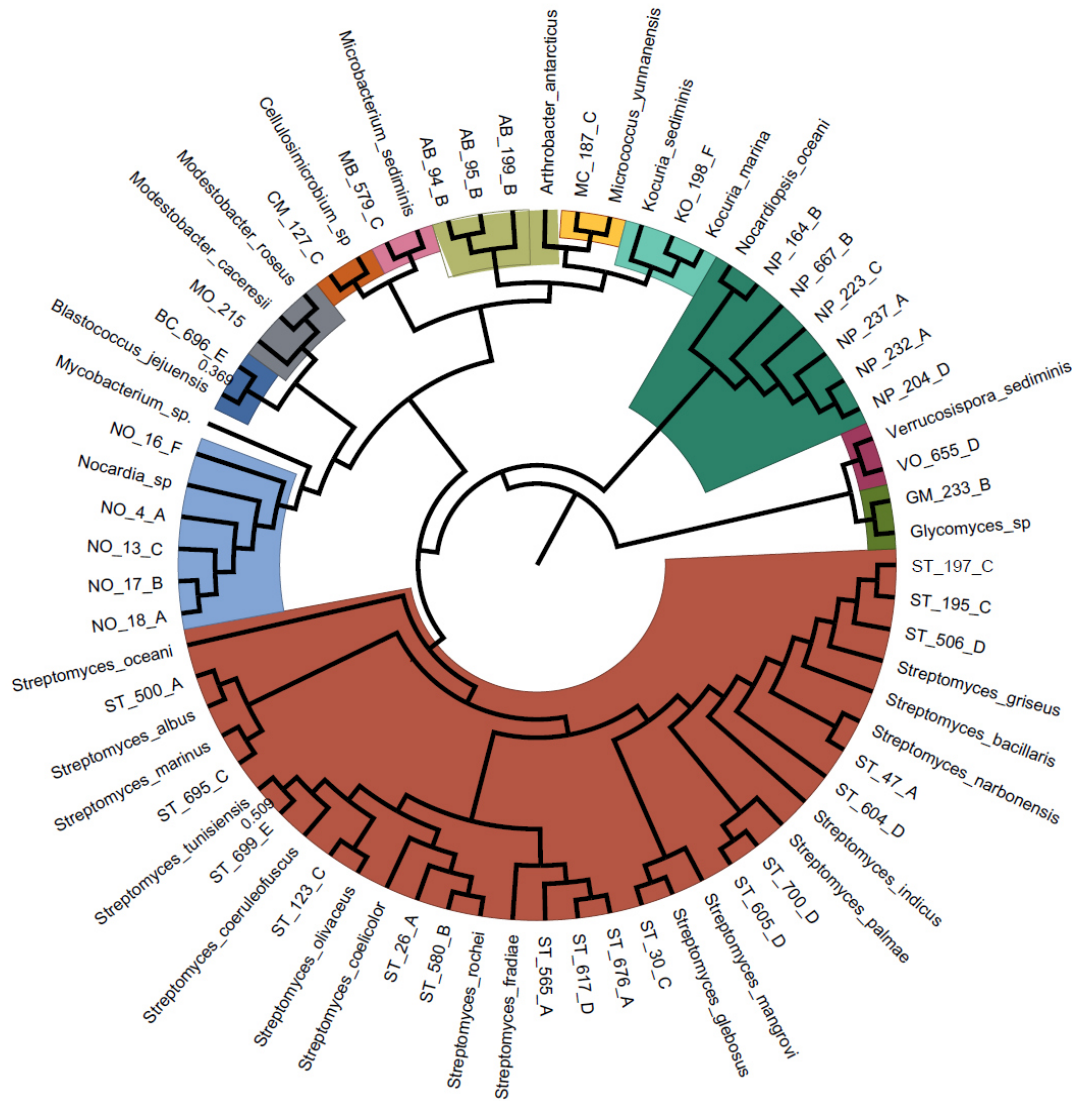
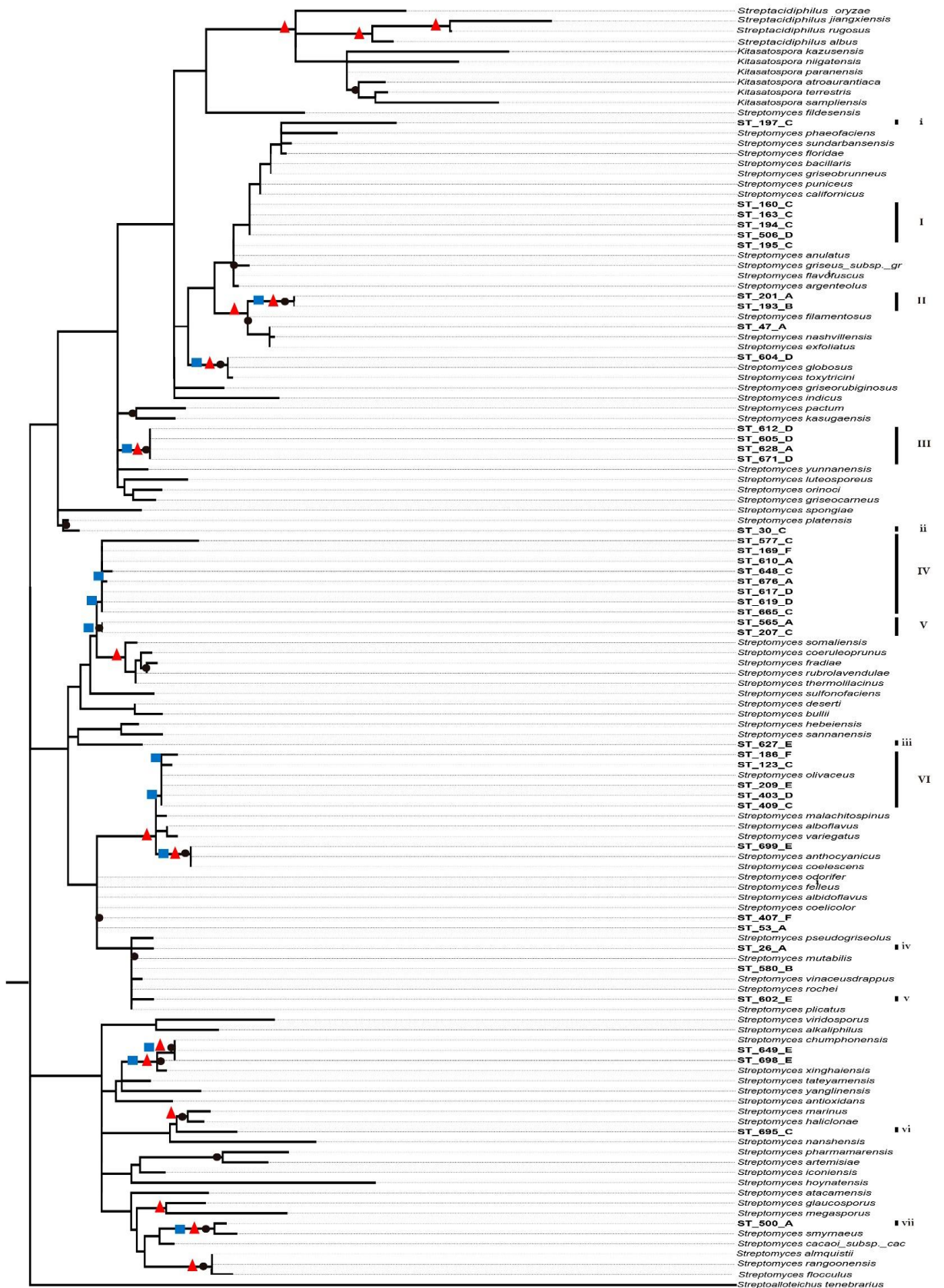


Figura 24. Cladograma circular por el método de Neighbor-joining (NJ), representando la diversidad de los géneros aislados de las pozas de Cuatro Ciénegas.

7.6. Análisis filogenético de los géneros de *Streptomyces* aislados de la laguna intermedia del sistema hidrológico el Churince

Debido a que el género *Streptomyces* fue el más abundante en la laguna intermedia del sistema hidrológico el Churince, se utilizaron las actinobacterias aisladas pertenecientes a este género que se obtuvieron en muestreos durante el periodo 2012-2013 y 2014-2016 para realizar un árbol filogenético de la familia Streptomycetaceae, utilizando el gen del 16S ARNr con el método de Neighbor-joining (NJ), con un set de datos de 635 secuencias, el cual podemos observar en los archivos suplementarios de (Arocha-Garza, Canales-Del Castillo et al. 2017) con la finalidad de confirmar la relación filogenética. Posteriormente se seleccionaron las especies de *Streptomyces* más cercanas a los aislados de Cuatro Ciénegas y se realizó un segundo árbol filogenético con el método maximum likelihood (ML) con 1,000 réplicas, y un tercero con el método Bayesiano con 10,000 generaciones. Finalmente se comparó y se dio más confiabilidad a los clados (Figura 25), observando claramente como las secuencias de *Streptomyces* aisladas de LI, forman seis clados monofiléticos y siete clados con un solo miembro.



0.013

Figura 25. Árbol filogenético del género *Streptomyces* basado en el gen 16S ARNr (1,074pb) de las secuencias aisladas de LI además de las especies más cercanas. Los valores de los soportes del árbol para maximum likelihood (ML) en el rango de 0.7-1 fueron marcados con círculos negros. El soporte de los nodos para el análisis Bayesiano en los rangos de 0.95-1 fueron marcados con triángulos rojos y para Neighbor-joining (NJ) en rangos de 0.6-1 en cuadrados azules.

Las Streptomyces que conformaron los clados únicos de IL fueron comparadas morfológicamente para confirmar que se tratan de especies diferentes, lo que podemos observar en la figura 26.

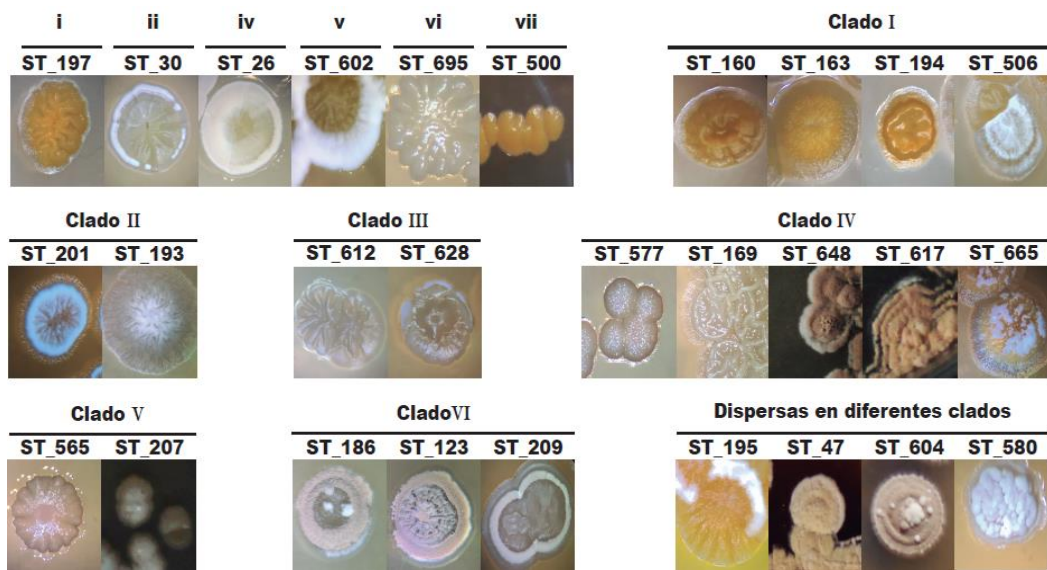


Figura 26. Diversidad morfológica de los aislados que se agrupan dentro de los clados únicos y clados monofiléticos en la Filogenia de *Streptomyces* (Figura 25).

7.7. Ensayos de antagonismo

Ciento treinta y seis actinomicetos fueron probados en ensayo de doble capa contra *E. coli* o157H:7, *C. albicans*, *S. aureus*, cuyos resultados de medición en centímetros de radio, se pueden observar en la Tabla anexo 3. De estos aislados, aproximadamente el 50% de las actinobacterias presentaron actividad inhibitoria para uno o más de los patógenos. En el diagrama de Venn de la figura 27 se presenta de forma resumida el número de actinobacterias con actividad antagónica en uno o más patógenos. Un ejemplo de los resultados del ensayo de doble capa en cada uno de los patógenos es mostrado en la Figura 28.

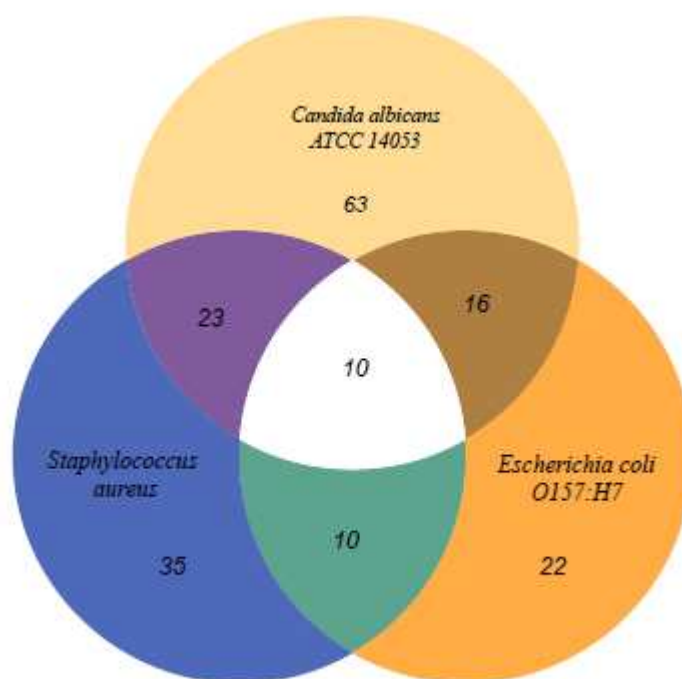


Figura 27. Diagrama de Venn que muestra los resultados de antagonismo de las actinobacterias probadas contra *E. coli* o157H:7, *C. albicans* y *S. aureus*.

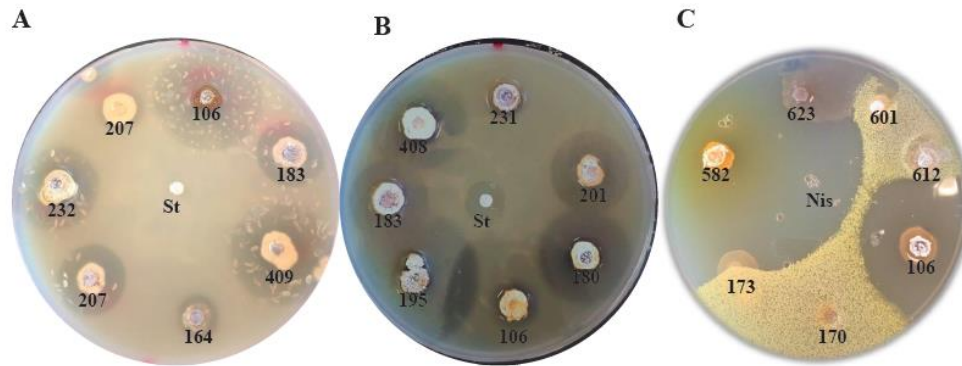


Figura 28. Ejemplo de ensayo de doble capa para identificar antagonismo de las actinobacterias A) *E. coli* o157H:7, B) *C. albicans*, C) *S. aureus*. Se utilizó estreptomicina (St) y Nistatina (Nis) como control positivo.

7.8. Ensayos de citotoxicidad

Quince actinobacterias fueron seleccionadas para la producción de metabolitos secundarios en líquido, basándonos en los resultados de los halos de inhibición en los ensayos de doble capa contra uno o más patógenos, además de la presencia de pigmento en su crecimiento. Las actinobacterias fueron inoculadas para su crecimiento en el medio de cultivo en el cual en el ensayo de doble capa presentaron un mayor halo de inhibición.

Los extractos crudos que se obtuvieron utilizando acetato de etilo como solvente orgánico, fueron diluidos en buffer de fosfatos al 1x a las siguientes concentraciones: 20, 200, y 400 µg/ml y probados contra células de cáncer de Colon HTB-38 y Mama HTB-81. Los resultados pueden ser observados en la tabla 12.

Tabla 12. Resultados de la IC₅₀ aproximada en µg/ml del escrutinio preliminar de diez extractos crudos obtenidos de las actinobacterias que produjeron halos de inhibición en el ensayo de doble capa.

CEPA No	COLON HTB-38	MAMA HTB-22
106	125	120
193	95	110
194	100	150
403	250	200
408	240	200
410	120	140
514	400	250
515	650	400
518	200	175
567	220	110

Debido a que ninguno de los diez extractos probados redujo la viabilidad celular en un 50% al cáncer de colon HTB-81 y mama HTB-22 a una concentración menor o igual a 20µg/ ml, que es considerada por el NCI como extracto activo, se seleccionaron 2 extractos provenientes de dos cepas de *Streptomyces* (PR33 Y PR35) previamente probados y reportados por (Reséndez 2017, Vilchis-Marquez 2017) con una IC₅₀ en cáncer de pulmón < a 6µg/ml y en mama < 20 µg/ml, para fraccionarlos por cromatografía flash y probarlos en un panel más amplio de células de cáncer: colon CACO, HTB-37, Melanoma HTB-72, Mama HTB -22, Pulmón HTB-177, Leucemia K-562 CCL-243, Ovario HTB-161, Fibroblastos control.

Como resultado del fraccionamiento por cromatografía flash, se obtuvieron ocho fracciones, las cuales fueron probadas en las líneas celulares de cáncer de mama y pulmón. Únicamente 2 fracciones de cada extracto pertenecientes a las actinobacterias PR 33 Y PR 35 presentaron actividad menor a 20 µg/ml. Las dos fracciones activas pertenecientes a cada extracto fueron seleccionados para determinar IC₅₀ en un mayor número de células tumorales, cuyos resultados se muestran en la tabla 13 y 14.

Tabla 13. Resultados de IC₅₀ en µg/ml de las fracciones obtenidas del extracto de acetato de etilo en líneas tumorales, utilizando células de fibroblastos como control.

LÍNEA	PR33-F6	PR33-F7	PR35-F5	PR35-F6	Doxo
HTB-72	0.201 ± 0.018 ^A	0.045 ± 0.006 ^A	0.069 ± 0.006 ^A	0.026 ± 0.005 ^A	0.924 ± 0.140 ^B
HTB-37	0.034 ± 0.003 ^A	0.087 ± 0.007 ^A	0.013 ± 0.001 ^A	0.062 ± 0.005 ^A	0.757 ± 0.052 ^B
HTB-22	0.023 ± 0.003 ^A	0.005 ± 0.001 ^A	0.034 ± 0.005 ^A	0.010 ± 0.007 ^A	0.669 ± 0.163 ^B
HTB-177	0.405 ± 0.012 ^A	0.586 ± 0.081 ^A	0.263 ± 0.043 ^A	0.245 ± 0.033 ^A	0.827 ± 0.241 ^B
K-562	0.019 ± 0.002 ^A	0.007 ± 0.002 ^A	0.013 ± 0.001 ^A	0.003 ± 0.001 ^A	3.253 ± 0.350 ^B
HTB-161	-	-	-	-	225.6 ± 18.33
FB	-	-	-	-	1.208 ± 0.289

Letras diferentes representan diferencias estadísticamente significativas determinadas por ANOVA de una vía ($\rho < 0.05$, seguida por la prueba de Tukey. (Doxo: doxorubicina, F: fracción, FB: fibroblastos)

Debido a que las concentraciones a las que fueron preparadas las fracciones no cruzaron el límite en la concentración inhibitoria 50, en células de cáncer de Ovario y fibroblastos y el stock original se agotó, se realizó una estimación mediante el programa estadístico GraphPad Prism 7, mediante una regresión no lineal de cuatro parámetros, la cual se puede observar en la tabla 14.

Tabla 14. Resultados de la estimación de IC₅₀ en µg/ml de las fracciones obtenidas del extracto de acetato de etilo en la línea celular de cáncer de Ovario (HTB-161) y Fibroblastos

LÍNEA	PR33-F6	PR33-F7	PR35-F5	PR35-F6
HTB-161	4.553	2.221	5.491	2.457
FB	13.36	195.4	250.5	125.1

F: fracción

La identificación de los compuestos activos presentes en las fracciones (PR33 F6, PR 33 F7, PR35 F5 y PR35 F6) se llevó a cabo utilizando cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) y posteriormente cromatografía de líquidos de ultra rendimiento, acoplado a masas UPLC-PDA-HRMS-MS/MS, dando como resultado la identificación de una mezcla de compuestos activos pertenecientes a la familia de las Actinomicinas, los resultados más detallados se muestran en la tabla 14. (anexo 4).

Tabla 15. Resultado de la identificación de los componentes de las fracciones PR33-F6, PR 33-F7, PR35-F5 y PR35-F6

FRACCIÓN	COMPUESTOS
PR33-F6	Actinomicina D Actinomicina X2
PR33-F7	Actinomicina D Actinomicina X2 Actinomicina X0b
PR35-F5	Actinomicina D Actinomicina X2
PR35-F6	Actinomicina D Actinomicina X2

8. DISCUSIÓN

8.1. Aislamiento y análisis de diversidad de actinobacterias.

Nueve medios de cultivo selectivos para actinobacterias fueron diseñados con variaciones principales en su fuente de carbono y nitrógeno, con la finalidad de lograr la mayor cantidad de aislados en las diferentes pozas donde se realizó muestreo, durante los dos periodos de colecta (2014-2015 y 2015-2016), en el primer periodo de aislamiento (2014-2015) se obtuvieron más de 250 aislados presuntamente pertenecientes al Phylum de las actinobacterias, 165 de ellas, fueron seleccionadas para su preservación, después del escrutinio realizado con base en la tinción de Gram, (se seleccionaron todos aquellos microorganismos que resultaron Gram-positivos y no presentaron formación de endosporas).

Para la segunda etapa de aislamiento (2015-2016) se utilizaron los mismos medios de cultivo, pero en esta ocasión se añadieron pretratamientos para hacer aún más selectivo el aislamiento dirigido a actinobacterias “raras”, de este aislamiento después de realizar el escrutinio se obtuvieron 103 presuntas actinobacterias. Resultando en un total de 268 actinobacterias morfológicamente diversas. De las cuales el 55 % fueron aisladas de la laguna intermedia del sistema hidrológico el Churince (Figura 10), esto debido a que el número de esfuerzos de muestreo fue mayor en este sitio que en las otras pozas (> 6 muestreos vs 2 en el resto), además de que en esta laguna se colectaron muestras en seis puntos, a diferencia del resto de las pozas los cuales solo se colectó de un solo punto de muestreo. Sin embargo, es posible también que el sistema Churince fuese particularmente diverso, como lo indican los metagenomas comparados de este sitio (De Anda, Zapata-Peñasco et al. 2018) con los de pozas rojas y pozas azules (Bonilla-Rosso, Peimbert et al. 2012, Peimbert, Alcaraz et al. 2012), así como el estudio de diversidad del sistema Churince (Souza, Eguiarte et al. 2018).

Al analizar el número de aislados por medio de cultivo, no se observa una correlación en el número de aislados con el tipo de medio de cultivo utilizado en el total de las

pozas, si bien en la mayoría de las pozas (LI, PR, MJ, AN) el medio AIM2 fue en el que se obtuvo el mayor número de aislados se observa una variación en el resto de ellas, donde en Poza azul el medio de cultivo más exitoso en el aislamiento fue el AIM6, en Arqueano y Poza Becerra el AIM3, esto sin duda se debe a la adaptación que tienen los microorganismos a las condiciones limnológicas que tiene cada una de las pozas, pues como ha sido ampliamente descrito en los últimos 18 años cada sistema acuático de CC posee características muy distintas que han sido ampliamente correlacionadas con la especiación y niveles de endemismo que poseen (Souza, Eguiarte et al. 2008, Pajares, Bonilla-Rosso et al. 2012).

Un punto de interés a resaltar es la gran morfodiversidad de Actinobacterias encontrada en un sitio como Churince, ya reportado pobre en fósforo y nitrógeno, y en general, materia orgánica (Figura 26). Solamente dentro de los linajes de *Streptomyces* que sugieren endemismo (figura 25), en el que los aislados más cercanos podrían sugerir cercanía o relación fenotípica, la diversidad morfológica micro y macroscópica, resalta incluso dentro de los individuos que se agrupan en un mismo clado monofilético. Estos resultados de gran diversidad cultivable de actinobacterias, son comparables con esfuerzos de aislamiento de éste Phylum pero de otras regiones que sí son ricas en nutrientes como sedimentos marinos (Prieto-Davo, Villarreal-Gomez et al. 2013, Yuan, Yu et al. 2014, Claverias, Undabarrena et al. 2015, Kuang, Li et al. 2015, Chen, Zhang et al. 2016, Mahmoud and Kalendar 2016, Undabarrena, Beltrametti et al. 2016, Alapati and Savithri 2017, Dhakal, Pokhrel et al. 2017, Hassan and Lateef Shaikh 2017, Ng and Yuan Annie Tan 2018, Rajagopal and Kannan 2018). Y, sobre todo, es pertinente resaltar que la morfodiversidad de actinobacterias aisladas en este trabajo es mucho mayor que la recuperada en sitios extremos por sus condiciones abióticas (Okoro, Brown et al. 2009, Liu, Salam et al. 2016, Castro, Nouioui et al. 2018, Goodfellow, Nouioui et al. 2018) o por baja cantidad de nutrientes (Coombs and Franco 2003, Trujillo, Riesco et al. 2015, Jiang, Tuo et al. 2018).

En cuanto a los microorganismos cultivados por punto de muestreo en IL, el mayor número de aislados se obtuvo de los puntos A y C con un 23% seguido de manera

muy cercana con el 22 % por el punto D. Las diferencias que se presentan en el aislamiento en los 6 puntos (Figura 19) posiblemente fue ocasionada debido a las fluctuaciones en la cantidad de agua que tuvo la laguna durante los periodos de muestreo, los puntos A y C fueron los que durante los dos periodos de muestreo en la mayoría de las ocasiones tuvieron agua o más humedad a diferencia del resto. Es posible plantear que, con esos cambios de humedad, se generó un gradiente de sales cambiando considerablemente el pH, ocasionando una variación en la población de actinobacterias, las cuales se sabe que son sensibles a la perturbación del ecosistema (Pajares, Eguiarte et al. 2013, Pajares, Souza et al. 2015).

Para la segunda etapa de aislamiento, el 55% de las actinobacterias morfológicamente distintas se obtuvieron con el pretratamiento H (Figura 20, Tabla 9 y 10), este resultado puede ocasionar varios supuestos, si solo se analizan los números, podría indicarnos que la sonicación es menos selectiva para el cultivo de actinobacterias “raras”, si bien el número de morfologías coloniales fue variable, estas fueron detectadas anteriormente en medios de cultivo sin pretratamientos. La ocurrencia en el aislamiento de actinobacterias “raras” en la mayoría de las ocasiones es menor al 5% al compararla con el género *Streptomyces* (Bredholt, A Galatenko et al. 2007, Tiwari and K Gupta 2011),

Por otra parte, el tratamiento que generó una mayor astringencia en el número de aislados fue el PtG (fenol 1.5% + ampicilina 50 µg/ml), dándonos indicios que probablemente las actinobacterias que resistieron a este pretratamiento químico pudiesen pertenecer al género *Micromonospora* o *Microbispora* , reconocida por soportar esas concentraciones de fenol (Hayakawa, Sadakata et al. 1991, Istianto, Setyo Adji Koesoemowidodo et al. 2012) y producir antibióticos del tipo β-lactámicos (Noor Hidayati, Lestari et al. 2013) por lo cual tengan probablemente una resistencia natural ese tipo de antibióticos. Sin embargo, es fundamental secuenciar a los aislados obtenidos mediante este medio para confirmar lo antes mencionado.

Como resultado de la identificación molecular, únicamente se lograron secuenciar de manera exitosa de forma bidireccional por medio del gen 16S ARNr , 95 actinobacterias, esto debido la dificultad que genera el alto contenido de G + C en

su genoma al momento de la secuenciación (Kieleczawa 2006), de las cuales el 78 % de las secuencias pertenecen a la Laguna intermedia. Aunque el número de secuencias obtenidas es baja en comparación con el número de actinobacterias asiladas, fuimos capaces de identificar, nueve géneros pertenecientes al orden de los Actinomycetales (*Streptomyces*, *Nocardiopsis*, *Blastococcus*, *Microbacterium*, *Micrococcus*, *Glycomyces*, *Verrucosipora*, *Arthrobacter*, *Kocuria*,) y uno al orden de Geodermófilos (*Modestobacter*); nueve de los diez géneros de actinobacterias cultivadas en este estudio hasta este momento, fueron obtenidas de la Laguna intermedia del sistema hidrológico el Churince, lo cual no nos toma por sorpresa, dado que en estudios realizados con tags del gen 16S ARNr por Illumina (Souza, Eguiarte et al. 2018) se observó que las actinobacterias son el linaje más abundante en el agua de LI con presencia notable de los géneros *Streptomyces*, *Yaniella*, *Arthrobacter*, *Trueperella*, así como actinobacterias no cultivables estrechamente relacionadas con PeM15 de origen marino, el cual es muy sensible al enriquecimiento por nutrientes (comunicación personal con Valeria Souza), lo que nos demuestra una vez más, la extensa diversidad de actinobacterias “raras” que pueden ser cultivados en las pozas de CC (Figura 24) comparable a aislamientos realizados en ambientes marinos (Cumsille, Undabarrena et al. 2017, Kannan, Sivaperumal et al. 2018), figura 22 y tabla 11.

El 71% de las actinobacterias que fueron secuenciadas en el total de las pozas donde se colectaron muestras, pertenecen al género *Streptomyces* (Figura 22, Tabla 11), dando por sentado la ubicuidad del género, el cual ha sido aislado en suelo hasta ambientes extremos como ventas hidrotermales, desiertos, entre otros (Santhanam, Rong et al. 2013, Shi, Pan et al. 2017).

En la Laguna intermedia (LI), fue sin duda el género más abundante (73%) y el único que se aisló en los 6 puntos de muestreo, fue posible aislarlo en 6 de los 7 medios de cultivo utilizados en esa poza. (Figura 23). Al comparar nuestro aislamiento, con un estudio realizado en el LI en el año 2010, el cual se basó en bacterias termorresistentes cultivadas en agar marino, se puede observar únicamente el aislamiento de miembros del suborden de las Micrococcineae y la “gran ausencia”

de *Streptomyces*, esto debido a que las esporas de este género no resisten altas temperaturas (S.D. Tapytkova 1969, Cerritos, Eguiarte et al. 2011). Resalta también que en el medio de cultivo AIM9 (ácidos húmicos), no se aisló ninguna colonia con morfologías características del género *Streptomyces*, lo que nos podría indicar que podría ser utilizado para el aislamiento dirigido a actinobacterias “raras” como el género *Blastococcus*.

8.2. Análisis filogenético del género *Streptomyces* aislados de la LI.

Como era de esperarse, por estudios previos en CC en los cuales se encontraron microorganismos endémicos (Alcaraz, Olmedo et al. 2008, Rebollar, Avitia et al. 2012), en este estudio encontramos 32 unidades taxonómicas operacionales (OTU's) para el género *Streptomyces*, las cuales están localizadas en seis clados monofiléticos y siete clados de un solo miembro, en una filogenia con buenos soportes nodales, realizada con miembros de la familia Streptomycetaceae como primer escrutinio y finalmente, con miembros del género *Streptomyces*. Esto demuestra que en nuestro aislamiento existe endemismo, en un género que es conocido por ser cosmopolita (Ait Barka, Vatsa et al. 2015). Aunque los datos obtenidos no representan limitación de dispersión *per se*, este tipo de agrupamientos filogenéticos que se dio en los OTU's pertenecientes a las secuencias de la LI y la distancia filogenética entre el resto de las secuencias de las especies reportadas en el resto del mundo, utilizadas en nuestra filogenia (Figura 25) y en el archivo suplementario No. 2 (Arocha-Garza, Canales-Del Castillo et al. 2017), pudiese estar relacionada con la migración limitada para dentro y fuera de las pozas del valle de CC. Al observar los clados que forman los aislados de la LI a lo largo de las filogenias (Figura 25) y archivo suplementario No 2 (Arocha-Garza, Canales-Del Castillo et al. 2017), se podría pensar que los OTU's están estrechamente relacionados entre ellos o que pudiesen ser uno mismo, las morfologías presentadas en la figura 26 reflejan una muy clara singularidad de cada uno de los miembros de los clados, así como una divergencia con lo conocido, sugiriendo radiaciones locales, igual que lo que ha ocurrido con *Bacillus*, género que

demuestra el “mundo perdido” en Cuatro Ciénegas (Moreno-Letelier, Souza et al. 2018).

8.3. Ensayos de antagonismo

De las 136 actinobacterias esporuladas que se probaron en el ensayo de doble capa para identificar la producción de metabolitos secundarios con potencial para inhibir el crecimiento de *E. coli* O157H:7, *C. albicans* ATCC 14053 y *S. aureus*, el 50 % presentó actividad contra al menos uno de los patógenos anteriormente mencionados, en alguno de los medios de cultivo de inducción utilizados. reportan en su estudio de aislamiento de actinobacterias de origen marino con potencial antimicrobiano, que el 38% de sus aislados presentaron actividad *contra Staphylococcus aureus, Proteus vulgaris, Escherichia coli, Candida albicans*, entre otros; por otro lado Yuan, Yu et al. (2014), lograron identificar que el 36% de sus aislados tienen actividad contra *Bacillus subtilis, Candida albicans, E. coli*. En otro reporte reciente, el 6% de los aislados (Alapati and Savithri 2017) fueron positivos contra *S. aureus* y *C. albicans*. Al comparar los resultados obtenidos en nuestro trabajo, resalta que en un mayor porcentaje nuestros aislados presentan actividad antimicrobiana en al menos uno de los cuatro medios de cultivos utilizados, además de que el tamaño de los halos de inhibición son en promedio una orden de magnitud más grandes que los trabajos anteriormente mencionados (anexo 3). Es posible que ésta sea la razón de por qué Cuatro Ciénegas es único, ya que sus comunidades microbianas son recalcitrantes a la invasión de especies “forasteras” (Perez-Gutierrez, Lopez-Ramirez et al. 2013).

El 7% de las actinobacterias producen metabolitos secundarios con actividad inhibitoria contra bacterias Gram-negativas, Gram-positivas y hongos, lo que nos pudiese indicar que estan produciendo antimicrobianos de amplio espectro. En el anexo 3 podemos observar que la producción de metabolitos secundarios con actividad antimicrobiana varía conforme al tipo de medio de inducción utilizado. Alapati and Savithri (2017) señalan que el cambio de fuentes de carbono y

concentración de sales influyen en gran medida la producción de metabolitos secundarios bioactivos, lo que concuerda con los resultados que obtuvimos.

Este ensayo formó parte del escrutinio preliminar para la selección de cepas y su medio de cultivo idóneo para la producción y extracción de metabolitos secundarios con acetato de etilo para probar su citotoxicidad en diferentes líneas celulares de cáncer, pues se sabe que las actinobacterias pueden producir metabolitos bioactivos denominados “antibióticos antitumorales” (Maskey 2003), que por su toxicidad se dejaron de usar como antibióticos y se comenzaron a utilizar como antitumorales, como es el caso de la doxorubicina y las actinomicinas, los cuales son las quimioterapias producidas por actinobacterias con actividad antitumoral de mas amplio espectro actualmente utilizadas producidas por el género *Streptomyces* (Wang, Tian et al. 2018). Recientemente con el auge en la bioprospección de actinobacterias marinas, se han descubierto compuestos bioactivos con actividad dual como: las marinomicinas, marinopirroles producidos por diferentes cepas de *Streptomyces* y la salinosporamida A por *Salinispora pacifica* (primer candidato a fase clínica). Este género ha sido revelador en los últimos años por el alto número de compuestos bioactivos que produce. (A M Gulder and S Moore 2009, Subramani and Aalbersberg 2012, Dhakal, Pokhrel et al. 2017).

8.4. Actividad citotóxica, identificación y determinación estructural de los componentes de los extractos de actinobacterias aisladas de CC.

El cáncer es una enfermedad sumamente compleja, que se caracteriza por la proliferación descontrolada de células a una tasa mas elevada que las células normales, por lo cual se buscan tratamientos que detengan los ciclos celulares o induzcan la muerte de las células cancerosas utilizando compuestos citotóxicos. En nuestros experimentos realizados *in vitro*, inicialmente se probaron 10 extractos producidos por actinobacterias aisladas de CC, los cuales no presentaron actividad citotóxica significativa respecto al parámetro establecido por el Instituto Nacional del Cáncer de Estados Unidos (NCI); el cual establece que un extracto natural es

considerado activo si su IC_{50} es igual o menor a $20\mu\text{g/ml}$, moderadamente activo de 20 a $100\mu\text{g/ml}$ e inactivo $>100\mu\text{g/ml}$ (Skehan, Storeng et al. 1990, Bolk 2003). Por lo cual se seleccionaron dos extractos provenientes de cepas de *Streptomyces* (PR33 y PR35) aisladas de pozas rojas, pertenecientes a la colección del cepario de nuestro laboratorio, y del que ya se tenían resultados preliminares en el que alcanzaron una IC_{50} menor a $20\mu\text{g/ml}$ en células de cáncer de mama (HTB-22) y pulmón (HTB-177). Dos fracciones de cada extracto presentaron actividad citotóxica significativa en las células donde se realizó el escrutinio inicial, por lo cual fueron seleccionadas para ampliar el panel de células cancerosas con la finalidad de determinar si las fracciones tenían actividad citotóxica de amplio espectro.

En la tabla 13, podemos observar la concentración inhibitoria media (IC_{50}) de las cuatro fracciones probadas, las cuales mostraron mayor actividad citotóxica en comparación a la doxorubicina utilizada como control, resultados que son sustentados identificando que los tratamientos presentan diferencias significativas en comparación al control positivo por un análisis estadístico mediante un ANOVA de una sola vía seguido por la prueba de Tukey.

Sin embargo, no fue posible determinar la IC_{50} , en el total del panel de células probadas debido al rendimiento obtenido en la separación por UPLC, por lo cual en las células de cáncer de ovario y fibroblastos fue estimada por el programa estadístico GraphPad Prism 7 (Sebaugh 2011) arrojando datos confiables (Sebaugh 2011). Al analizar los resultados de las concentraciones inhibitorias medias de forma global, se puede observar claramente que los compuestos de las cuatro fracciones se pueden considerar activas en el panel de células de cáncer e inactivas en células sanas (fibroblastos) en tres de las fracciones (PR 33-F7, PR35-F5 y PR35-F6) y únicamente activa en la fracción PR33-F6. Las variaciones en las concentraciones inhibitorias medias de la misma fracción en diferentes líneas celulares se dan por que las células cancerosas poseen diferencias en su composición genética, lo que puede ocasionar cambios notables en la susceptibilidad al mismo agente citotóxico (Hanahan and Weinberg 2011).

La separación de los componentes de las fracciones bioactivas fue por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), posteriormente fueron enviadas a una cromatografía líquida de ultra rendimiento acoplado a un espectrometro de masas UPLC-PDA-HRMS-MS/MS para la identificación y determinación estructural de los compuestos (anexo 4). Los componentes principales de las cuatro fracciones analizadas resultaron pertenecer a la familia de las Actinomicinas; las fracciones PR 33-F6, PR 35-F5, PR35-F6 contienen la mezcla de Actinomicina D y Actinomicina X2, mientras que la fracción PR33-F7 esta compuesta por tres componentes: Actinomicina D, Actinomicina X2 y Actinomicina X0b, que son compuestos reportados con anterioridad producidos por cepas del género *Streptomyces*.(Foster and Katz 1981, Praveen, Tripathi et al. 2008, Wang, Wang et al. 2017)

Los compuestos pertenecientes a las familias de las Actinomicinas han sido estudiados para su uso como quimioterapia en el tratamiento de diferentes líneas celulares de cáncer, en estudios realizados por (Chen, Chen et al. 2011, Cibi and Nair 2016) en células de cáncer de mama HTB-22 se determinaron valores de IC₅₀ que rondan de 1-31 µg/ml después de exponer las células a la Actinomicina D durante 48 y 72 horas. Por otra parte, en células de Pulmón (HTB-177), la concentración inhibitoria media del compuesto Actinomicina D en células tratadas por 72h fue de 2.6 ± 1.6 (Chen, Chen et al. 2011), en células de colon (HTB-37) la IC₅₀ fue determinada en 0.1 µg/ml en 24h, (Alam, Najumus Saqib et al. 2015) en células de sangre de 0.003 µg/ml después de 24 horas de exposición (Sugawara, Iwahashi et al. 1991) y en células de cancer de piel HTB-72 de 2 µg/ml a las 24h (Sheridan, Brumatti et al. 2008). Al comparar dichos resultados con los obtenidos en nuestro estudio, podemos observar que en la mayoría de las ocasiones las concentraciones inhibitorias medias que determinamos fueron menores a las previamente reportadas.

Las células de cancer de ovario HTB-161 (considerada dentro del panel de células cancerosas multidrogoresistentes) (McDermott, Eustace et al. 2014, Sakhare, G Rao

et al. 2014), tratadas con doxorrubicina como control positivo, observamos que no había actividad citotóxica activa, similar a lo reportado por (Hamilton, C Young et al. 1983, Teng, Wang et al. 2013). A pesar de su alta resistencia a compuestos citotóxicos, la IC₅₀ estimada de las fracciones de los extractos de las actinobacterias aisladas de CC fueron de no más de 6 µg/ml. A la fecha, dentro de nuestro conocimiento y alcance de búsqueda, sabemos y se ha reportado que compuestos como Pterocidina, Adriamicina y Mansouramicina A (Hamilton, C Young et al. 1983, Golinska, Wypij et al. 2015, Gomathi and Gothandam 2016), producidos por diferentes géneros de actinobacterias, presentan actividad citotóxica activa y moderadamente activa, basándonos en los índices del NCI, sin embargo no se ha encontrado informes de actividad citotóxica de Actinomicinas contra células de cancer de Ovario HTB-161, haciendo de este un primer reporte del efecto citotóxico de dichos compuestos contra esta línea celular.

Son muy notorios los resultados reportados en la tabla 13, si se compara el índice de citotoxicidad mediante las concentraciones inhibitorias medias entre las fracciones obtenidas de los metabolitos secundarios producidos por actinobacterias de CC y el control positivo utilizado (Doxorrubicina). A pesar de que dicho compuesto es una de las quimioterapias comunmente utilizadas en el tratamiento contra diferentes líneas celulares tumorales (Mitra, Dixit et al. 2001, Sadeghi-Aliabadi, Mozaffari et al. 2013, Alves, Magarkar et al. 2017), entre ellas el panel de células que fue utilizado en nuestro estudio (Hamilton, C Young et al. 1983, Pesic, Markovic et al. 2006, Diao, Li et al. 2011), fue necesario utilizar concentraciones diez veces mas elevadas de doxorubicina, comparada con las concentraciones de las fracciones de nuestro estudio para inhibir el 50% de las células tratadas. Los compuestos de la familia de las Actinomicinas, cuyo alto efecto citotóxico, a los pocos minutos de haber sido aplicado, ha sido reportado en diferentes tipos de cáncer, como el tumor de Wilms, sarcoma de Ewing, rabdomiosarcoma, cancer testicular, tumores trofoblásticos, mesenquimales, entre otros (Srinivas and S. Freiha 1999, Veal, Errington et al. 2003, Bensaude 2011, S Dome, Graf et al. 2015, Cowell, Zimmerman et al. 2016), a diferencia de la doxorrubicina cuya acción citotóxica inicia a las horas después de

haber sido aplicada (Chen, Chen et al. 2011, Cibi and Nair 2016). Siguiendo lo que sugieren los resultados de nuestro estudio, las Actinomicinas podrían ser utilizadas para tratar células tumorales con altas tasas de proliferación celular como osteosarcomas, enuroblastomas, entre otros. (Lu, Wang et al. 2015, Cortés, R. Veiga et al. 2016).

Al comparar el efecto de la viabilidad celular con células normales, la doxorubicina resultó ser un orden de magnitud mas citotóxica para los fibroblastos respecto a las fracciones PR33-F6, PR 33-F7, PR35-F5 y PR35-F6, en donde tres de ellas (PR 33-F7, PR35-F5 y PR35-F6) se encuentran en la categoría de citotoxicidad inactiva según los parámetros del Instituto Nacional del cancer de Estados unidos. Por lo que la elevada actividad citotóxica de la doxorubicina no selectiva contra células cancerosas esta claramente correlacionada con los efectos secundarios que tienen los pacientes que la utilizan por al necesitar mayores dosis de este compuesto para generar apoptosis en las células cancerosas (Tabla 13) que genera daños celulares generalizados en los pacientes tratados. (J Steinherz, G Steinherz et al. 1991, Longhi, Ferrari et al. 2007, F. Thorn, Oshiro et al. 2011). La clara selectividad en los efectos citotóxicos que observamos en este estudio en las actinomicinas producidas por las actinobacterias de CC, la cual no es detectada en la doxorubicina en las células de fibroblastos utilizadas como control, abre las posibilidades para el resurgimiento de nuevos estudios del uso de las Actinomicinas para tratar las líneas celulares cancerosas de mama (MCF-7), colon (Caco-2), melanoma (SK-MEL-28) ovario (OVCAR-3) y sangre K-562, muy seguramente ocasionada por las tasas de división celular alteradas por las variaciones genéticas causadas por mutaciones en su ADN, que hace que no respondan normalmente a las señales de control de crecimiento.(Clurman and Roberts 1995, Xuereb and Blundell 2008), y al llegar la quimioterapia al torrente sanguíneo las células que se estan dividiendo en una tasa mas rápida a lo normal, consecuentemente absorberán mayor cantidad del tratamiento.(Alfarouk, Stock et al. 2015).

A pesar de la selectividad citotóxica que presentan los compuestos de la familia de las antracilinas, es de resaltar que en la base de datos de resistencia a los

medicamentos contra el cáncer (Cancer DR), que engloba más de 148 compuestos antitumorales probados en 952 líneas celulares, no existen a la fecha reportes de la actividad *in vitro* de compuestos pertenecientes a la familia de las actinomicinas en las líneas celulares tumorales que fueron probadas en el presente estudio (Kumar, Chaudhary et al. 2013), haciendo a nuestro estudio, el primer reporte de actinomicinas en estas líneas celulares.

Por otra parte, el efecto citotóxico de las fracciones probadas fue evidente a las 24 horas de exposición, esto probablemente a la sinergia que puede presentarse entre los diferentes tipos de Actinomicinas y que están presentes en las fracciones, existen pruebas en las que se ha demostrado que, una forma de mejorar la actividad citotóxica de las quimioterapias, es mezclando compuestos que al hacer sinergia aumenten su potencial citotóxico (E Olberding, Wang et al. 2010), explicando de esta manera por qué las concentraciones inhibitorias medias reportadas en nuestro estudio son tan bajas en comparación a lo anteriormente reportado en estudios realizados con Actinomicinas.

Dentro de nuestro conocimiento este es el primer estudio de bioprospección para la búsqueda de actinobacterias productoras de metabolitos secundarios con actividad antitumoral aisladas de las pozas de Cuatro Ciénegas, Coahuila y a pesar del alto grado de endemismo para este linaje reportado en el valle (Moreno-Letelier, Souza et al. 2018), en un inicio sugería una alta probabilidad de evitar la redundancia en la producción, aislamiento e identificación de metabolitos secundarios bioactivos, prometedores para el tratamiento contra el cáncer, en este escrutinio inicial en donde se probaron doce aislados de una colección de más de cuatrocientas actinobacterias, a la fecha solamente se han identificado compuestos pertenecientes a la familia de las Actinomicinas, los cuales pertenecen a la lista de los compuestos más estudiados y utilizados contra el cáncer.

Esto no debería desestimar el potencial ni el valor de la biodiversidad cultivable de nuestra colección, ya que el análisis por 16S ha dejado claro que existen de hecho,

organismos endémicos. Sin embargo, en aras de aislar compuestos bioactivos que no hayan sido previamente reportados, es necesario ampliar el escrutinio exploratorio en nuestra colección de actinobacterias, tal vez modificando nuestras estrategias de búsqueda, entre las que podemos sugerir:

- 1) Completar los ensayos de antagonismo y citotoxicidad a los metabolitos secundarios producidos por las actinobacterias que después de los análisis filogenéticos que se llevaron a cabo en este estudio, conformaron clados únicos (Figura 25), dándonos un indicio de su endemismo.
- 2) Aplicar técnicas cromatográficas de alta resolución directamente de los compuestos excretados en una fermentación, para la identificación de compuestos que no hayan sido previamente reportados y puedan ser “novedosos” (no previamente reportados) y puedan entrar en el “pipe-line” de investigación como posible tratamiento contra diferentes líneas tumorales, evitando así la redundancia (Reitzel, Dalsgaard et al. 2012, Yang, Liang et al. 2014).
- 3) Hacer uso de las herramientas de la minería genómica para la búsqueda de arreglos o *clústers* de genes que codifican para la síntesis de metabolitos secundarios como NRPS y PKS, compuestos con actividad citotóxica y posteriormente, optimizando la fermentación para su producción natural o heteróloga (Khan, Komaki et al. 2011, Paulus, Rebets et al. 2017, Hu, Chen et al. 2018).

Este trabajo, demuestra sin ambigüedades que el potencial farmacéutico codificado por la biodiversidad microbiana dentro del Phylum Actinobacteria cultivable de Cuatro Ciénegas, Coahuila, es inconmesurable. Esto no es difícil de entender, si se reflexiona acerca del modelo de evolución propuesto para la diversidad biológica encontrada en este sistema hidrológico, que ha sido propuesto como una “burbuja” evolutiva que se separó años atrás, del resto de los seres vivos del planeta en la historia evolutiva, por sus condiciones geológicas y geográficas (Moreno-Letelier, Souza et al. 2018), en el que se han encontrado linajes ancestrales de *Bacillus*.

Queda además de manifiesto que, mas allá de la zona del Churince, hay una variada inmensidad de ambientes y nichos resguardados en cada poza de este Valle, que aún guarda “secretos” en su biodiversidad. Serán necesarios esfuerzos coordinados de colaboración con diversas disciplinas de la Ciencia y de diversos grupos de investigación, para aspirar a una búsqueda eficiente de las diferentes aplicaciones que pueden vislumbrarse, tan solo de la diversa colección microbiana obtenida en este esfuerzo de investigación, y así seguir generando valor y resguardando a la biodiversidad del noreste de México.

Para que la aplicación, transferencia y posible explotación de los recursos biológicos-genéticos de los microorganismos de Cuatro Ciénegas, ocurra de forma sostenible, genere beneficios justos y equitativos, y además sirva para construir consciencia acerca de la gran necesidad de conservación del Área Natural Protegida, es indispensable que la presente investigación esté enmarcada en la regulación internacional que nuestro país ha firmado y ratificado en el 2016 (CONABIO 2018) en el protocolo de Nagoya.

A pesar de que actualmente se han dictaminado leyes, normas y tratados internacionales cuya finalidad es evitar la biopiratería (Rabitz 2015), la comunidad científica no ha estado exenta de cometer este grave error, explotando recursos genéticos de países megadiversos, generando beneficios para unos pocos, sin compartirlos con sus pobladores, tal es el caso del compuesto 29-desmetil rapamicina utilizado como inmunosupersor y antifungico producido por una cepa del genero *Streptomyces* asilada en Gambia, de la cual no existe registro alguno en el que se haya compartido los beneficios de la comercialización del producto con esa región (Pambazuka 2010).

Sin embargo, también existen experiencias y casos de éxito de la aplicación de los acuerdos de participación justa y equitativa de los beneficios de la bioprospección microbiana en otros países. Desafortunadamente, no es el caso de México, en el que a la fecha, y en lo que resulta de nuestra investigación y conocimiento, no

encontramos registro de algún caso de comercialización exitosa de algún producto natural microbiano de origen mexicano en el que se haya dado acceso y compartido el beneficio económico con la comunidad. El reto para el presente trabajo, es pues, aprender de lecciones de otros países que han logrado llevar a cabo trabajos de bioprospección y la transferencia total de la tecnología siguiendo los compromisos y acuerdo del Tratado.

El caso mas exitoso en el que actualmente el sitio de origen del recurso biológico ya recibe parte de las regalías del valor comercial de un producto es la pseudopterosina, extraída del coral suave *Pseudopterogorgia elisabethae*, colectada de las Bahamas. Originalmente fue patentada por investigadores de la Universidad de California y después de muchos años de negociaciones e implementando las regulaciones del protocolo de Nagoya, parte de las ganancias generadas del uso del extracto del coral por multiples compañías cosmeticas han sido transferidos al gobierno de las Bahamas para la conservacion, manejo de recursos y educación (Vivas-Eugui and Hartmut 2018).

Otro ejemplo de un caso de éxito por buenas prácticas en la aplicación del protocolo de Nagoya, es el proyecto del uso sostenible de la biodiversidad de Papua Nueva Guinea, en el que el grupo cooperativo internacional de biodiversidad (ICBG) en colaboración con la Universidad de Papua Nueva Guinea, Universidad de Utah y Minesota, actualmente realizan estudios de bioprospección enfocados en el descubrimiento de productos para el tratamiento contra el VIH y tuberculosis, entre otras cosas, apoyando a la educación de jovenes de la región, generando empleos con la instalación de institutos de investigación y apoyando en la conservación de la biodiversidad del lugar (Robinson 2014).

En America Latina también hay antecedentes exitosos de acceso y participación de beneficios. Por ejemplo, en Colombia se han realizado esfuerzos de aislamiento de bacterias pertenecientes al género *Lactococcus sp.* para la obtención de enzimas y producción de biopolímeros por la Universidad de Colombia, lo cual hasta el

momento ha generado beneficios no monetarios entre los que se encuentran la generación de un banco de cepas que sea de acceso para diferentes instituciones del país, la organización de congresos que ayuden a la divulgación de la importancia de la conservación de la biodiversidad y sus usos biotecnológicos, con la premisa de que al momento en que se llegue a comercializar algún producto derivado de los esfuerzos de bioprospección un 10% de las ganancias netas serán utilizados para la educación y conservación (Rios 2013).

Finalmente uno de los proyectos más ambiciosos de Latinoamérica, es el caso del estudio de bioprospección realizado en las 171 áreas naturales protegidas de Costa Rica realizado por el Instituto Nacional de la Biodiversidad de Costa Rica en colaboración con la Universidad de Harvard, Universidad de Michigan, el Instituto Nacional de la Salud (NHI), entre otros, cuyos enfoques son salud, agricultura y energía mediante el aislamiento de plantas y microorganismos entre los que se encuentran actinobacterias, cianobacterias, hongos y líquenes. El beneficio que actualmente se ha generado a partir de dicha colaboración es la generación de una base de datos que integra la biodiversidad de Costa Rica, Congresos de educación ambiental, distribución de libros sobre biodiversidad en las escuelas rurales del país, capacitación a investigadores, generación de empleos y apoyos para la conservación de áreas naturales. Todo lo anterior, se ha desarrollado con el compromiso de que al momento de generarse algún producto relacionado con la salud humana, los precios de este serán subsidiados para que los ciudadanos de Costa Rica puedan tener fácil acceso (Rios 2013).

A pesar de que a la fecha en Cuatro Ciénegas los resultados obtenidos en los estudios de bioprospección que se han realizado no han generado ganancias monetarias, la comunidad ya ha obtenido grandes beneficios al convertirse en un área de investigación de interés a nivel mundial. Se ha formado una red de científicos que liderados por investigadores de la Universidad Nacional Autónoma de México (Dra. Valeria Souza Saldivar y Dr. Luis Eguiarte), así como colaboradores del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional

(CINVESTAV) (Dra Gabriela Olmedo Álvarez), han realizado congresos como el III Congreso de Bioquímica y Biología Molecular de Bacterias, simposios de conservación, y han gestionado becas para alumnos de bachillerato así como el equipamiento y funcionamiento del primer laboratorio de biología molecular en centro de estudios medios superiores del país instalado en el CBTa No.22, con la finalidad de que los alumnos del plantel se conviertan en los agentes directamente involucrados en la búsqueda de los recursos genéticos, que ayuden a generar productos de valor agregado para que en un futuro cercano sean comercializados y generen beneficios a la comunidad.

El principal interés del grupo de investigación del que forma los integrantes del presente trabajo, es la participación de los recursos económicos para apoyar a la conservación del valle de Cuatro Ciénegas de manera sostenible, con la esperanza de convertirse así en el primer caso de éxito en nuestro país que habrá seguido los lineamientos establecidos en el protocolo de Nagoya, y sea utilizado como modelo a seguir para reproducirlo en otros esfuerzos de bioprospección en el megadiverso territorio Nacional.

En cuanto a los esfuerzos de Conservación del Valle de Cuatro Ciénegas, es urgente no esperar a que los recursos económicos fluyan a partir de los posibles productos biotecnológicos generados de la colección obtenida en el presente trabajo. Es urgente llamar la atención de quienes toman decisiones en el país, con resultados como los nuestros que hagan evidente la gran diversidad y endemismo, así como el potencial valor económico de la microbiodiversidad de éstas pozas, que actualmente están siendo amenazadas por las fluctuaciones en los niveles de agua en el valle.

La explotación del acuífero es una lamentable realidad, debido al drenado artificial de las pozas generado por canales abiertos que datan de hace más de un siglo y que se continuaron construyendo hasta mediados de los años 60's, recorriendo más de 65 kilómetros para proveer de agua a comunidades entre las que se encuentran La Madrid, Sacramento, San Buenaventura y Nadadores Coahuila, y hasta la fecha la

comisión nacional del agua (CONAGUA), mediante una publicación en el diario oficial de la federación señala que se extraen en promedio 2,503 litros de agua por segundo dando un volumen del orden de 99.5 millones de metros cúbicos anuales mediante de seis canales artificiales mostrados a continuación:

Tabla 16. Extracción de agua en canales artificiales de las pozas de Cuatro Ciénegas

CANAL	Año de construcción	Longitud del canal en kilómetros	CAUDAL capacidad máxima de conducción en litros por segundo (IMTA-04)	Superficie de riego en hectáreas	OBSERVACIONES
Santa Tecla	1966	54.6	220-320	600	Caudal conducido a zonas agrícolas de aguas abajo.
Saca Salada	1902	65	800-1300	1500	
La Becerra	1966	57.2	580-645	400-500	Caudal utilizado en el riego en Cuatro Ciénegas
El Venado	1969	9.9	66-98	100	
Antiguos Mineros del Norte	Sin Información	Sin Información	30-80	100	
Julio Arredondo	Sin Información	Sin Información	40-60	Sin Información	

Fuente: (Tamargo 2008)

Estos datos demuestran que únicamente una cuarta parte (17.8 millones de metros cúbicos anuales) del agua total extraída de los mantos acuíferos, son utilizados para la agricultura en Cuatro Ciénegas, mientras que casi las tres cuartas partes restantes (81.7 millones de metros cúbicos anuales) son conducidos a las zonas aledañas de gran actividad agrícola.

Relacionado con los datos anteriores, resulta muy alarmante para nuestro grupo de investigación encontrar actualmente seca la Laguna Intermedia del Churince, sitio principal del muestreo del presente trabajo, y del que se han reportado endemismos

microbianos e importantes estudios ecológicos (Escalante, Eguiarte et al. 2008, Rebollar, Avitia et al. 2012, Rodríguez-Verdugo, Souza et al. 2012, Velez, Gasca-Pineda et al. 2016, Arocha-Garza, Canales-Del Castillo et al. 2017, López-Lozano, Pajares et al. 2018). Existen reportes de que la laguna intermedia del sistema hidrológico del Churince, ha estado seca con anterioridad en los años 1964-1968 y también ha tenido periodos de recuperación (2003-2004) (Tamargo 2008). Los estudios sobre la resiliencia de las comunidades microbianas y la respuesta a las perturbaciones causadas por la actividad humana (De Anda, Zapata-Peñasco et al. 2018, López-Lozano, Pajares et al. 2018), aunado a los reportes de fluctuaciones históricas del agua en la zona, nos hacen pensar que el futuro del acuífero no está perdido, siempre y cuando se tomen decisiones urgentes y necesarias para evitar su sobreexplotación, en donde casi el 75% del agua que se drena con los canales de Cuatro Ciénegas se utiliza para prácticas agrícolas fuera de este Valle. Sólo así se podrá evitar continuar dañando el acuífero de este oasis, y su valiosa y amenazada biodiversidad.

9. CONCLUSIONES

Este trabajo forma parte del primer esfuerzo de análisis de la diversidad y bioprospección de actinobacterias mesófilas cultivables de las pozas de Cuatro Ciénegas, Coahuila, en el cual comprobamos que existe una amplia diversidad de bacterias cultivables pertenecientes a este Phylum. Los hallazgos realizados hasta el momento sugieren endemismo en las actinobacterias pertenecientes al género *Streptomyces*, cuya robustez metabólica les ha permitido adaptarse a las condiciones oligotróficas de la zona, lo que representa una gran posibilidad de aislar metabolitos secundarios bioactivos contra patógenos humanos y diferentes líneas de células tumorales que no hayan sido anteriormente reportados, que puedan ser utilizados en un futuro como tratamientos.

El estudio de bioprospección del presente trabajo nos permiten que concluir que el 50% de los aislados obtenidos, muestran actividad al menos contra uno de los patógenos evaluados. Además, las filogenias de las actinobacterias aisladas y secuenciadas, muestran linajes únicos de Cuatro Ciénegas.

Para dar valor a la biodiversidad de la zona a través de la búsqueda de recursos genéticos con potencial biotecnológico, será necesario concertar colaboraciones de diferentes áreas para lograr el objetivo de encontrar microorganismos no redundantes, como por ejemplo, utilizar diferentes técnicas entre las que se encuentran las cultivo-dependientes y de minería genómica de la colección obtenida en este reporte.

10. PERSPECTIVAS

Basándonos en el hecho de que las actinobacterias tienen la capacidad de producir múltiples metabolitos secundarios bioactivos dependiendo las condiciones de fermentación en las que se encuentren, se podrían realizar estudios de minería genómica de las cepas de *Streptomyces* (PR33 y PR35) con la finalidad de encontrar clusters de genes que pudiesen estar relacionados en la producción de metabolitos secundarios bioactivos que no hayan sido anteriormente reportados y que tal vez estén silenciados por las condiciones de cultivo. Lograr identificar dichos clusters y sus promotores permitiría modificar las condiciones de la fermentación para inducir la producción de dichos compuestos.

Como primer trabajo en la bioprospección de actinobacterias con potencial antibiótico y antitumoral aisladas de las pozas de Cuatro Ciénegas, Coahuila, se realizó un escrutinio de manera exploratoria. En los siguientes trabajos es recomendable realizar una selección previa de las actinobacterias que se incluirán en los ensayos de antagonismo y citotoxicidad, apoyándose por ejemplo, en los análisis filogenéticos realizados en esta investigación, en la cual reportamos signos claros de endemismo o a su vez en las cepas que después de la secuenciación del gen 16S ARNr resultaron pertenecer a los géneros denominados como “raros”. Con el objetivo de evitar la redundancia en los compuestos bioactivos.

11. BIBLIOGRAFÍA

- A Cooper, M. and D. Shlaes (2011). Fix the antibiotic pipeline.
- A M Gulder, T. and B. S Moore (2009). Chasing the Treasures of the Sea – Bacterial Marine Natural Products.
- A, R. and P. Prabakaran (2011). Actinomycetes and Drug-An Overview.
- A. Aparicio-Cuevas, M., I. Rivero-Cruz, M. Sánchez-Castellanos, D. Menendez, H. Raja, P. Joseph-Nathan, M. Gonzalez and M. Figueroa (2017). Dioxomorpholines and Derivatives from a Marine-Facultative Aspergillus Species.
- Ait Barka, E., P. Vatsa, L. Sanchez, N. Vaillant-Gaveau, C. Jacquard, H.-P. Klenk, C. Clément, Y. Ouhdouch and G. Wezel (2015). Taxonomy, Physiology, and Natural Products of Actinobacteria.
- Alam, F., Q. Najumus Saqib and A. Waheed (2015). Effect of crude saponins from Gaultheria trichophylla extract on growth inhibition in human colorectal cancer cells.
- Alapati, K. and H. Savithri (2017). Biological Significance of Marine Actinobacteria of East Coast of Andhra Pradesh, India.
- Alcaraz, L. D., G. Olmedo, G. Bonilla, R. Cerritos, G. Hernandez, A. Cruz, E. Ramirez, C. Putonti, B. Jimenez, E. Martinez, V. Lopez, J. L. Arvizu, F. Ayala, F. Razo, J. Caballero, J. Siefert, L. Eguiarte, J. P. Vielle, O. Martinez, V. Souza, A. Herrera-Estrella and L. Herrera-Estrella (2008). "The genome of Bacillus coahuilensis reveals adaptations essential for survival in the relic of an ancient marine environment." Proc Natl Acad Sci U S A **105**(15): 5803-5808.
- Alfarouk, K., C. Stock, S. Taylor, M. Walsh, A. Muddathir, D. Verduzco, A. Bashir, O. Y Mohammed, G. Elhassan, S. Harguindey, S. Reshkin, M. Ibrahim and C. Rauch (2015). Resistance to cancer chemotherapy: Failure in drug response from ADME to P-gp.
- Alves, C., A. Magarkar, M. Horta, J. L. F. C. Lima, A. Bunker, C. Nunes and S. Reis (2017). Influence of doxorubicin on model cell membrane properties: Insights from in vitro and in silico studies.
- Aminov, R. (2009). The Role of Antibiotics and Antibiotic Resistance in Nature.
- Arocha-Garza, H. F., R. Canales-Del Castillo, L. E. Eguiarte, V. Souza and S. De la Torre-Zavala (2017). "High diversity and suggested endemicity of culturable Actinobacteria in an extremely oligotrophic desert oasis." PeerJ **5**: e3247.
- Atkinson, M. J. (1982). "Elemental composition of commercial seasalts." Journal of aquaculture & aquatic sciences **VIII**(2).
- Azman, A. S., I. Othman, C. M. Fang, K. G. Chan, B. H. Goh and L. H. Lee (2016). Antibacterial, Anticancer and Neuroprotective Activities of Rare Actinobacteria from Mangrove Forest Soils.
- Baltz, R. (2007). Antimicrobials from actinomycetes: Back to the future.
- Baumgartner, L. K., J. R. Spear, D. H. Buckley, N. R. Pace, R. P. Reid, C. Dupraz and P. T. Visscher (2009). "Microbial diversity in modern marine stromatolites, Highborne Cay, Bahamas." Environ Microbiol **11**(10): 2710-2719.
- Bensaude, O. (2011). Inhibiting eukaryotic transcription: Which compound to choose? How to evaluate its activity?

Bentley, S. D., K. F. Chater, A. M. Cerdeno-Tarraga, G. L. Challis, N. R. Thomson, K. D. James, D. E. Harris, M. A. Quail, H. Kieser, D. Harper, A. Bateman, S. Brown, G. Chandra, C. W. Chen, M. Collins, A. Cronin, A. Fraser, A. Goble, J. Hidalgo, T. Hornsby, S. Howarth, C. H. Huang, T. Kieser, L. Larke, L. Murphy, K. Oliver, S. O'Neil, E. Rabinowitsch, M. A. Rajandream, K. Rutherford, S. Rutter, K. Seeger, D. Saunders, S. Sharp, R. Squares, S. Squares, K. Taylor, T. Warren, A. Wietzorrek, J. Woodward, B. G. Barrell, J. Parkhill and D. A. Hopwood (2002). "Complete genome sequence of the model actinomycete *Streptomyces coelicolor* A3(2)." Nature **417**(6885): 141-147.

Berdy, J. (2012). Thoughts and facts about antibiotics: Where we are now and where we are heading.

Bérdy, J. (2005). Bioactive microbial metabolites - A personal view.

Bhattacharjee, J., G. Verma, V. Aswal and P. Hassan (2009). Small angle neutron scattering study of doxorubicin-surfactant complexes encapsulated in block copolymer micelles.

Bhullar, K., N. Waglechner, A. Pawlowski, K. Koteva, E. D Banks, M. D Johnston, H. Barton and G. D Wright (2012). Antibiotic Resistance Is Prevalent in an Isolated Cave Microbiome.

Bolk, J. (2003). Natural Compounds in Cancer Therapy.

Bonilla-Rosso, G., M. Peimbert, L. Alcaraz, I. Hernandez-Gonzalez, L. Eguiarte, G. Olmedo-Alvarez and V. Souza (2012). Comparative Metagenomics of Two Microbial Mats at Cuatro Ciénegas Basin II: Community Structure and Composition in Oligotrophic Environments.

Brady, S. F., L. Simmons, J. H. Kim and E. W. Schmidt (2009). "Metagenomic approaches to natural products from free-living and symbiotic organisms." Nat Prod Rep **26**(11): 1488-1503.

Bredholt, H., O. A Galatenko, K. Engelhardt, E. Fjaervik, L. P Terekhova and S. Zotchev (2007). Rare actinomycete bacteria from the shallow water sediments of the Trondheim fjord, Norway: Isolation, diversity and biological activity.

Breitbart, M., A. Hoare, A. Nitti, J. Siefert, M. Haynes, E. Dinsdale, R. Edwards, V. Souza, F. Rohwer and D. Hollander (2009). "Metagenomic and stable isotopic analyses of modern freshwater microbialites in Cuatro Cienegas, Mexico." Environ Microbiol **11**(1): 16-34.

Castro, J. F., I. Nouioui, V. Sangal, M. E. Trujillo, M. D. C. Montero-Calasanz, T. Rahmani, A. T. Bull, J. A. Asenjo, B. A. Andrews and M. Goodfellow (2018). "Geodermatophilus chilensis sp. nov., from soil of the Yungay core-region of the Atacama Desert, Chile." Syst Appl Microbiol **41**(5): 427-436.

Cerritos, R., L. E. Eguiarte, M. Avitia, J. Siefert, M. Travisano, A. Rodriguez-Verdugo and V. Souza (2011). "Diversity of culturable thermo-resistant aquatic bacteria along an environmental gradient in Cuatro Cienegas, Coahuila, Mexico." Antonie Van Leeuwenhoek **99**(2): 303-318.

Chakraborty, S. and T. Rahman (2012). "The difficulties in cancer treatment." Ecancermedicallscience **6**: ed16.

Chen, P.-Y., C.-H. Chen, C.-C. Kuo, T.-H. Lee, Y.-H. Kuo and C.-K. Lee (2011). Cytotoxic Steroidal Saponins from Agave sisalana.

Chen, P., L. Zhang, X. Guo, X. Dai, L. Liu, L. Xi, J. Wang, L. Song, Y. Wang, Y. Zhu, L. Huang and Y. Huang (2016). "Diversity, Biogeography, and Biodegradation

Potential of Actinobacteria in the Deep-Sea Sediments along the Southwest Indian Ridge." Front Microbiol **7**: 1340.

Cheng, H. R. and N. Jiang (2006). "Extremely rapid extraction of DNA from bacteria and yeasts." Biotechnol Lett **28**(1): 55-59.

Cibi, R. and A. Nair (2016). Evaluation of the Efficacy of the Compound Actinomycin D in Tumor Cell Lines.

Claverias, F. P., A. Undabarrena, M. Gonzalez, M. Seeger and B. Camara (2015). "Culturable diversity and antimicrobial activity of Actinobacteria from marine sediments in Valparaiso bay, Chile." Front Microbiol **6**: 737.

Clurman, B. and J. Roberts (1995). Cell Cycle and Cancer.

CONABIO. (2018). Retrieved 11/7/2018, from https://www.biodiversidad.gob.mx/planeta/internacional/protocolos_cbd.html.

Coolsaet, B., F. Batur, A. Broggiato, J. Pitseys and T. Dedeurwaerdere (2015). Implementing the Nagoya Protocol. Comparing Access and Benefit-Sharing Regimes in Europe.

Coombs, J. T. and C. M. Franco (2003). "Isolation and identification of actinobacteria from surface-sterilized wheat roots." Appl Environ Microbiol **69**(9): 5603-5608.

Corre, C. and G. L. Challis (2009). Corre, C. & Challis, G. L. New natural product biosynthetic chemistry discovered by genome mining. Nat Prod Rep. **26**, 977-986.

Cortés, C., S. R. Veiga, E. Almacellas, J. Hernández-Losa, J. Ferreres, S. C. Kozma, S. Ambrosio, G. Thomas and A. Tauler (2016). Effect of low doses of actinomycin D on neuroblastoma cell lines.

Cowell, J., S. Zimmerman, M. Marrela, P. Jiang, P. J. Houghton, M. J. LaBarre, D. Maneval, C. Thompson and X. Li (2016). Abstract 2463: PEGPH20 increases the anticancer activity of standard chemotherapy combinations, vincristine (VIN) and D actinomycin (DACT), in a Wilms' xenograft model.

Crnovcic, I., C. Rückert, S. Semsary, M. Lang, J. Kalinowski and U. Keller (2017). Genetic interrelations in the actinomycin biosynthetic gene clusters of Streptomyces antibioticus IMRU 3720 and Streptomyces chrysomallus ATCC11523, producers of actinomycin X and actinomycin C.

Cumsille, A., A. Undabarrena, V. Gonzalez, F. Claverias, C. Rojas and B. Camara (2017). "Biodiversity of Actinobacteria from the South Pacific and the Assessment of Streptomyces Chemical Diversity with Metabolic Profiling." Mar Drugs **15**(9).

D Wright, G. and H. Poinar (2012). Antibiotic Resistance is Ancient: Implications for Drug Discovery.

Davies, J. (2006). "Are antibiotics naturally antibiotics?" J Ind Microbiol Biotechnol **33**(7): 496-499.

De Anda, V., I. Zapata-Peñasco, L. Eguiarte and V. Souza (2018). Toward a Comprehensive Understanding of Environmental Perturbations in Microbial Mats from the Cuatro Ciénegas Basin by Network Inference: How to Survive in an Extremely Oligotrophic Site.

De Anda, V., I. Zapata-Peñasco, L. E. Eguiarte and V. Souza (2018). Toward a Comprehensive Understanding of Environmental Perturbations in Microbial Mats from the Cuatro Ciénegas Basin by Network Inference. Ecosystem Ecology and Geochemistry of Cuatro Ciénegas: How to Survive in an Extremely Oligotrophic Site. F. García-Oliva, J. Elser and V. Souza. Cham, Springer International Publishing: 85-97.

De Corte, D., A. Srivastava, M. Koski, J. Garcia, Y. Takaki, T. Yokokawa, T. Nunoura, N. Elisabeth, E. Sintes and G. Herndl (2017). Metagenomic insights into zooplankton-associated bacterial communities.

DeSantis, C. E., C. C. Lin, A. B. Mariotto, R. L. Siegel, K. D. Stein, J. L. Kramer, R. Alteri, A. S. Robbins and A. Jemal (2014). "Cancer treatment and survivorship statistics, 2014." CA Cancer J Clin **64**(4): 252-271.

Dhakal, D., A. Pokhrel, B. Shrestha and J. K. Sohng (2017). Marine Rare Actinobacteria: Isolation, Characterization, and Strategies for Harnessing Bioactive Compounds.

Dhakal, D., A. R. Pokhrel, B. Shrestha and J. K. Sohng (2017). "Marine Rare Actinobacteria: Isolation, Characterization, and Strategies for Harnessing Bioactive Compounds." Front Microbiol **8**: 1106.

Diao, Y.-Y., H. Li, Y.-H. Fu, M. Han, Y.-L. Hu, H.-L. Jiang, Y. Tsutsumi, Q.-C. Wei, D.-W. Chen and J.-Q. Gao (2011). Doxorubicin-loaded PEG-PCL copolymer micelles enhance cytotoxicity and intracellular accumulation of doxorubicin in adriamycin-resistant tumor cells.

E Olberding, K., X. Wang, Y. Zhu, J. Pan, S. Rai and C. Li (2010). Actinomycin D synergistically enhances the efficacy of the BH3 mimetic ABT-737 by downregulating Mcl-1 expression.

Ehrich, M. and L. Sharova (2001). "In vitro methods for detecting cytotoxicity." Curr Protoc Toxicol **Chapter 2**: Unit 2 6.

Encheva, M., M. Stoyanova, H. Avramova, Y. Pavlova, B. Gocheva, I. Ivanova and P. Moncheva (2014). Antibacterial potential of streptomycete strains from Antarctic soils.

Escalante, A. E., L. E. Eguiarte, L. Espinosa-Asuar, L. J. Forney, A. M. Noguez and V. Souza Saldivar (2008). "Diversity of aquatic prokaryotic communities in the Cuatro Ciénegas basin." FEMS Microbiol Ecol **65**(1): 50-60.

Euzeby, J. P. (2008). List of prokaryotic names with standing in nomenclature: A folder available on the Internet.

F. Thorn, C., C. Oshiro, S. Marsh, T. Hernandez-Boussard, H. McLeod, T. E. Klein and R. Altman (2011). Doxorubicin pathways: Pharmacodynamics and adverse effects.

Farris, M. H. and J. B. Olson (2007). "Detection of Actinobacteria cultivated from environmental samples reveals bias in universal primers." Lett Appl Microbiol **45**(4): 376-381.

Foster, J. and E. Katz (1981). Control of Actinomycin D Biosynthesis in Streptomyces parvullus: Regulation of Tryptophan Oxygenase Activity.

Galm, U., D. M. Hager, S. G Van Lanen, J. Ju, J. S Thorson and B. Shen (2005). Antitumor Antibiotics: Bleomycin, Enediynes, and Mitomycin.

Genilloud, O. (2017). Actinomycetes: Still a source of novel antibiotics.

Gerber, D. E. (2008). "Targeted therapies: a new generation of cancer treatments." Am Fam Physician **77**(3): 311-319.

Golinska, P., M. Wypij, G. Agarkar, S. Rathod, H. Dahm and M. Rai (2015). Endophytic actinobacteria of medicinal plants: Diversity and bioactivity.

Gomathi, A. and K. M. Gothandam (2016). Ocean Dwelling Actinobacteria as Source of Antitumor Compounds.

Gomez-Escribano, J. P. and M. J. Bibb (2011). "Engineering *Streptomyces coelicolor* for heterologous expression of secondary metabolite gene clusters." Microb Biotechnol **4**(2): 207-215.

Goodfellow, M., I. Nouioui, R. Sanderson, F. Xie and A. T. Bull (2018). "Rare taxa and dark microbial matter: novel bioactive actinobacteria abundant in Atacama Desert soils." Antonie Van Leeuwenhoek **111**(8): 1315-1332.

Guo, L., L. Fan, J. Ren, Z. Pang, Y. Ren, J. Li, Z. Wen, Y. Qian, L. Zhang, H. Ma and X. Jiang (2012). Combination of TRAIL and Actinomycin D liposomes enhances antitumor effect in non-small cell lung cancer.

Hamilton, T., R. C Young, W. M McKoy, K. R Grotzinger, J. Green, E. W Chu, J. Whang-Peng, A. M Rogan, W. R Green and R. F Ozols (1983). Characterization of a Human Ovarian Carcinoma Cell Line (NIH:OVCAR-3) with Androgen and Estrogen Receptors.

Hanahan, D. and R. Weinberg (2011). Hallmarks of Cancer: The Next Generation.

Hassan, S. and A. Lateef Shaikh (2017). Marine actinobacteria as a drug treasure house.

Hayakawa, M. (2008). Studies on the Isolation and Distribution of Rare Actinomycetes in Soil.

Hayakawa, M., T. Sadakata, T. Kajiura and H. Nonomura (1991). New methods for the highly selective isolation of Micromonospora and Microbispora from soil.

Hayakawa, M., Y. Yoshida and Y. Iimura (2004). Selection of bioactive soil actinomycetes belonging to the *Streptomyces violaceusniger* phenotype cluster.

Higgins, D. G. (1994). "CLUSTAL V: multiple alignment of DNA and protein sequences." Methods Mol Biol **25**: 307-318.

Himmler, T., D. Smrzka, J. Zwicker, S. Kasten, R. Shapiro, G. Bohrmann and J. Peckmann (2018). Stromatolites below the photic zone in the northern Arabian Sea formed by calcifying chemotrophic microbial mats.

Hirsch, F. R., G. V. Scagliotti, J. L. Mulshine, R. Kwon, W. J. Curran, Jr., Y. L. Wu and L. Paz-Ares (2017). "Lung cancer: current therapies and new targeted treatments." Lancet **389**(10066): 299-311.

Hoskisson, P. (2008). Streptomyces in Nature and Medicine: the Antibiotic Makers.

Hu, D., Y. Chen, C. Sun, T. Jin, G. Fan, Q. Liao, K. Meng Mok and M.-Y. Simon Lee (2018). Genome guided investigation of antibiotics producing actinomycetales strain isolated from a Macau mangrove ecosystem.

Istianto, Y., R. Setyo Adji Koesoemowidodo, Y. Watanabe, H. Pranamuda and B. Marwoto (2012). Application of Phenol Pretreatment for the Isolation of Rare Actinomycetes from Indonesian Soil.

J Steinherz, L., P. G Steinherz, C. T. C. Tan, G. Heller and M. L Murphy (1991). Cardiac toxicity 4 to 20 years after completing anthracycline therapy.

J. Hug, J., C. D. Bader, M. Remškar, K. Cirnski and R. Müller (2018). Concepts and Methods to Access Novel Antibiotics from Actinomycetes.

Jackson, S., L. Crossman, E. Almeida, L. Margassery, J. Kennedy and A. Dobson (2018). Diverse and Abundant Secondary Metabolism Biosynthetic Gene Clusters in the Genomes of Marine Sponge Derived *Streptomyces* spp. Isolates.

Jensen, P. R., E. Gontang, C. Mafnas, T. J. Mincer and W. Fenical (2005). "Culturable marine actinomycete diversity from tropical Pacific Ocean sediments." Environ Microbiol **7**(7): 1039-1048.

Jiang, Y., Y. Cao, L. Zhao, Q. Wang, R. Jin, W. He and Q. Xue (2010). "[Ultrasonic treatment of soil samples for actinomycete isolation]." Wei Sheng Wu Xue Bao **50**(8): 1094-1097.

Jiang, Y., Q. Li, X. Chen and C. Jiang (2016). Isolation and Cultivation Methods of Actinobacteria.

Jiang, Z. K., L. Tuo, D. L. Huang, I. A. Osterman, A. P. Tyurin, S. W. Liu, D. A. Lukyanov, P. V. Sergiev, O. A. Dontsova, V. A. Korshun, F. N. Li and C. H. Sun (2018). "Diversity, Novelty, and Antimicrobial Activity of Endophytic Actinobacteria From Mangrove Plants in Beilun Estuary National Nature Reserve of Guangxi, China." Front Microbiol **9**: 868.

Jinhua, Z. and Z. Liping (2011). Improvement of an Isolation Medium for Actinomycetes.

Jones, G. H. (2000). "Actinomycin production persists in a strain of *Streptomyces antibioticus* lacking phenoxazinone synthase." Antimicrob Agents Chemother **44**(5): 1322-1327.

Kamjam, M., P. Sivalingam, Z. Deng and K. Hong (2017). Deep Sea Actinomycetes and Their Secondary Metabolites.

Kannan, K., D. P. Sivaperumal, R. Rajaram and E. al (2018). Marine Actinobacteria as a source for Emerging Biopharmaceuticals.

Khan, S., H. Komaki, K. Motohashi, I. Kozone, A. Mukai, M. Takagi and K. Shin-ya (2011). Streptomyces associated with a marine sponge *Haliclona* sp.: biosynthetic genes for secondary metabolites and products.

Kieleczawa, J. (2006). "Fundamentals of sequencing of difficult templates--an overview." J Biomol Tech **17**(3): 207-217.

Kuang, W., J. Li, S. Zhang and L. Long (2015). "Diversity and distribution of Actinobacteria associated with reef coral *Porites lutea*." Front Microbiol **6**: 1094.

Kumar, R., K. Chaudhary, S. Gupta, H. Singh, S. Kumar, A. Gautam, P. Kapoor and G. Raghava (2013). CancerDR: Cancer Drug Resistance Database.

Kumar, S., G. Stecher and K. Tamura (2016). "MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets." Mol Biol Evol **33**(7): 1870-1874.

Labeda, D. P., C. A. Dunlap, X. Rong, Y. Huang, J. R. Doroghazi, K. S. Ju and W. W. Metcalf (2017). "Phylogenetic relationships in the family Streptomycetaceae using multi-locus sequence analysis." Antonie Van Leeuwenhoek **110**(4): 563-583.

Lee Ventola, C. (2015). The antibiotic resistance crisis: Part 1: Causes and threats.

Lewin, G., C. Carlos, M. G. Chevrette, H. A. Horn, B. R. McDonald, R. J. Stankey, B. Fox and C. R. Currie (2016). Evolution and Ecology of Actinobacteria and Their Bioenergy Applications.

Li, Q., X. Chen, Y. Jiang and C. Jiang (2016). Morphological Identification of Actinobacteria.

Liu, L., N. Salam, J. Y. Jiao, H. C. Jiang, E. M. Zhou, Y. R. Yin, H. Ming and W. J. Li (2016). "Diversity of Culturable Thermophilic Actinobacteria in Hot Springs in Tengchong, China and Studies of their Biosynthetic Gene Profiles." Microb Ecol **72**(1): 150-162.

Lok, C. (2015). "Mining the microbial dark matter." Nature **522**(7556): 270-273.

Longhi, A., S. Ferrari, G. Bacci and S. Specchia (2007). Long-term follow-up of patients with doxorubicin-induced cardiac toxicity after chemotherapy for osteosarcoma.

López-Lozano, N. E., S. Pajares, A. E. Escalante, L. E. Eguiarte, V. Souza and G. Olmedo-Álvarez (2018). Microcosms and Mesocosms: A Way to Test the Resilience of Microbial Communities in Cuatro Ciénegas. Cuatro Ciénegas Ecology, Natural History and Microbiology. V. Souza, G. Olmedo-Álvarez and L. E. Eguiarte. Cham, Springer International Publishing: 83-102.

Lu, D.-F., Y.-S. Wang, C. Li, G.-J. Wei, R. Chen, D.-M. Dong and M. Yao (2015). Actinomycin D inhibits cell proliferations and promotes apoptosis in osteosarcoma cells.

Ludwig, W., J. Euzéby, P. Schumann, H.-J. Busse, M. Trujillo, P. Kämpfer and W. Whitman (2012). Road map of the phylum Actinobacteria.

Luo, J., Y. Wang, S. Tang, J. Liang, W. Lin and L. Luo (2013). "Isolation and identification of algicidal compound from Streptomyces and algicidal mechanism to Microcystis aeruginosa." PLoS One **8**(10): e76444.

M Gulve, R. and A. M Deshmukh (2012). Antimicrobial activity of the marine actinomycetes.

Magiorakos, a.-p., A. Srinivasan, R. Carey, Y. Carmeli, M. E. Falagas, C. G. Giske, S. Harbarth, J. F. Hindler, G. Kahlmeter, B. Liljequist, D. L. Paterson, L. B. Rice, J. Stelling, M. Struelens, A. Vatopoulos, J. T. Weber and D. L. Monnet (2011). Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: An international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance.

Mahajan, G. and L. Balachandran (2012). Antibacterial Agents from Actinomycetes - A Review.

Mahmoud, H. M. and A. A. Kalendar (2016). "Coral-Associated Actinobacteria: Diversity, Abundance, and Biotechnological Potentials." Front Microbiol **7**: 204.

Manivasagan, P., K.-H. Kanga, K. Sivakumar, E. Li-Chan, H.-M. Oha and S.-K. Kima (2014). Marine actinobacteria: An important source of bioactive natural products.

Manivasagan, P., J. Venkatesan, K. Sivakumar and S. K. Kim (2014). "Pharmaceutically active secondary metabolites of marine actinobacteria." Microbiol Res **169**(4): 262-278.

Maskey, R. (2003). cuatrocienegas. el libro de los actinos. uanl.

McDermott, M., A. Eustace, S. Busschots, L. Breen, J. Crown, M. Clynes, N. O'Donovan and B. Stordal (2014). In vitro Development of Chemotherapy and Targeted Therapy Drug-Resistant Cancer Cell Lines: A Practical Guide with Case Studies.

Milne, I., D. Lindner, M. Bayer, D. Husmeier, G. McGuire, D. F. Marshall and F. Wright (2009). "TOPALi v2: a rich graphical interface for evolutionary analyses of multiple alignments on HPC clusters and multi-core desktops." Bioinformatics **25**(1): 126-127.

Mitra, S., U. Dixit, P. Ghosh and A. N. Maitra (2001). Tumor targeted delivery of encapsulated dextran-doxorubicin conjugate using chitosan nanoparticles as carrier.

Moreno-Letelier, A., V. Souza, M. Travisano, L. Alcaraz, G. Olmedo-Alvarez and L. Eguiarte (2018). The lost world of Cuatro Cienegas Basin, a relictual bacterial niche in a desert oasis.

Moreno-Letelier, A., V. Souza, M. Travisano, L. D. Alcaraz, G. Olmedo and L. E. Eguiarte (2018). "The lost world of Cuatro Cienegas Basin, a relictual bacterial niche in a desert oasis." bioRxiv.

Muller, W. and D. M. Crothers (1968). "Studies of the binding of actinomycin and related compounds to DNA." J Mol Biol **35**(2): 251-290.

Nah, H. J., H. R. Pyeon, S. H. Kang, S. S. Choi and E. S. Kim (2017). "Cloning and Heterologous Expression of a Large-sized Natural Product Biosynthetic Gene Cluster in *Streptomyces* Species." Front Microbiol **8**: 394.

Nanjwade, B., S. Chandrashekhara, P. S. Goudanavar, S. Mohammed and F. V. Manvi (2010). Production of Antibiotics from Soil-Isolated Actinomycetes and Evaluation of their Antimicrobial Activities.

Ng, Z. Y. and G. Yuan Annie Tan (2018). Selective isolation and characterisation of novel members of the family Nocardiopsaceae and other actinobacteria from a marine sediment of Tioman Island.

Nikodinovic, J., K. D. Barrow and J. A. Chuck (2003). "High yield preparation of genomic DNA from *Streptomyces*." Biotechniques **35**(5): 932-934, 936.

Niraula, N. P., S. H. Kim, J. K. Sohng and E. S. Kim (2010). "Biotechnological doxorubicin production: pathway and regulation engineering of strains for enhanced production." Appl Microbiol Biotechnol **87**(4): 1187-1194.

Noor Hidayati, D., Y. Lestari and B. Marwoto (2013). Characterization of *Micromonospora* spp. with Activity Against *E. coli* ATCC 35218 Resistance β -Lactam Antibiotics.

Ogawara, H. (2016). Self-resistance in *Streptomyces*, with Special Reference to β -Lactam Antibiotics.

Okoro, C. K., R. Brown, A. L. Jones, B. A. Andrews, J. A. Asenjo, M. Goodfellow and A. T. Bull (2009). "Diversity of culturable actinomycetes in hyper-arid soils of the Atacama Desert, Chile." Antonie Van Leeuwenhoek **95**(2): 121-133.

Owen, J., Z. Charlop-Powers, A. Smith, M. Ternei, P. Calle, B. Reddy, D. Montiel and S. F. Brady (2015). Multiplexed metagenome mining using short DNA sequence tags facilitates targeted discovery of epoxyketone proteasome inhibitors.

Pajares, S., G. Bonilla-Rosso, M. Travisano, L. E. Eguiarte and V. Souza (2012). "Mesocosms of aquatic bacterial communities from the Cuatro Ciénegas Basin (Mexico): a tool to test bacterial community response to environmental stress." Microb Ecol **64**(2): 346-358.

Pajares, S., L. E. Eguiarte, G. Bonilla-Rosso and V. Souza (2013). "Drastic changes in aquatic bacterial populations from the Cuatro Ciénegas Basin (Mexico) in response to long-term environmental stress." Antonie Van Leeuwenhoek **104**(6): 1159-1175.

Pajares, S., V. Souza and L. E. Eguiarte (2015). "Multivariate and phylogenetic analyses assessing the response of bacterial mat communities from an ancient oligotrophic aquatic ecosystem to different scenarios of long-term environmental disturbance." PLoS One **10**(3): e0119741.

Pambazuka, O. w. O. (2010). "Biopiracy, the intellectual property regime and livelihoods in Africa." Retrieved 11/7/2018, 2018, from <https://www.ritimo.org/Biopiracy-the-intellectual-property-regime-and-livelihoods-in-Africa>.

Paulus, C., Y. Rebets, B. Tokovenko, S. Nadmid, L. P. Terekhova, M. Myronovskiy, S. Zotchev, C. Rückert, S. Braig, S. Zahler, J. Kalinowski and A. Luzhetskyy (2017). New natural products identified by combined genomics-metabolomics profiling of marine *Streptomyces* sp. MP131-18.

Peimbert, M., L. Alcaraz, G. Bonilla-Rosso, G. Olmedo-Alvarez, F. García-Oliva, L. Segovia, L. Eguiarte and V. Souza (2012). Comparative Metagenomics of Two Microbial Mats at Cuatro Ciénegas Basin I: Ancient Lessons on How to Cope with an Environment Under Severe Nutrient Stress.

Perez-Gutierrez, R. A., V. Lopez-Ramirez, A. Islas, L. D. Alcaraz, I. Hernandez-Gonzalez, B. C. Olivera, M. Santillan, L. E. Eguiarte, V. Souza, M. Trivisano and G. Olmedo-Alvarez (2013). "Antagonism influences assembly of a Bacillus guild in a local community and is depicted as a food-chain network." *ISME J* **7**(3): 487-497.

Pesic, M., J. Z. Markovic, D. Jankovic, S. Kanazir, I. Markovic, L. Rakic and S. Ruzdijic (2006). Induced Resistance in the Human Non Small Cell Lung Carcinoma (NCI-H460) Cell Line In Vitro by Anticancer Drugs.

Praveen, V., C. Tripathi, V. Bihari and S. C. Srivastava (2008). Production of actinomycinD by the mutant of a new isolate of Streptomyces sindenensis.

Prieto-Davo, A., L. J. Villarreal-Gomez, S. Forschner-Dancause, A. T. Bull, J. E. Stach, D. C. Smith, D. C. Rowley and P. R. Jensen (2013). "Targeted search for actinomycetes from nearshore and deep-sea marine sediments." *FEMS Microbiol Ecol* **84**(3): 510-518.

Rabitz, F. (2015). Biopiracy after the Nagoya Protocol: Problem Structure, Regime Design and Implementation Challenges.

Radhakrishnan, M., V. Gopikrishnan, A. Suresh, S. Nagamiah, R. Balagurunathan and V. Kumar (2013). Characterization and phylogenetic analysis of antituberculous compound producing actinomycete strain D25 isolated from Thar Desert soil, Rajasthan.

Rajagopal, G. and S. Kannan (2018). Phylogenetic Diversity of Culturable Marine Actinobacteria Isolated from the Havelock Island, the Andamans, India.

Ranjan, R. and V. J. Jadeja (2016). Isolation of Actinomycetes: A Complete Approach.

Rebollar, E., M. Avitia, L. Eguiarte, A. González-González, L. Mora, G. Bonilla-Rosso and V. Souza (2012). Water-sediment niche differentiation in ancient marine lineages of Exiguobacterium endemic to the Cuatro Cienegas Basin.

Rebollar, E. A., M. Avitia, L. E. Eguiarte, A. Gonzalez-Gonzalez, L. Mora, G. Bonilla-Rosso and V. Souza (2012). "Water-sediment niche differentiation in ancient marine lineages of Exiguobacterium endemic to the Cuatro Cienegas Basin." *Environ Microbiol* **14**(9): 2323-2333.

Reitzel, L., P. Dalsgaard, I. Müller and C. Cornett (2012). Identification of ten new designer drugs by GC-MS, UPLC-QTOF-MS, and NMR as part of a police investigation of a Danish Internet company.

Reséndez, R. S. G. (2017). AISLAMIENTO DE ACTINOBACTERIAS DE CUATRO CIENEGAS, COAHUILA, E IDENTIFICACION DE CEPAS CON ACTIVIDAD CITOTOXICA EN LA LINEA CELULAR DE CANCER DE MAMA MCF-7. LICENCIATURA, UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

Rios, M. (2013). Six Case Studies in Latin America and the Caribbean: Access to Genetic Resources and Benefit Sharing.

Robertson, J., R. Barr, L. N Shulman, G. B Forte and N. Magrini (2016). Essential medicines for cancer: WHO recommendations and national priorities.

Robinson, D. (2014). Towards Access and Benefit-Sharing Best Practice Pacific Case Studies, University of New South Wales, Australia.

Rodriguez-Verdugo, A., V. Souza, L. E. Eguiarte and A. E. Escalante (2012). "Diversity across Seasons of Culturable *Pseudomonas* from a Desiccation Lagoon in Cuatro Ciénegas, Mexico." Int J Microbiol **2012**: 201389.

Ronquist, F., M. Teslenko, P. van der Mark, D. L. Ayres, A. Darling, S. Höhna, B. Larget, L. Liu, M. A. Suchard and J. P. Huelsenbeck (2012). "MrBayes 3.2: efficient Bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space." Syst Biol **61**(3): 539-542.

Rubert Nogueira-Libreto, D., M. Mitjans, M. Rosa Infante and M. Vinardell (2011). Comparative sensitivity of tumor and non-tumor cell lines as a reliable approach for in vitro cytotoxicity screening of lysine-based surfactants with potential pharmaceutical applications.

S Dome, J., N. Graf, J. Geller, C. Fernandez, E. A Mullen, F. Spreafico, M. Van den Heuvel-Eibrink and K. Pritchard-Jones (2015). Advances in Wilms Tumor Treatment and Biology: Progress Through International Collaboration.

S Edson, R. and T. Keys (1983). The aminoglycosides. Streptomycin, kanamycin, gentamicin, tobramycin, amikacin, netilmicin, sisomicin.

S.D. Tapykova, L. V. K., N.S. Agre (1969). "CYTOCHROMES IN SPORES OF ACTINOMYCETES." The Journal of General and Applied Microbiology **15**(3): 383-386.

Sadeghi-Aliabadi, H., M. Mozaffari, B. Behdadfar, M. Raesizadeh and S. H. Zarkesh-Esfahani (2013). Preparation and Cytotoxic Evaluation of Magnetite (Fe₃O₄) Nanoparticles on Breast Cancer Cells and its Combinatory Effects with Doxorubicin used in Hyperthermia.

Sakhare, S., G. G Rao, S. Mandape and S. Pratap (2014). Transcriptome profile of OVCAR3 cisplatin-resistant ovarian cancer cell line.

Sallstedt, T., S. Bengtson, C. Broman, P. Crill and D. E. Canfield (2018). Evidence of oxygenic phototrophy in ancient phosphatic stromatolites from the Paleoproterozoic Vindhyan and Aravalli Supergroups, India.

Santhanam, R., X. Rong, Y. Huang, B. A. Andrews, J. A. Asenjo and M. Goodfellow (2013). "Streptomyces bullii sp. nov., isolated from a hyper-arid Atacama Desert soil." Antonie Van Leeuwenhoek **103**(2): 367-373.

Sarmiento-Vizcaino, A., V. Gonzalez, A. F. Brana, J. J. Palacios, L. Otero, J. Fernandez, A. Molina, A. Kulik, F. Vazquez, J. L. Acuna, L. A. Garcia and G. Blanco (2017). "Pharmacological Potential of Phylogenetically Diverse Actinobacteria Isolated from Deep-Sea Coral Ecosystems of the Submarine Aviles Canyon in the Cantabrian Sea." Microb Ecol **73**(2): 338-352.

Schmid, I., C. Uittenbogaart and B. D Jamieson (2007). Live-cell assay for detection of apoptosis by dual-laser flow cytometry using Hoechst 33342 and 7-amino-actinomycin D.

Sebaugh, J. (2011). Guidelines for accurate EC50/IC50 estimation.

Sengupta, S., M. K. Chattopadhyay and H. P. Grossart (2013). "The multifaceted roles of antibiotics and antibiotic resistance in nature." Front Microbiol **4**: 47.

Shepherd, M. D., M. K. Kharel, M. A. Bosserman and J. Rohr (2010). "Laboratory maintenance of Streptomyces species." Curr Protoc Microbiol **Chapter 10**: Unit 10E 11.

Sheridan, C., G. Brumatti and S. Martin (2008). Oncogenic B-Raf V600E Inhibits Apoptosis and Promotes ERK-dependent Inactivation of Bad and Bim.

Shi, Y., C. Pan, B. N. Auckloo, X. Chen, C. A. Chen, K. Wang, X. Wu, Y. Ye and B. Wu (2017). "Stress-driven discovery of a cryptic antibiotic produced by *Streptomyces* sp. WU20 from Kueishantao hydrothermal vent with an integrated metabolomics strategy." Appl Microbiol Biotechnol **101**(4): 1395-1408.

Singh, B., V. K. Gupta and A. Passari (2018). New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering: Actinobacteria: Diversity and Biotechnological Applications.

Sirisha, B., R. Haritha, Y. S. Y. V. Mohan, S. Kandula and T. Ramana (2013). Bioactive compounds from marine actinomycetes isolated from the sediments of Bay of Bengal.

Skehan, P., R. Storeng, D. Scudiero, A. Monks, J. McMahon, D. Vistica, J. T. Warren, H. Bokesch, S. Kenney and M. R. Boyd (1990). "New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening." J Natl Cancer Inst **82**(13): 1107-1112.

Smith, D., M. Silva, J. Jackson and C. Lyal (2017). An explanation of the Nagoya Protocol and Access and Benefit Sharing, and its implication for microbiology.

Solecka, J., J. Ziemska, M. Postek and A. Rajnisz-Mateusiak (2012). Biologically active secondary metabolites from Actinomycetes.

Souza, V., L. Eguiarte, J. J. Elser, M. Trivisano and G. Olmedo-Alvarez (2018). A Microbial Saga: How to Study an Unexpected Hot Spot of Microbial Biodiversity from Scratch?: A Short Introduction to Bacterial Studies in Cuatro Ciénegas.

Souza, V., L. Eguiarte, J. Siefert and J. J. Elser (2008). Microbial endemism: Does phosphorus limitation enhance speciation?

Souza, V., L. Espinosa-Asuar, A. E. Escalante, L. E. Eguiarte, J. Farmer, L. Forney, L. Lloret, J. M. Rodriguez-Martinez, X. Soberon, R. Dirzo and J. J. Elser (2006). "An endangered oasis of aquatic microbial biodiversity in the Chihuahuan desert." Proc Natl Acad Sci U S A **103**(17): 6565-6570.

Springer, B., Y. G. Kidan, T. Prammananan, K. Ellrott, E. Böttger and P. Sander (2001). Mechanisms of Streptomycin Resistance: Selection of Mutations in the 16S rRNA Gene Conferring Resistance.

Srinivas, S. and F. S. Freiha (1999). Actinomycin D Revisited in Testicular Cancer. A Case Report.

Stach, J. E. and A. T. Bull (2005). "Estimating and comparing the diversity of marine actinobacteria." Antonie Van Leeuwenhoek **87**(1): 3-9.

Stach, J. E., L. A. Maldonado, A. C. Ward, M. Goodfellow and A. T. Bull (2003). "New primers for the class Actinobacteria: application to marine and terrestrial environments." Environ Microbiol **5**(10): 828-841.

Subramani, R. and W. Aalbersberg (2012). "Marine actinomycetes: an ongoing source of novel bioactive metabolites." Microbiol Res **167**(10): 571-580.

Sugawara, I., T. Iwahashi, K. Okamoto, Y. Sugimoto, H. Ekimoto, T. Tsuruo, T. Ikeuchi and S. Mori (1991). "Characterization of an etoposide-resistant human K562 cell line, K/eto." Jpn J Cancer Res **82**(9): 1035-1043.

T Bull, A. and J. E.M. Stach (2007). Marine actinobacteria: new opportunities for natural product search and discovery.

Takano, H., T. Nishiyama, S.-I. Amano, T. Beppu, M. Kobayashi and K. Ueda (2015). Streptomyces metabolites in divergent microbial interactions.

Tamargo, J. L. L. (2008). "ACUERDO POR EL QUE SE DAN A CONOCER LOS ESTUDIOS TECNICOS DEL ACUIFERO 0528

CUATROCIENEGAS Y SE MODIFICAN LOS LIMITES Y PLANOS DE LOCALIZACION QUE RESPECTO

DEL MISMO SE DIERON A CONOCER EN EL ACUERDO POR EL QUE SE DAN A CONOCER LOS

LIMITES DE 188 ACUIFEROS DE LOS ESTADOS UNIDOS MEXICANOS, LOS RESULTADOS DE LOS

ESTUDIOS REALIZADOS PARA DETERMINAR SU DISPONIBILIDAD MEDIA ANUAL DE AGUA Y SUS

PLANOS DE LOCALIZACION."

Teng, P.-n., G. Wang, B. Hood, K. A. Conrads, C. A. Hamilton, G. Maxwell, K. Darcy and T. Conrads (2013). Identification of candidate circulating cisplatin-resistant biomarkers from epithelial ovarian carcinoma cell secretomes.

Tiwari, K. and R. K Gupta (2011). Rare actinomycetes: A potential storehouse for novel antibiotics.

Trujillo, M. E., R. Riesco, P. Benito and L. Carro (2015). "Endophytic Actinobacteria and the Interaction of Micromonospora and Nitrogen Fixing Plants." Front Microbiol **6**: 1341.

Undabarrena, A., F. Beltrametti, F. P. Claverias, M. Gonzalez, E. R. Moore, M. Seeger and B. Camara (2016). "Exploring the Diversity and Antimicrobial Potential of Marine Actinobacteria from the Comau Fjord in Northern Patagonia, Chile." Front Microbiol **7**: 1135.

Urruticochea, A., R. Alemany, J. Balart, A. Villanueva, F. Vinals and G. Capella (2010). "Recent advances in cancer therapy: an overview." Curr Pharm Des **16**(1): 3-10.

Valliappan, K., W. Sun and Z.-Y. Li (2014). Marine actinobacteria associated with marine organisms and their potentials in producing pharmaceutical natural products. van Meerloo, J., G. J. Kaspers and J. Cloos (2011). "Cell sensitivity assays: the MTT assay." Methods Mol Biol **731**: 237-245.

Vartoukian, S., R. Palmer and W. G Wade (2010). Strategies for culture of 'Unculturable' bacteria.

Veal, G., J. Errington, J. Sludden, M. J Griffin, L. Price, A. Parry, J. Hale, A. Pearson and A. Boddy (2003). Determination of anti-cancer drug actinomycin D in human plasma by liquid chromatography-mass spectrometry.

Velez, P., J. Gasca-Pineda, E. Rosique-Gil, L. E. Eguiarte, L. Espinosa-Asuar and V. Souza (2016). "Microfungal oasis in an oligotrophic desert: diversity patterns and community structure in three freshwater systems of Cuatro Ciénegas, Mexico." PeerJ **4**: e2064.

Ventura, M., C. Canchaya, A. Tauch, G. Chandra, G. F. Fitzgerald, K. F. Chater and D. van Sinderen (2007). "Genomics of Actinobacteria: tracing the evolutionary history of an ancient phylum." Microbiol Mol Biol Rev **71**(3): 495-548.

Vijayakumar, R. (2015). Actinobacteria – a predominant source of antimicrobial compounds.

Vilchis-Marquez, C. (2017). AISLAMIENTO DE ACTINOBACTERIAS DE POZAS ROJAS Y POZA LA BECERRA DE CUATRO CIENEGAS, COAHUILA, Y EVALUACION DEL POTENCIAL ANTITUMORAL EN CELULAS DE CANCER DE PULMON H460. LICENCIATURA, UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

Vivas-Eugui, D. and M. Hartmut (2018). Marine genetic resources within national jurisdiction: flagging implications for access and benefit sharing and analysing patent trends. X. S. Carlos Correa, Springer.

von Wintersdorff, C., J. Penders, J. M. van Niekerk, N. Dominic Mills, S. Majumder, L. van Alphen, P. Savelkoul and P. Wolffs (2016). Dissemination of Antimicrobial Resistance in Microbial Ecosystems through Horizontal Gene Transfer.

Wainwright, M. (1991). Streptomycin: discovery and resultant controversy.

Wang, D., C. Wang, P. Gui, L. Haishan, S. Khalaf, E. Elsayed, M. A. M. Wadaan, W. Hozzein and W. Zhu (2017). Identification, Bioactivity, and Productivity of Actinomycins from the Marine-Derived Streptomyces heliomycini.

Wang, S., E. A. Konorev, S. Kotamraju, J. Joseph, S. Kalivendi and B. Kalyanaraman (2004). "Doxorubicin induces apoptosis in normal and tumor cells via distinctly different mechanisms. intermediacy of H(2)O(2)- and p53-dependent pathways." J Biol Chem **279**(24): 25535-25543.

Wang, X., X. Tian, Y. Wu, X. Shen, S. Yang and S. Chen (2018). Enhanced doxorubicin production by Streptomyces peucetius using a combination of classical strain mutation and medium optimization.

Ward, A. C. and N. Bora (2006). "Diversity and biogeography of marine actinobacteria." Curr Opin Microbiol **9**(3): 279-286.

Weber, T., K. Blin, S. Duddela, D. Krug, H. U. Kim, R. Brucoleri, S. Y. Lee, M. A. Fischbach, R. Muller, W. Wohlleben, R. Breitling, E. Takano and M. H. Medema (2015). "antiSMASH 3.0-a comprehensive resource for the genome mining of biosynthetic gene clusters." Nucleic Acids Res **43**(W1): W237-243.

WHO. (2018). "Global antimicrobial resistance surveillance system (GLASS) report." from <http://www.who.int/glass/resources/publications/early-implementation-report/en>.

Xu, Z.-Q., M. T. Flavin and D. A. Eiznhamer (2012). Macrolides and Ketolides.

Xuereb, J. and R. Blundell (2008). The Role of Cell Cycle Regulation in Cancer.

Yang, J., Q. Liang, M. Wang, C. Jeffries, D. Smithson, Y. Tu, N. Boulos, M. Jacob, A. Shelat, Y. wu, R. R. Ravu, R. Gilbertson, M. Avery, I. A Khan, L. Walker, K. Guy and X.-C. Li (2014). UPLC-MS-ELSD-PDA as a Powerful Dereplication Tool to Facilitate Compound Identification from Small-Molecule Natural Product Libraries.

Yoon, J. H., S. T. Lee, S. B. Kim, M. Goodfellow and Y. H. Park (1997). "Inter- and intraspecific genetic analysis of the genus Saccharomonospora with 16S to 23S ribosomal DNA (rDNA) and 23S to 5S rDNA internally transcribed spacer sequences." Int J Syst Bacteriol **47**(3): 661-669.

Yuan, M., Y. Yu, H.-R. Li, N. Dong and X.-H. Zhang (2014). Phylogenetic Diversity and Biological Activity of Actinobacteria Isolated from the Chukchi Shelf Marine Sediments in the Arctic Ocean.

12. RESUMEN BIBLIOGRÁFICO

Héctor Fernando Arocha Garza

Candidato para el Grado de

Doctor en Ciencias con Orientación en Biotecnología

Tesis: DIVERSIDAD Y BIOPROSPECCIÓN DE ACTINOBACTERIAS DE CUATRO CIÉNEGAS, COAHUILA CON POTENCIAL FARMACÉUTICO

Campo de Estudio: Biotecnología

Datos Personales: Nacido en Monclova, Coahuila el 14 de Julio de 1987, hijo del Ing. Héctor Fernando Arocha Gonzalez y Q.F.B. Zarina Garza Zertuche.

Educación: Egresado de la Universidad Autónoma de Nuevo León, grado obtenido: Licenciado en Biotecnología Genómica.

Asesor externo tesis de licenciatura: Aislamiento de actinomicetos de Cuatro Ciénegas, Coahuila e identificación de cepas con actividad citotóxica en la línea celular de cáncer de mama MCF-7. Por: Rosa Selenia Guerra Resendez. (Agosto 2017)

Asesor externo tesis de licenciatura: Aislamiento de actinobacterias de pozas rojas y poza becerra de Cuatro Ciénegas, Coahuila, y evaluación del potencial antitumoral en células de cáncer de pulmón H460. Por: Cristóbal Vilchis Márquez (Agosto 2017).

Suplente tesis de licenciatura: Estudio de dos cepas de *Streptomyces* provenientes de Cuatro Ciénegas, Coahuila, para la identificación de compuestos bioactivos. Por: María Mercedes Cortes Gonzalez. (Julio 2018).

Premio investigación UANL 2018 categoría Ciencias Naturales. Trabajo: “Bioprospección de Actinobacterias de Cuatro Ciénegas, Coahuila”.



High diversity and suggested endemism of culturable Actinobacteria in an extremely oligotrophic desert oasis

Hector Fernando Arocha-Garza¹, Ricardo Canales-Del Castillo², Luis E. Eguiarte³, Valeria Souza³ and Susana De la Torre-Zavala¹

¹ Facultad de Ciencias Biológicas, Instituto de Biotecnología, Universidad Autónoma de Nuevo León, San Nicolás de los Garza, Nuevo León, Mexico

² Facultad de Ciencias Biológicas, Laboratorio de Biología de la Conservación, Universidad Autónoma de Nuevo León, San Nicolás de los Garza, Nuevo León, Mexico

³ Departamento de Ecología Evolutiva, Instituto de Ecología, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico City, Mexico

ABSTRACT

The phylum Actinobacteria constitutes one of the largest and anciently divergent phyla within the Bacteria domain. Actinobacterial diversity has been thoroughly researched in various environments due to its unique biotechnological potential. Such studies have focused mostly on soil communities, but more recently marine and extreme environments have also been explored, finding rare taxa and demonstrating dispersal limitation and biogeographic patterns for Streptomyces. To test the distribution of Actinobacteria populations on a small scale, we chose the extremely oligotrophic and biodiverse Cuatro Ciénegas Basin (CCB), an endangered oasis in the Chihuahuan desert to assess the diversity and uniqueness of Actinobacteria in the Churince System with a culture-dependent approach over a period of three years, using nine selective media. The 16S rDNA of putative Actinobacteria were sequenced using both bacteria universal and phylum-specific primer pairs. Phylogenetic reconstructions were performed to analyze OTUs clustering and taxonomic identification of the isolates in an evolutionary context, using validated type species of *Streptomyces* from previously phylogenies as a reference. Rarefaction analysis for total Actinobacteria and for *Streptomyces* isolates were performed to estimate species' richness in the intermediate lagoon (IL) in the oligotrophic Churince system. A total of 350 morphologically and nutritionally diverse isolates were successfully cultured and characterized as members of the Phylum Actinobacteria. A total of 105 from the total isolates were successfully subcultured, processed for DNA extraction and 16S-rDNA sequenced. All strains belong to the order Actinomycetales, encompassing 11 genera of Actinobacteria; the genus *Streptomyces* was found to be the most abundant taxa in all the media tested throughout the 3-year sampling period. Phylogenetic analysis of our isolates and another 667 reference strains of the family Streptomycetaceae shows that our isolation effort produced 38 unique OTUs in six new monophyletic clades. This high biodiversity and uniqueness of Actinobacteria in an extreme oligotrophic environment, which has previously been reported for its diversity and endemism, is a suggestive sign of microbial biogeography of Actinobacteria and it also represents an invaluable source of biological material for future ecological and bioprospecting studies.

Submitted 23 December 2016

Accepted 29 March 2017

Published 2 May 2017

Corresponding author
Susana De la Torre-Zavala,
susana.delatorrez@uanl.edu.mx

Academic editor
Matt Hutchings

Additional Information and
Declarations can be found on
page 14

DOI 10.7717/peerj.3247

© Copyright
2017 Arocha-Garza et al.

Distributed under
Creative Commons CC-BY 4.0

Chapter 9 Bioprospecting in Cuatro Ciénegas: A Set of Open Possibilities to Save the Ecosystem



Héctor Arocha-Garza, Hamlet Avilés-Arnaut, Nahui Olín Medina-Chávez,
Mario Figueroa, Valeria Souza, and Susana De la Torre-Zavala

Abstract The unique and untapped microbiological diversity of the Cuatro Ciénegas Basin needs to be saved from the overexploitation of the aquifer by unsustainable agricultural practices. Considering the great value of the biodiversity enclosed in this valley, as a group we decided to change the future of the area, to start evolving from a poor agricultural site, to a future biotech hub, where high school students would be the “first to open the treasure box” of the biotechnological potential. By following the Nagoya treaty, we can create value for their biodiversity and return to their community the necessary resources for education and sustainable development to alleviate poverty. But before setting students into the search, we needed to see if the dream was possible. We all knew that *Actinobacteria* were the obvious first suspect due to the large diversity of secondary metabolites that this lineage of bacteria has been reported to produce. Through our research, we have found an enormous “hidden potential,” solutions that range from new antibiotics, antifungals, cancer antagonists, energy potential by degrading cellulose, and sustainable agriculture possibilities with probiotics plus a series of untapped possibilities in methanogens and halophilic Archaea. This is just the beginning of a children-driven revolution. We hope that this potential is channeled to a better society, to a university in the local town where the biotech potential is directly explored and exploited by the owners of the land.

H. Arocha-Garza · H. Avilés-Arnaut · N. O. Medina-Chávez · S. De la Torre-Zavala (✉)
Facultad de Ciencias Biológicas, Instituto de Biotecnología, Universidad Autónoma de Nuevo
León, San Nicolás de los Garza, Nuevo León, Mexico
e-mail: susana.delatorrezv@uanl.edu.mx

M. Figueroa
Departamento de Farmacia, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de
México, Ciudad de México, Mexico

V. Souza
Departamento de Ecología Evolutiva, Instituto de Ecología, Universidad Nacional Autónoma
de México, Coyula, Mexico

© Springer International Publishing AG, part of Springer Nature 2018
V. Souza et al. (eds.), *Cuatro Ciénegas Ecology, Natural History and
Microbiology*, Cuatro Ciénegas Basin: An Endangered Hyperdiverse Oasis,
https://doi.org/10.1007/978-3-319-93423-5_9

113

ANEXO 1

No aislado	Poza	Punto Muestreo	Medio cultivo	Pretratamiento	Fecha
160	LI	C	AIM2	N/A	Oct-14
161	LI	A	AIM2	N/A	Oct-14
162	LI	C	AIM2	N/A	Oct-14
163	LI	C	AIM2	N/A	Oct-14
164	LI	B	AIM2	N/A	Oct-14
165	LI	A	AIM2	N/A	Oct-14
166	LI	D	AIM2	N/A	Oct-14
167	LI	B	AIM2	N/A	Oct-14
168	LI	A	AIM2	N/A	Oct-14
169	LI	F	AIM3	N/A	Oct-14
170	LI	F	AIM2	N/A	Oct-14
171	LI	E	AIM2	N/A	Oct-14
179	AN	N/A	AIM2	N/A	Ene-15
180	AN	N/A	AIM3	N/A	Ene-15
182	AN	N/A	AIM4	N/A	Ene-15
183	AN	N/A	AIM3	N/A	Ene-15
184	AN	N/A	AIM3	N/A	Ene-15
185	LI	A	AIM2	N/A	Oct-14
186	LI	F	AIM2	N/A	Ene-15
187	LI	C	AIM4	N/A	Ene-15
188	LI	A	AIM7	N/A	Ene-15
189	LI	C	AIM3	N/A	Ene-15
190	LI	A	AIM7	N/A	Ene-15
191	LI	B	AIM4	N/A	Ene-15
192	LI	E	AIM4	N/A	Ene-15
193	LI	B	AIM4	N/A	Ene-15
194	LI	C	AIM2	N/A	Ene-15
195	LI	C	AIM2	N/A	Ene-15
196	LI	E	AIM4	N/A	Feb-15
197	LI	C	AIM4	N/A	Feb-15
198	LI	F	AIM2	N/A	Feb-15
199	LI	B	AIM2	N/A	Feb-15
200	LI	A	AIM2	N/A	Feb-15
201	LI	A	AIM2	N/A	Feb-15

No aislado	Poza	Punto Muestreo	Medio cultivo	Pretratamiento	Fecha
202	LI	C	AIM2	N/A	Feb-15
203	LI	F	AIM2	N/A	Feb-15
204	LI	D	AIM2	N/A	Feb-15
205	LI	C	AIM2	N/A	Feb-15
206	LI	E	AIM4	N/A	Feb-15
207	LI	C	AIM2	N/A	Feb-15
208	LI	E	AIM4	N/A	Feb-15
209	LI	E	AIM2	N/A	Feb-15
210	MJ	N/A	AIM2	N/A	Feb-15
211	LI	E	AIM2	N/A	Feb-15
212	MJ	N/A	AIM2	N/A	Feb-15
213	MJ	N/A	AIM2	N/A	Feb-15
214	MJ	N/A	AIM2	N/A	Feb-15
215	MJ	N/A	AIM3	N/A	Feb-15
217	MJ	N/A	AIM4	N/A	Feb-15
220	MJ	N/A	AIM2	N/A	Feb-15
221	LI	C	AIM3	N/A	Feb-15
222	LI	B	AIM3	N/A	Feb-15
223	LI	C	AIM3	N/A	Feb-15
224	LI	C	AIM3	N/A	Feb-15
230	LI	C	AIM2	N/A	Feb-15
231	LI	A	AIM2	N/A	Feb-15
232	LI	A	AIM7	N/A	Feb-15
233	LI	B	AIM4	N/A	Feb-15
234	LI	E	AIM4	N/A	Feb-15
235	LI	B	AIM4	N/A	Feb-15
236	LI	A	AIM4	N/A	Feb-15
237	LI	A	AIM3	N/A	Feb-15
238	MJ	N/A	AIM2	N/A	Feb-15
400	LI	C	AIM3	N/A	Feb-15
401	LI	D	AIM2	N/A	Feb-15
403	LI	D	AIM2	N/A	Feb-15
406	LI	E	AIM3	N/A	Feb-15
407	LI	F	AIM4	N/A	Feb-15
408	MJ	N/A	AIM2	N/A	Feb-15
409	LI	C	AIM2	N/A	Feb-15
410	LI	A	AIM2	N/A	Feb-15
440	LI	A	AIM2	N/A	Feb-15

No aislado	Poza	Punto Muestreo	Medio cultivo	Pretratamiento	Fecha
500	LI	A	AIM7	N/A	Feb-15
501	LI	C	AIM7	N/A	Feb-15
506	LI	D	AIM2	N/A	Feb-15
507	LI	C	AIM2	N/A	Feb-15
510	AN	N/A	AIM2	N/A	Feb-15
511	AN	N/A	AIM2	N/A	Feb-15
512	AN	N/A	AIM7	N/A	Feb-15
513	MJ	N/A	AIM7	N/A	Feb-15
514	AN	N/A	AIM2	N/A	Feb-15
516	LI	B	AIM2	N/A	Feb-15
517	AN	N/A	AIM7	N/A	Feb-15
518	AN	N/A	AIM2	N/A	Feb-15
519	AN	N/A	AIM7	N/A	Feb-15
530	LI	C	AIM2	N/A	Feb-15
561	PR	N/A	AIM2	N/A	Feb-15
562	AN	N/A	AIM2	N/A	Jul-15
563	LI	C	AIM3	N/A	Feb-15
564	LI	C	AIM3	N/A	Feb-15
565	LI	A	AIM7	N/A	Feb-15
566	LI	A	AIM2	N/A	Feb-15
567	LI	E	AIM4	N/A	Feb-15
568	PR	N/A	AIM2	N/A	Jul-15
570	PR	N/A	AIM2	N/A	Jul-15
571	PR	N/A	AIM2	N/A	Jul-15
572	PR	N/A	AIM2	N/A	Jul-15
573	PR	N/A	AIM2	N/A	Jul-15
574	PR	N/A	AIM2	N/A	Jul-15
575	LI	A	AIM2	N/A	Jul-15
576	LI	C	AIM2	N/A	Jul-15
577	LI	C	AIM2	N/A	Jul-15
578	LI	A	AIM7	N/A	Jul-15
579	LI	C	AIM3	N/A	Jul-15
580	LI	B	AIM3	N/A	Jul-15
581	LI	A	AIM2	N/A	Jul-15
582	PR	N/A	AIM2	N/A	Jul-15
583	MJ	N/A	AIM4	N/A	Jul-15
584	MJ	N/A	AIM3	N/A	Jul-15
585	LI	A	AIM7	N/A	Jul-15

No aislado	Poza	Punto Muestreo	Medio cultivo	Pretratamiento	Fecha
586	PR	N/A	AIM4	N/A	Jul-15
587	PR	N/A	AIM4	N/A	Jul-15
588	MJ	N/A	AIM3	N/A	Jul-15
589	PR	N/A	AIM2	N/A	Jul-15
590	MJ	N/A	AIM3	N/A	Jul-15
591	MJ	N/A	AIM3	N/A	Jul-15
592	MJ	N/A	AIM2	N/A	Jul-15
593	LI	C	AIM2	N/A	Jul-15
594	PR	N/A	AIM2	N/A	Jul-15
595	LI	C	AIM4	N/A	Jul-15
596	LI	C	AIM2	N/A	Jul-15
601	LI	E	AIM2	N/A	Jul-15
602	LI	E	AIM6	PtH	Abr-16
603	LI	D	AIM6	PtH	Abr-16
604	LI	D	AIM5	PtB	Abr-16
605	LI	D	AIM2	PtH	Abr-16
606	LI	C	AIM5	PtH	Abr-16
607	LI	D	AIM3	PtH	Abr-16
608	LI	D	AIM5	PtB	Abr-16
609	PA	N/A	AIM3	PtH	Abr-16
610	LI	A	AIM3	PtB	Abr-16
611	PA	N/A	AIM3	PtH	Abr-16
612	LI	D	AIM3	PtH	Abr-16
613	LI	D	AIM3	PtH	Abr-16
614	LI	B	AIM3	PtB	Abr-16
615	LI	E	AIM5	PtH	Abr-16
616	PA	N/A	AIM3	PtH	Abr-16
617	LI	D	AIM3	PtH	Abr-16
618	LI	D	AIM3	PtB	Abr-16
619	LI	D	AIM3	PtH	Abr-16
620	LI	D	AIM3	PtB	Abr-16
621	LI	A	AIM3	PtH	Abr-16
622	LI	D	AIM2	PtH	Abr-16
623	PAQ	N/A	AIM2	PtA	Abr-16
624	LI	C	AIM3	PtH	Abr-16
625	PAQ	N/A	AIM3	PtD	Abr-16
626	LI	B	AIM3	PtB	Abr-16
627	LI	E	AIM2	PtH	Abr-16

No aislado	Poza	Punto Muestreo	Medio cultivo	Pretratamiento	Fecha
628	LI	D	AIM3	PtH	Abr-16
629	PAQ	N/A	AIM3	PtD	Abr-16
630	LI	D	AIM3	PtH	Abr-16
631	PA	N/A	AIM6	PtA	Abr-16
632	PA	N/A	AIM4	PtA	Abr-16
633	PA	N/A	AIM4	PtG	Abr-16
634	LI	D	AIM2	PtH	Abr-16
635	PA	N/A	AIM3	PtH	Abr-16
636	LI	B	AIM3	PtH	Abr-16
637	PA	N/A	AIM4	PtI	Abr-16
638	PA	N/A	AIM5	PtA	Abr-16
639	PAQ	N/A	AIM4	PtE	Abr-16
640	PA	N/A	AIM4	PtE	Abr-16
641	LI	B	AIM9	PtA	Abr-16
645	LI	E	AIM2	PtH	Abr-16
646	LI	A	AIM2	PtH	Abr-16
647	LI	D	AIM5	PtB	Abr-16
648	LI	C	AIM3	PtH	Abr-16
649	LI	E	AIM3	PtH	Abr-16
650	PA	N/A	AIM4	PtE	Abr-16
651	PA	N/A	AIM4	PtA	Abr-16
653	LI	D	AIM3	PtH	Abr-16
654	LI	D	AIM3	PtH	Abr-16
655	LI	D	AIM6	PtC	Abr-16
656	LI	A	AIM5	PtB	Abr-16
657	LI	B	AIM5	PtH	Abr-16
658	LI	A	AIM5	PtB	Abr-16
659	LI	A	AIM3	PtB	Abr-16
660	PR	N/A	AIM2	N/A	Oct-16
661	LI	A	AIM2	PtH	Abr-16
662	LI	B	AIM2	PtH	Abr-16
663	LI	C	AIM2	PtH	Abr-16
664	LI	a	AIM2	PtH	Abr-16
665	LI	C	AIM3	PtH	Abr-16
666	LI	C	AIM2	PtH	Abr-16
667	LI	B	AIM6	PtH	Abr-16
668	PA	N/A	AIM6	PtI	Abr-16
669	LI	E	AIM6	PtH	Abr-16

No aislado	Poza	Punto Muestreo	Medio cultivo	Pretratamiento	Fecha
670	PA	N/A	AIM6	PtF	Abr-16
671	LI	D	AIM3	PtH	Abr-16
672	LI	D	AIM5	PtH	Abr-16
673	LI	D	AIM3	PtB	Abr-16
674	PA	N/A	AIM6	PtB	Abr-16
675	PA	N/A	AIM3	PtH	Abr-16
676	LI	A	AIM5	PtB	Abr-16
677	LI	D	AIM9	PtH	Abr-16
678	LI	D	AIM5	PtH	Abr-16
679	PA	N/A	AIM6	PtB	Abr-16
680	PA	N/A	AIM3	PtE	Abr-16
681	PAQ	N/A	AIM6	PtF	Abr-16
683	PA	N/A	AIM6	PtH	Abr-16
684	PA	N/A	AIM3	PtD	Abr-16
685	LI	a	AIM2	PtA	Abr-16
686	PAQ	N/A	AIM6	PtH	Abr-16
687	PAQ	N/A	AIM3	PtB	Abr-16
688	LI	A	AIM2	PtH	Abr-16
689	LI	E	AIM6	PtH	Abr-16
690	AN	A	AIM6	PtH	Ene-15
691	LI	D	AIM5	PtH	Abr-16
692	PAQ	N/A	AIM3	PtI	Abr-16
693	PAQ	N/A	AIM6	PtH	Abr-16
694	PA	N/A	AIM4	PtE	Abr-16
695	LI	c	AIM3	PtA	Abr-16
696	LI	E	AIM9	PtC	Abr-16
697	PA	N/A	AIM6	PtI	Abr-16
698	AN	E	AIM3	PtH	Ene-15
699	AN	E	AIM6	PtH	Ene-15
700	AN	D	AIM3	PtH	Ene-15
701	AN	E	AIM9	PtH	Ene-15
702	AN	E	AIM5	PtH	Ene-15
703	PA	N/A	AIM6	PtF	Abr-16
704	AN	E	AIM6	PtH	Ene-15
705	PA	N/A	AIM2	PtA	Abr-16
706	PA	N/A	AIM6	PtF	Abr-16
707	MJ	N/A	AIM3	PtH	Oct-16
708	PR	N/A	AIM5	N/A	Oct-16

No aislado	Poza	Punto Muestreo	Medio cultivo	Pretratamiento	Fecha
709	MJ	N/A	AIM6	N/A	Oct-16
710	PR	N/A	AIM3	N/A	Oct-16
711	PB	N/A	AIM5	N/A	Oct-16
712	MJ	N/A	AIM6	N/A	Oct-16
713	PB	N/A	AIM5	N/A	Oct-16
714	PB	N/A	AIM5	N/A	Oct-16
715	MJ	N/A	AIM6	N/A	Oct-16
716	MJ	N/A	AIM4	N/A	Oct-16
717	PB	N/A	AIM5	N/A	Oct-16
718	PR	N/A	AIM6	N/A	Oct-16
719	PR	N/A	AIM5	N/A	Oct-16
720	MJ	N/A	AIM5	N/A	Oct-16
721	MJ	N/A	AIM5	N/A	Oct-16
722	PR	N/A	AIM5	N/A	Oct-16
723	PR	N/A	AIM5	N/A	Oct-16
724	PB	N/A	AIM2	N/A	Oct-16
725	MJ	N/A	AIM6	N/A	Oct-16
726	MJ	N/A	AIM6	N/A	Oct-16
727	PR	N/A	AIM6	N/A	Oct-16
728	PB	N/A	AIM5	N/A	Oct-16
729	PR	N/A	AIM5	N/A	Oct-16
730	MJ	N/A	AIM6	N/A	Oct-16
731	MJ	N/A	AIM4	N/A	Oct-16
732	PB	N/A	AIM2	N/A	Oct-16
733	MJ	N/A	AIM5	N/A	Oct-16
734	MJ	N/A	AIM5	N/A	Oct-16
735	MJ	N/A	AIM4	PtI	Oct-16
736	PR	N/A	AIM3	N/A	Oct-16
737	PB	N/A	AIM4	N/A	Oct-16
738	PB	N/A	AIM5	N/A	Oct-16
739	MJ	N/A	AIM4	N/A	Oct-16
741	PB	N/A	AIM2	N/A	Oct-16

ANEXO 2

Tabla 17. Porcentajes de identidad y afiliación mediante la secuenciación del gen 16S ARNr de las actinobacterias de CC.

Aislado	Lugar aislamiento	Punto Muestreo	No Acceso	Tamaño (Pb)	Cepa	No Acceso	Porcentaje identidad	Lugar aislamiento
160	LI	C	KY436759	1349	<i>Streptomyces bacillaris</i>	KP718510	100	Sedimento marino mar amarillo
163	LI	C	KY436761	1339	<i>Streptomyces bacillaris</i>	KP718510	99	Sedimentos de manglar de Tailandia
164	LI	B	KY435370	1312	<i>Nocardiopsis sp.</i>	KC856806	99	Ascidias marinas
169	LI	F	KY436828	1257	<i>Streptomyces sp.</i>	KM678018	99	Sedimentos de manglar de Tailandia
171	LI	E	KY436897	504	<i>Streptomyces sp.</i>	KM678018	99	Sedimento de manglar
172	AN	-	-	-	<i>Streptomyces sampsonii</i>	NR_025870.2	99	Suelo agrícola
173	AN	-	-	-	<i>Streptomyces smyrnaeus</i>	<u>NR_134201.1</u>	99	Lago saldo
175	AN	-	-	-	<i>Streptomyces oryzae</i>	<u>NR_146025.1</u>	99	Planta de arroz
178	AN	-	-	-	<i>Streptomyces litmocidini</i>	<u>NR_116096.1</u>	100	-
179	AN	-	-	-	<i>Streptomyces fabae</i>	<u>NR_145617.1</u>	100	Rizosfera
180	AN	-	-	-	<i>Glycomyces endophyticus</i>	<u>NR_044432.1</u>	100	Rizosfera
183	AN	-	-	-	<i>Streptomyces specialis</i>	<u>NR_042689.1</u>	98	-

Aislado	Lugar aislamiento	Punto Muestreo	No Acceso	Tamaño (Pb)	Cepa	No Acceso	Porcentaje identidad	Lugar aislamiento
185	LI	E	KY436896	311	<i>Streptomyces sp.</i>	KU681239	99	Suelo salino- alcalino
186	LI	F	KY436829	1346	<i>Streptomyces pactum</i>	CP016795	100	-
187	LI	C	KY327799	1302	<i>Micrococcus sp.</i>	KX289492	100	Suelo
189	LI	C	KY436900	584	<i>Streptomyces sp.</i>	KU173818	99	Sedimento marino
190	LI	A	KY436901	714	<i>Streptomyces sp.</i>	JF950284	100	Sedimento marino
192	LI	E	KY435442	1397	<i>Nocardiopsis sp.</i>	KM886159	99	Esponjas marinas
193	LI	B	KY436902	1351	<i>Streptomyces sp.</i>	AB841031	99	Rizosfera de arroz
194	LI	C	KY440400	1450	<i>Streptomyces bacillaris</i>	KP718510	99	Sedimento marino mar Amarillo
195	LI	C	KY440399	1089	<i>Streptomyces sp.</i>	DQ448731	99	Sedimento marino
196	LI	E	KY440748	571	<i>Streptomyces sp.</i>	KM678018	99	Sedimento de manglar
197	LI	C	KY440747	1337	<i>Streptomyces bacillaris</i>	KP718510	100	Sedimento marino mar amarillo
198	LI	F	KY434635	1306	<i>Kocuria rhizophila</i>	KT387335	99	Efluente de mariscos
199	LI	B	KY434186	1314	<i>Arthrobacter sp.</i>	KJ679354	99	Suelo salino
200	LI	A	KY435441	723	<i>Nocardiopsis sp.</i>	KF543081	100	Agua salada
201	LI	A	KY440957	1371	<i>Streptomyces sp.</i>	AB841031	99	Rizosfera de arroz

Aislado	Lugar aislamiento	Punto Muestreo	No Acceso	Tamaño (Pb)	Cepa	No Acceso	Porcentaje identidad	Lugar aislamiento
203	LI	F	KY441103	577	<i>Streptomyces cavourensis</i>	KX013537	99	Planta medicinal
204	LI	D	KY435443	1320	<i>Nocardiopsis sp.</i>	EU384273	99	Suelo
207	LI	C	KY441411	1358	<i>Streptomyces sp.</i>	KM678018	99	Sedimento de manglar en Tailandia
208	LI	E	KY435453	1383	<i>Nocardiopsis sp.</i>	KM886159	99	Mar sur de China
209	LI	E	KY441440	1099	<i>Streptomyces sp.</i>	KY015003	100	Esponjas marinas
212	MJ	-	-	-	<i>Streptomyces thermolilacinus</i>	<u>NR_125444.1</u>	99	-
213	MJ	-	-	-	<i>Streptomyces bacillaris</i>	<u>NR_041146.1</u>	100	-
214	MJ	-	-	-	<i>Streptomyces olivaceus</i>	<u>NR_112581.1</u>	100	-
215	MJ	-	-	-	<i>Modestobacter roseus</i>	<u>NR_109643.1</u>	99	Raíz de la planta halófito salicornia
217	MJ	-	-	-	<i>Glycomyces phytohabitans</i>	<u>NR_109641.1</u>	98	Costa halófito Jiangsu
221	LI	C	KY435834	1314	<i>Nocardiopsis sp.</i>	KM886159	99	Esponjas marinas
223	LI	C	KY435836	1339	<i>Nocardiopsis sp.</i>	KM886159	100	Esponjas marinas
230	LI	C	KY441439	623	<i>Streptomyces sp.</i>	JF950272	99	Sedimento marino

Aislado	Lugar aislamiento	Punto Muestreo	No Acceso	Tamaño (Pb)	Cepa	No Acceso	Porcentaje identidad	Lugar aislamiento
232	LI	A	KY435504	1320	<i>Nocardiopsis dassonvillei</i>	KC493994	99	Rio Amarillo región Delta
233	LI	B	KY434326	1260	<i>Glycomyces sp.</i>	JQ819254	99	Costa halófito
235	LI	B	KY441441	902	<i>Streptomyces sp.</i>	KY015026	99	Esponjas marinas
236	LI	A	KY435833	1314	<i>Nocardiopsis sp.</i>	KM886159	99	Esponjas marinas
237	LI	A	KY435835	1300	<i>Nocardiopsis sp.</i>	KM886159	100	Esponjas marinas
401	LI	D	KY435832	1314	<i>Nocardiopsis sp.</i>	KM886159	99	Esponjas marinas
403	LI	D	KY441444	1336	<i>Streptomyces pactum</i>	CP016795	100	-
407	LI	F	KY441443	1310	<i>Streptomyces sp.</i>	KX863512	100	Suelo de pradera
409	LI	C	KY441450	1342	<i>Streptomyces pactum</i>	CP016795	100	-
500	LI	A	KY441451	1275	<i>Streptomyces sp.</i>	KX279526	99	Agua del lago Fetzara
506	LI	D	KY441463	1359	<i>Streptomyces bacillaris</i>	KP718510	100	Sedimento marino mar amarillo
516	LI	B	KY445386	281	<i>Streptomyces pactum</i>	KY120281	100	Muestra de agua Antártida
517	AN	-	-	-	<i>Nocardiopsis dassonvillei</i>	NR_074635.1	99	-
519	AN	-	-	-	<i>Nocardiopsis dassonvillei</i>	NR_074635.1	99	-

Aislado	Lugar aislamiento	Punto Muestreo	No Acceso	Tamaño (Pb)	Cepa	No Acceso	Porcentaje identidad	Lugar aislamiento
565	LI	A	KY445387	1333	<i>Streptomyces sp.</i>	KM678018	99	Sedimento de manglar
568	PR	-	-	-	<i>Streptomyces chumphonensis</i>	<u>NR_126175.1</u>	99	-
570	PR	-	-	-	<i>Nocardiopsis dassonvillei</i>	<u>NR_112743.1</u>	99	-
577	LI	C	KY445388	1240	<i>Streptomyces sp.</i>	KM678018	99	Sedimento de manglar
579	LI	C	KY434330	764	<i>Microbacterium sp.</i>	KY007183	100	Suelo de pradera
580	LI	B	KY445389	1328	<i>Streptomyces sp.</i>	KM590925	100	Sedimento
589	PR	-	-	-	<i>Streptomyces chumphonensis</i>	<u>NR_126175.1</u>	99	-
602	LI	E	KY445917	1008	<i>Streptomyces sp.</i>	KY203671	100	-
604	LI	D	KY445916	1337	<i>Streptomyces sp.</i>	KC856860	100	Ascidias marinas
605	LI	D	KY445918	1301	<i>Streptomyces sp.</i>	LC073309	99	Rizosfera
606	LI	C	-	-	<i>Streptomyces toxytricini</i>	<u>NR_112291.1</u>	99	-
610	LI	A	KY452454	1347	<i>Streptomyces sp.</i>	KM678018	100	Sedimentos de manglar
612	LI	D	KY445919	1097	<i>Streptomyces sp.</i>	KM229361	99	Suelo de bosque
614	LI	B	KY435618	392	<i>Nocardiopsis sp.</i>	KU535898	99	Desierto de india
616	PA	-	-	-	<i>Streptomyces panacagri</i>	<u>NR_112566.1</u>	98	Suelo
617	LI	D	KY445920	1347	<i>Streptomyces sp.</i>	KM678018	100	Sedimento de manglar

Aislado	Lugar aislamiento	Punto Muestreo	No Acceso	Tamaño (Pb)	Cepa	No Acceso	Porcentaje identidad	Lugar aislamiento
619	LI	D	KY445921	1099	<i>Streptomyces sp.</i>	KM678018	99	Sedimento de manglar
627	LI	E	KY445934	1197	<i>Streptomyces sp.</i>	HQ873930	99	Sedimento marino mar de Cortez
628	LI	D	KY445932	1287	<i>Streptomyces sp.</i>	LC073309	99	Rizosfera
629	PAQ		-	-	<i>Streptomyces palmae</i>	<u>NR_152026.1</u>	98	Rizosfera
630	LI	D	KY445935	474	<i>Streptomyces rhizosphaericus</i>	KP209441	99	Planta
633	PA		-	-	<i>Streptomyces panacagri</i>	<u>NR_112566.1</u>	98	-
636	LI	B	KY508961	304	<i>Streptomyces sp.</i>	KY465886	100	-
648	LI	C	KY451834	1094	<i>Streptomyces sp.</i>	KM678018	99	Sedimento de manglar
649	LI	E	KY452026	1314	<i>Streptomyces sp.</i>	JX007976	99	Esponjas marinas
653	LI	D	KY452455	1055	<i>Streptomyces viridogenes</i>	EF418611	99	-
655	LI	D	KY327806	1299	<i>Verrucosipora sp</i>	KU382350	99	lagos de cráter
663	LI	C	KY435617	566	<i>Nocardiopsis sp.</i>	AB609587	99	Sedimento marino profundo
665	LI	C	KY453992	1045	<i>Streptomyces sp.</i>	KM678018.1	100	Sedimento de manglar
667	LI	B	KY435620	1223	<i>Nocardiopsis flavescens</i>	KU535898	99	Hoja
671	LI	D	KY453993	1292	<i>Streptomyces sp</i>	KT581316	99	Rizosfera
673	LI	D	KY453994	1221	<i>Streptomyces sp.</i>	KM678018	99	Sedimento de manglar

Aislado	Lugar aislamiento	Punto Muestreo	No Acceso	Tamaño (Pb)	Cepa	No Acceso	Porcentaje identidad	Lugar aislamiento
676	LI	A	KY453995	1319	<i>Streptomyces sp.</i>	KM678018	100	Sedimento de manglar
678	LI	D	KY457841	286	<i>Streptomyces novaecaesareae</i>	KU214677	99	-
681	PAQ	-	-	-	<i>Streptomyces tendae</i>	<u>NR_025871.2</u>	100	Cultivo de papa
685	LI	A	KY434663	578	<i>Micrococcus yunnanensis</i>	KX792238	100	Rizosfera de cerezo
695	LI	C	KY453996	1301	<i>Streptomyces sp.</i>	EU214931	99	Sedimento marino
696	LI	E	KY434185	1299	<i>Blastococcus sp.</i>	DQ448697	99	Sedimento marino
698	LI	E	KY454014	1306	<i>Streptomyces sp.</i>	JX007976	99	Esponjas marinas
699	LI	E	KY454013	1258	<i>Streptomyces violaceochromogenes</i>	KU973994	99	Raíz
700	LI	D	KY454015	1151	<i>Streptomyces sp.</i>	KM229361	99	Suelo de bosque

ANEXO 3

Tabla 18. Medida de radio en centímetros de halos de inhibición de ensayos doble capa.

	Cepa/ aislado		<i>S. aureus</i>				<i>C. albicans</i>				<i>E. coli O157H:7</i>			
	M1	M2	M3	M4	M1	M2	M3	M4	M1	M2	M3	M4		
4	0	0	0	0	0	3.0	2.0	0	0	0	0	0		
5	0	0	0	0	3.0	0	0	0	0	0	0	0		
6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
7	0	0	0	0	3.0	5	0	0	0	0	0	0		
10	0	0	0	0	0	0	0	3.0	0	0	0	0		
11	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
12	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
13	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
15	0	0	0	0	4.4	6.2	0	2.0	0	0	0	4.7		
18	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
30	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
31	0	0	0	0	0	0	4	0	0	0	0	4.5		
36	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
53	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		

Cepa/ aislado	<i>S. aureus</i>				<i>C. albicans</i>				<i>E. coli O157H:7</i>			
	M1	M2	M3	M4	M1	M2	M3	M4	M1	M2	M3	M4
106	0	0	0	0	6.0	9.0	2.5	2.5	3.5	2.0	4.0	3.5
123	0	0	0	0	0	0	0	3.0	0	0	3.5	0
160	0	0	0	0	0	0	3	3.0	0	0	0	0
161	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
162	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
163	0	0	0	0	3.0	0	4.4	4.0	0	1.5	0	0
164	0	0	0	0	0	0	3.5	0	1.3	0.3	0	0
167	0	0	0	0	0	0	2.0	0	0	0	0	1.5
170	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
172	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
173	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
177	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
178	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
179	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
180	3	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0
182	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
183	0	0	2.1	0	2.5	0	2.8	0	0	0	0.3	0

Cepa/ aislado	<i>S. aureus</i>				<i>C. albicans</i>				<i>E. coli O157H:7</i>			
	M1	M2	M3	M4	M1	M2	M3	M4	M1	M2	M3	M4
184	0	0	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0
186	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3.5
191	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
192	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
193	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
194	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0
195	8.4	5	9.4	8.6	0	0	0	0	2	0	0	3
197	0	0	0	0	2.2	0	0	3	0	0	0	0
200	0	0	0	0	0	0	3	2	0	0	0	0
201	3.4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
206	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
207	0	0	0	0	2.5	5	0	0	1.8	0	0	0
209	0	0	0	0	0	0	0.8	0	0	0	0	0
210	0	0	0	0	1.4	0	1.3	0	0	0	0	0

Cepa/ aislado	<i>S. aureus</i>				<i>C. albicans</i>				<i>E. coli O157H:7</i>			
	M1	M2	M3	M4	M1	M2	M3	M4	M1	M2	M3	M4
211	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
213	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
214	0	0	0	0	0.5	0	0	0	0	0	0	0
217	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
221	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
222	0	0	0	0	1.5	0	0	0	0	0	0	0
224	0	0	0	0	0	0	0.4	0	0	0	0	0
231	2.3	0	0	0	1.2	0	1.3	0	0	0	0	0
232	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2.5	0
236	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
237	2.0	0	0	0	0	2.4	4.0	0	0	0	0	0
238	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
400	0	0	0	0	0	0	2.5	0	0	0	0	0
401	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
403	0	0	0	0	0.6	0	0	0	0	0	0	0
407	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
408	2	0	7.5	7.5	0	0	5.0	0	0	3.5	0	0

Cepa/ aislado	<i>S. aureus</i>				<i>C. albicans</i>				<i>E. coli O157H:7</i>			
	<i>M1</i>	<i>M2</i>	<i>M3</i>	<i>M4</i>	<i>M1</i>	<i>M2</i>	<i>M3</i>	<i>M4</i>	<i>M1</i>	<i>M2</i>	<i>M3</i>	<i>M4</i>
409	0	0	0	0	4.0	2	2.4	6.0	0	0	0	0
410	0	0	0	0	1.0	0	2.5	0	0	0	0	0
440	0	0	1.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0
500	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
506	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
510	0.6	0	1.5	0	0	0	1.2	0	0	0	2.0	0
511	0	0	0	0	8.0	7.5	0	0	0	0	0	0
512	0	0	0	0	6.0	0	0	1.0	0	0	0	0
513	0	0	0	0	0	1.4	5.0	4.0	0	0	0	0
514	0	0	4.0	5.0	2.2	5.0	3.0	0	0	6.0	0	0
516	0.7	0	1.7	0	0	0	3.0	4.0	0	0	2.0	0
518	3.4	0	5.3	0	4.2	0	5.2	0	0	0	0.5	0
519	0	0	0	0	0	0	2.0	0	0	0	0	0
561	0	0	0	0	1.5	0	2.0	0	0	0	0	0
562	0	0	0	0	0	0	1.2	0	0	0	0	0
563	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
566	1.1	0	0	0	1.7	0	0.4	0	0	0	0	0

Cepa/ aislado	<i>S. aureus</i>				<i>C. albicans</i>				<i>E. coli O157H:7</i>			
	<i>M1</i>	<i>M2</i>	<i>M3</i>	<i>M4</i>	<i>M1</i>	<i>M2</i>	<i>M3</i>	<i>M4</i>	<i>M1</i>	<i>M2</i>	<i>M3</i>	<i>M4</i>
567	3.1	0	4.2	0	2.2	0	4.5	0	0	0	0	0
571	2.6	0	0.4	0	0	0	5	0	0	0	0	0
572	0	0	2.1	0	2.8	0	0	0	0	0	0	0
574	0	0	0.4	0	0	0	0	0	0	0	0	0
575	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
576	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
577	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
578	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
579	0	0	0	0	2.5	0	0	0	0	0	0	0
580	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
582	1.3	0	3.9	0	5.6	0	5.7	0	0	0	0	0
583	0	0	0	0	0	0	3.5	0	0	0	0	0
587	0	0	0	0	0	0	2.4	0	0	0	0	0
590	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
593	2.5	0	0	0	1.6	0	1.8	0	0	0	0	0
595	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Cepa/ aislado	<i>S. aureus</i>				<i>C. albicans</i>				<i>E. coli O157H:7</i>			
	M1	M2	M3	M4	M1	M2	M3	M4	M1	M2	M3	M4
601	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
607	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
609	0.2	0	0.1	0	1.4	0	4	0	0	0	0	0
612	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
613	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
618	5.3	0	5.4	0	5.5	0	5.6	0	0	0	0	0
622	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
623	0	0	2.1	0	1.7	0	0.5	0	0	0	0	0
634	0	0	0	0	0	0	6.0	0	0	0	0	0
636	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
640	0	0	0	0	3.0	0	0	0	0	0	0	0
641	0	0	0.9	0	0	0	0	0	0	0	0	0
648	0	0	0	0	2.5	0	1.7	0	0	0	0	0
650	0	0	1.6	0	0	0	0	0	0	0	0	0
653	0	0	0.6	0	0	0	4.0	0	0	0	0	0
653	0	0	0.5	0	0	0	0	0	0	0	0	0
656	0	0	0	0	0	0	1.2	0	0	0	0	0

Cepa/ aislado	<i>S. aureus</i>				<i>C. albicans</i>				<i>E. coli O157H:7</i>			
	<i>M1</i>	<i>M2</i>	<i>M3</i>	<i>M4</i>	<i>M1</i>	<i>M2</i>	<i>M3</i>	<i>M4</i>	<i>M1</i>	<i>M2</i>	<i>M3</i>	<i>M4</i>
659	2.7	0	2.5	0	3.1	0	2.3	0	0	0	0	0
665	0	0	0	0	1.5	0	1.4	0	0	0	0	0
667	0	0	0	0	3.0	0	2.0	0	0	0	0	0
669	0	0	0	0	0	0	0.5	0	0	0	0	0
670	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
672	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
674	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
676	0	0	0	0	0	0	1.5	0	0	0	0	0
677	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
678	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
681	0.1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
699	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
702	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
703	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
730	0	0	2.4	0	0	0	0	0	0	0	0	0
731	0	0	0.2	0	0	0	0	0	0	0	0	0
737	0	0	0.6	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Cepa/ aislado	<i>S. aureus</i>				<i>C. albicans</i>				<i>E. coli O157H:7</i>			
	<i>M1</i>	<i>M2</i>	<i>M3</i>	<i>M4</i>	<i>M1</i>	<i>M2</i>	<i>M3</i>	<i>M4</i>	<i>M1</i>	<i>M2</i>	<i>M3</i>	<i>M4</i>
741	2.8	0	2.6	0	0	0	0	0	0	0	0	0
742	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
744	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
666	0	0	0.6	0	0	0	1.0	0	0	0	2.0	0
668	0.6	0	1.5	0	0	0	1.5	0	0	0	1.7	0
698	0	0	1.6	0	0	0	2.0	0	0	0	1.7	0
700	0.7	0	0.6	0	0	0	2.4	0	0	0	1.5	0

Medios de cultivo : M1,M2,M3.,M4

ANEXO 4

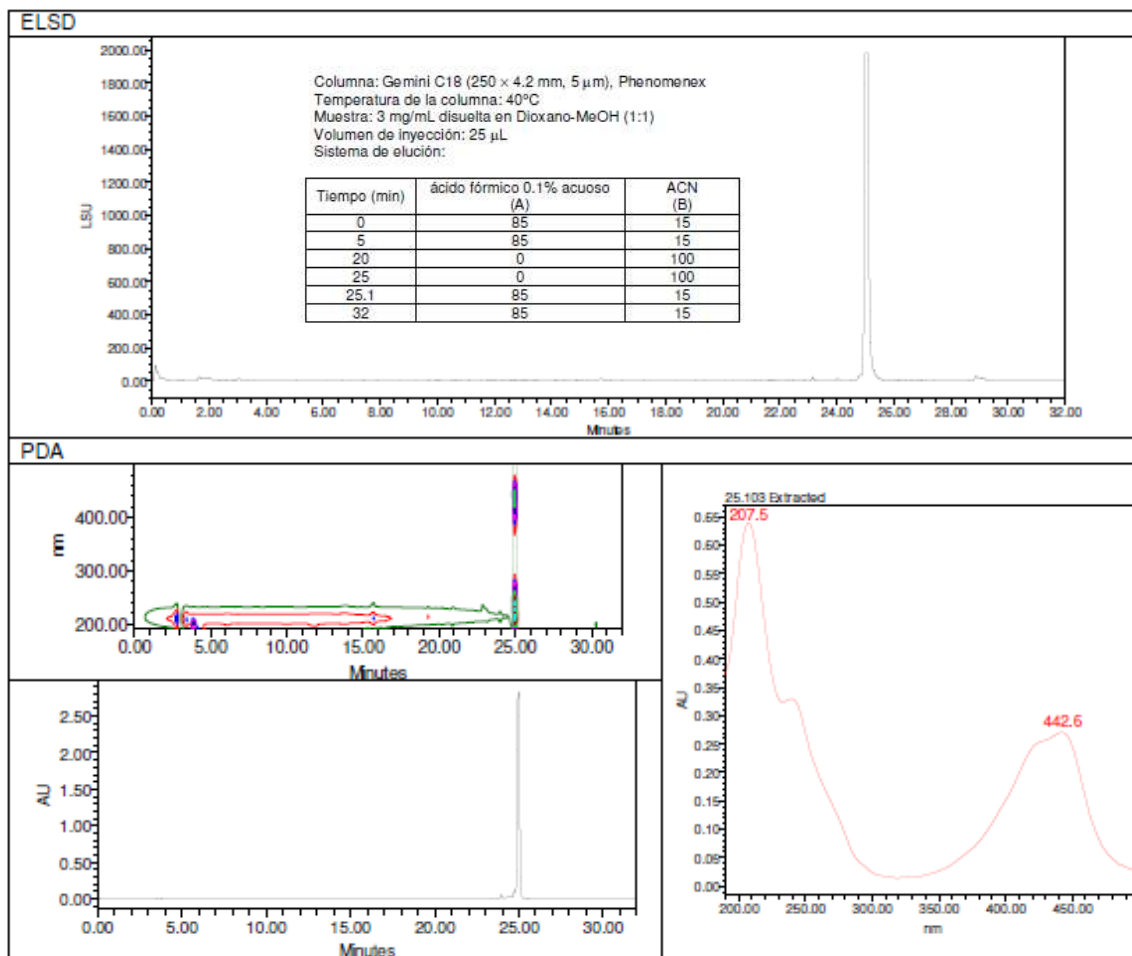


Figura 29. Perfil cromatográfico de la fracción PR33-F6 realizado por HPLC

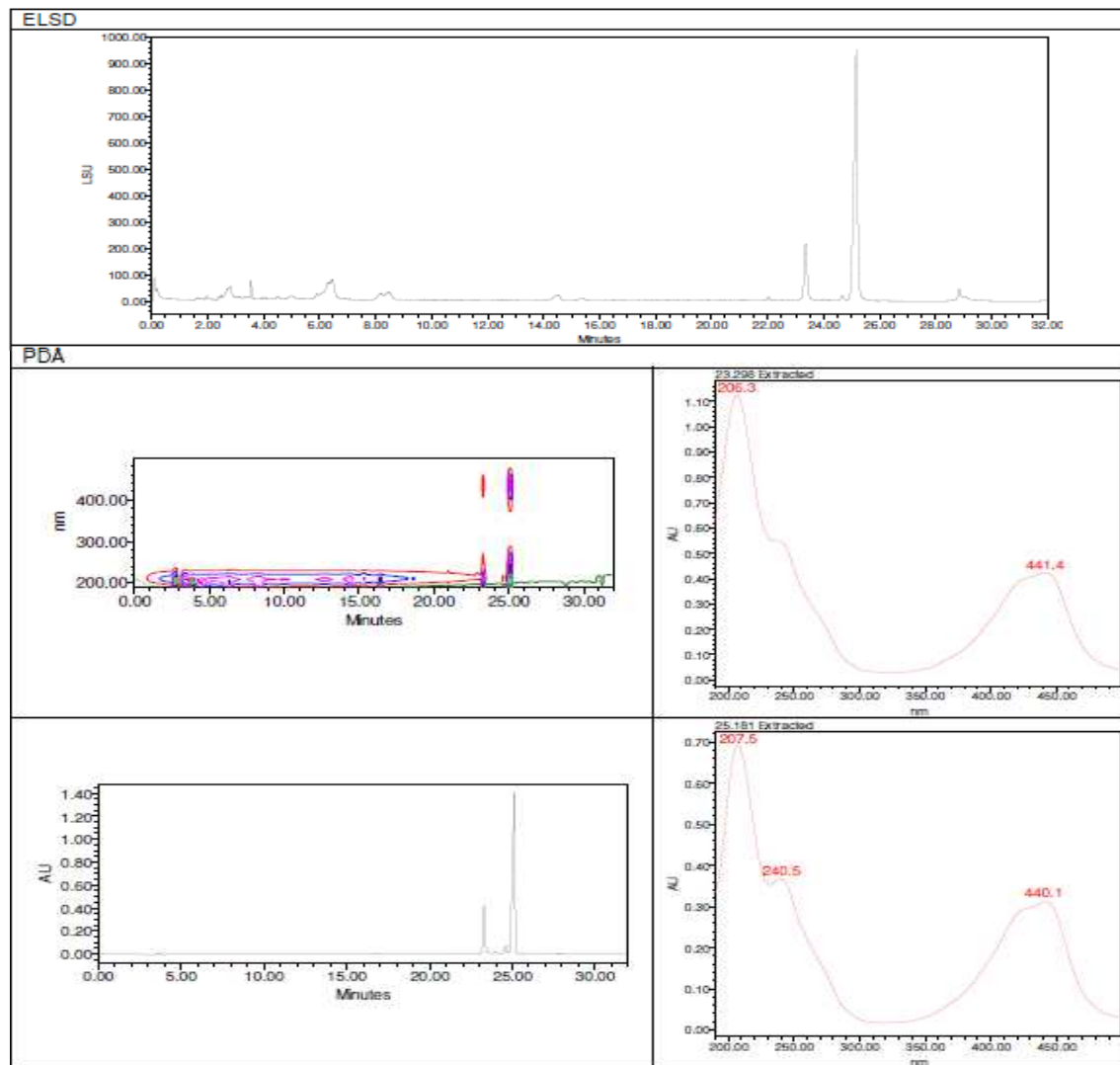


Figura 30. Perfil cromatográfico de la fracción PR33-F7 realizado por HPLC

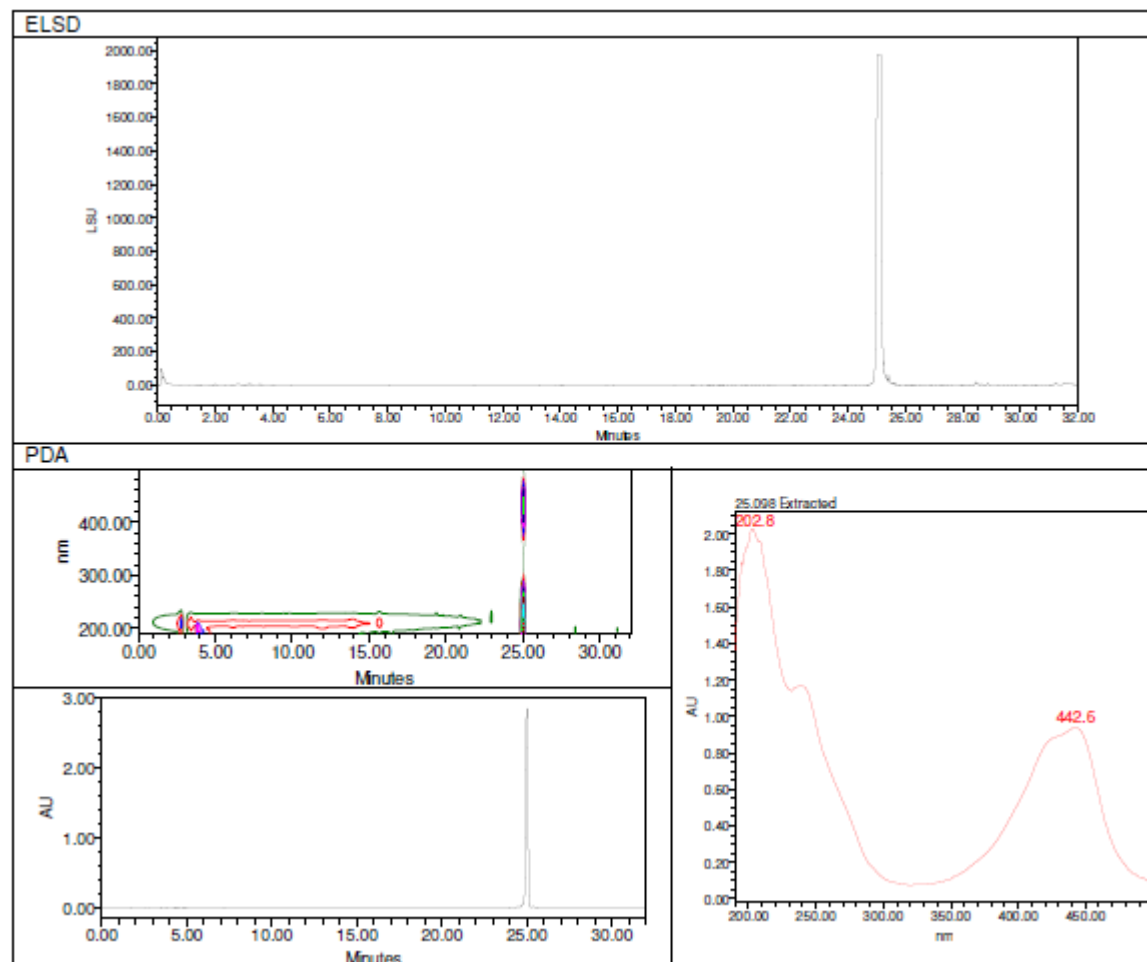


Figura 31. Perfil cromatográfico de la fracción PR35-F5 realizado por HPLC

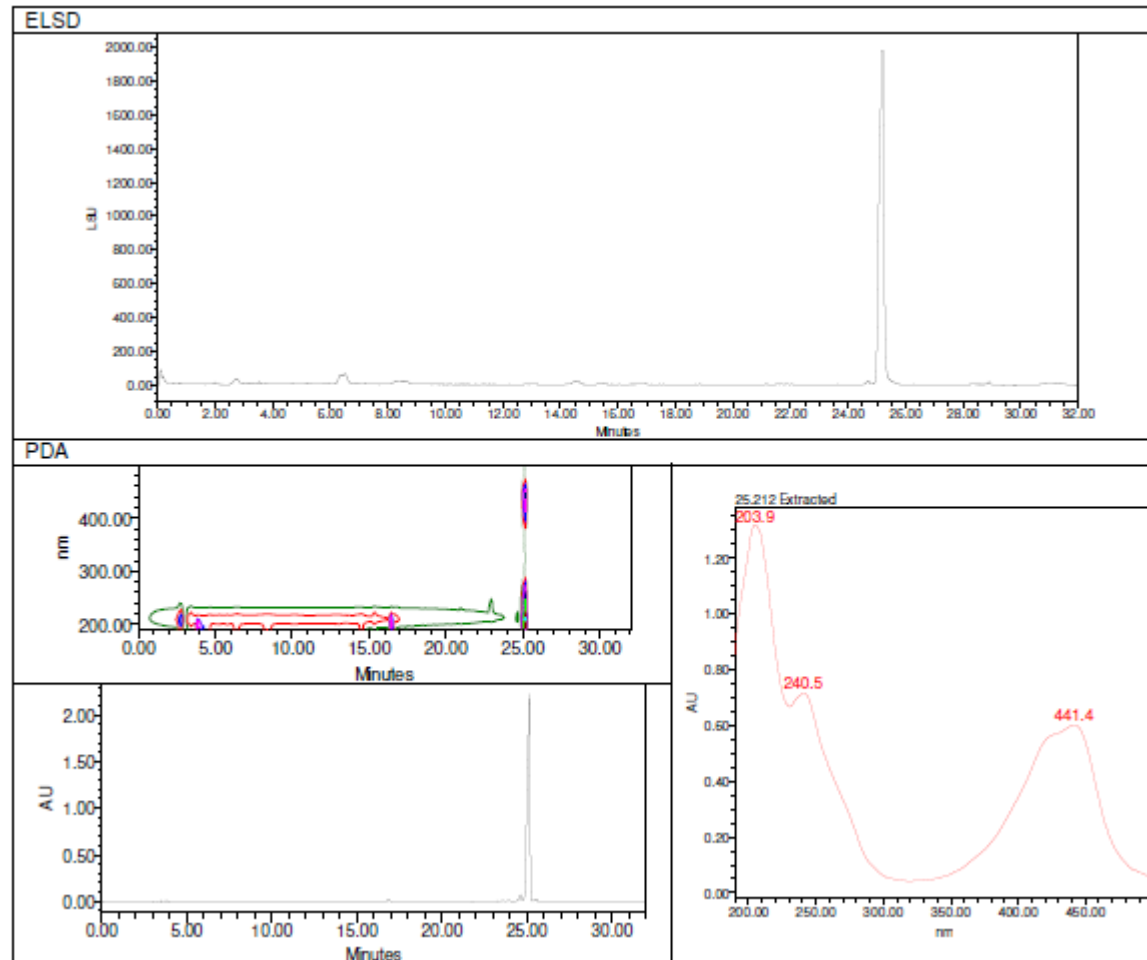


Figura 32. Perfil cromatográfico de la fracción PR35-F6 realizado por HPLC

Columna: BEH C18 (2.1 × 50 mm, 1.7 μm), Waters
 Temperatura de la columna: 40°C
 Muestra: 0.2 mg/mL disuelta en Dioxano-MeOH (1:1)
 Volumen de inyección: 5 μL
 Sistema de elución:

Tiempo (min)	ácido fórmico 0.1% acuoso (A)	ACN + ácido fórmico 0.1% (B)
0	85	15
8	0	100
9.5	0	100
10	85	0

PR33

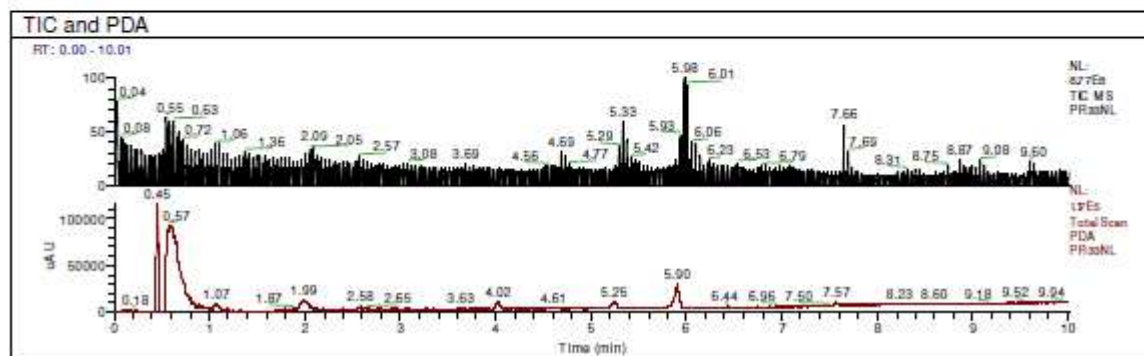


Figura 33. Análisis por UPLC-PDA-HRMS-MS/MS: del extracto crudo de la cepa de *Streptomyces* PR33

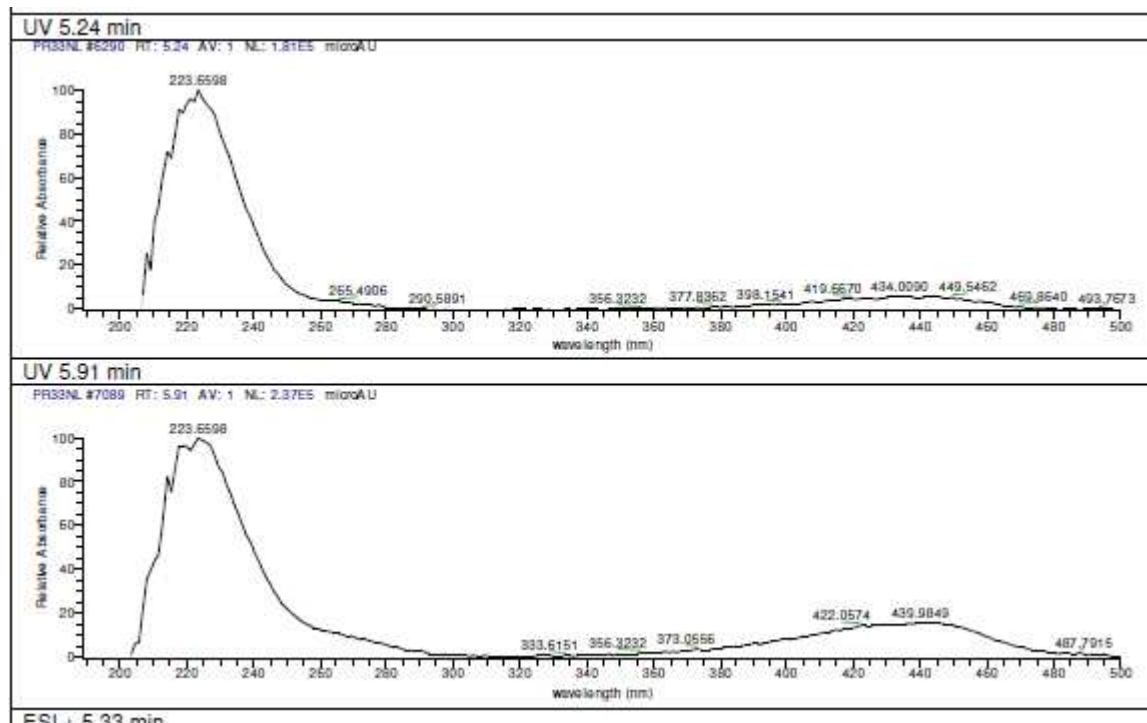


Figura 34. Análisis por UPLC-PDA-HRMS-MS/MS: del extracto crudo de la cepa de *Streptomyces* PR33

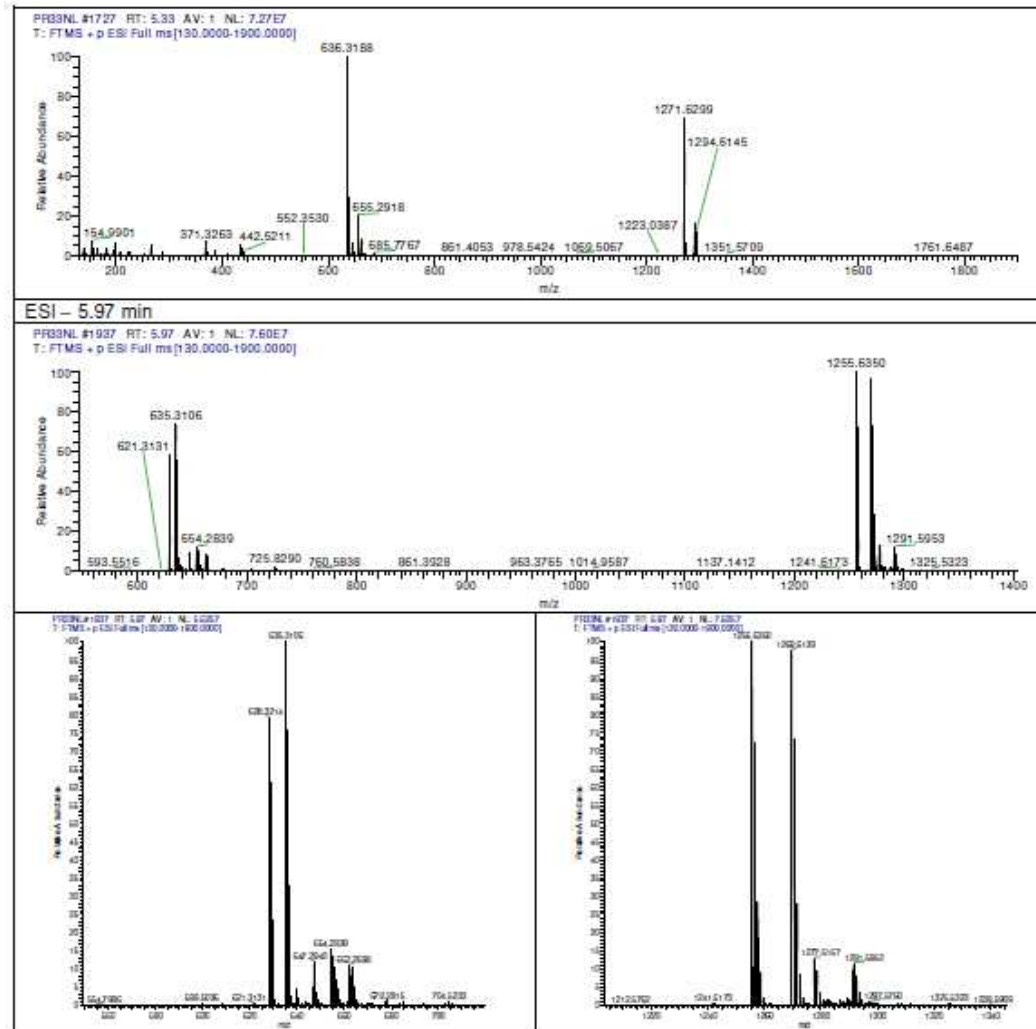


Figura 35. Análisis por UPLC-PDA-HRMS-MS/MS: del extracto crudo de la cepa de *Streptomyces* PR33

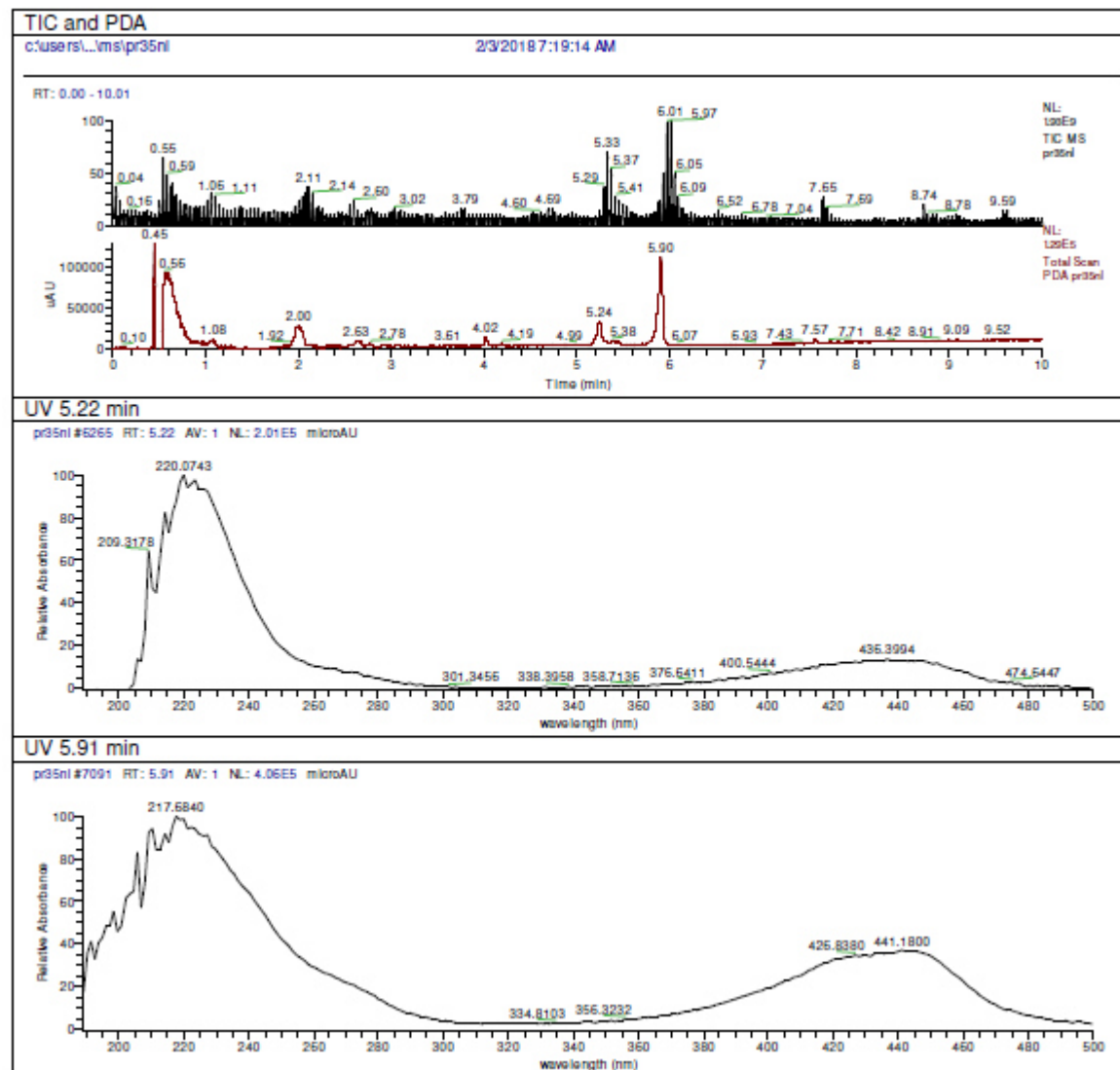


Figura 36. Análisis por UPLC-PDA-HRMS-MS/MS: del extracto crudo de la cepa de *Streptomyces* PR35

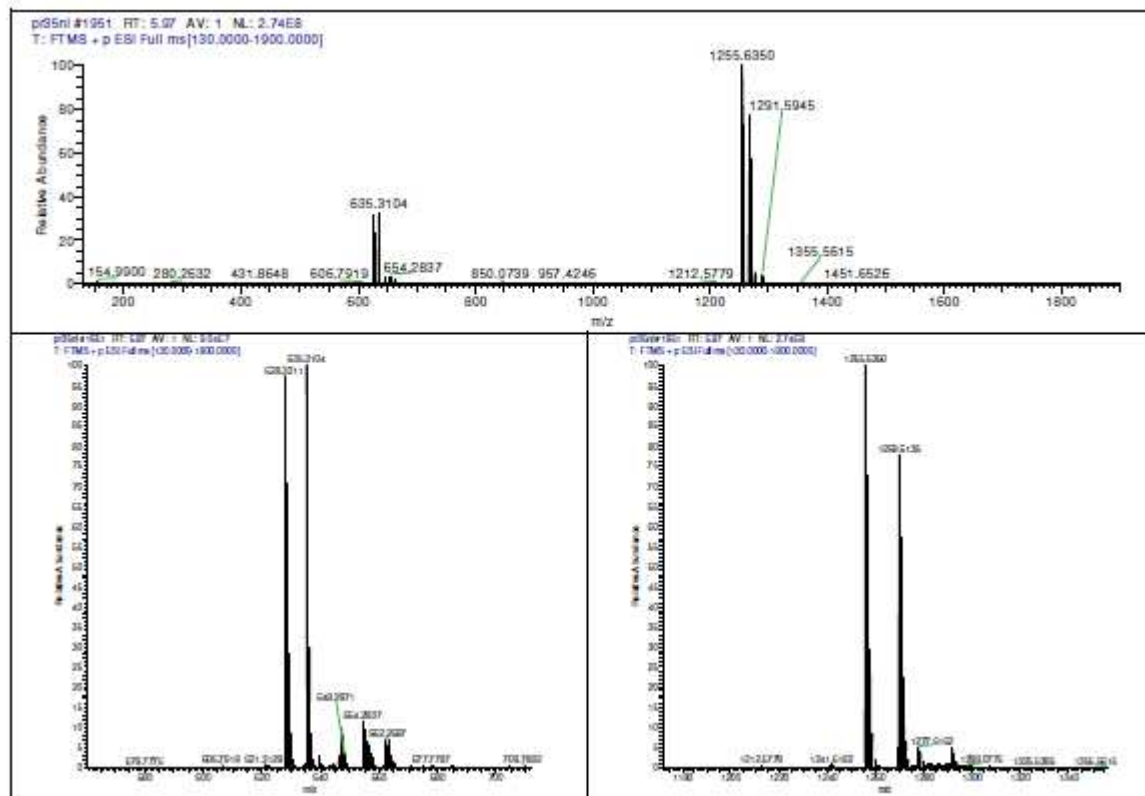


Figura 37. Análisis por UPLC-PDA-HRMS-MS/MS: del extracto crudo de la cepa de *Streptomyces* PR35

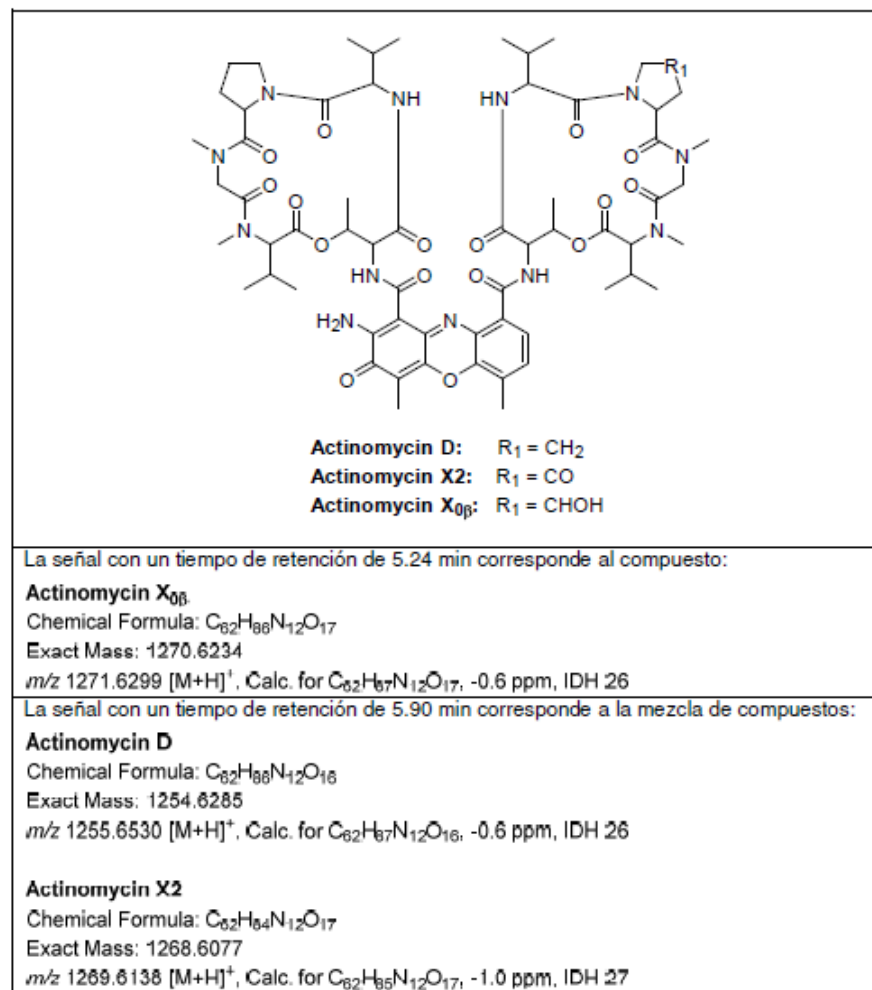


Figura 38. Resumen resultados del análisis por UPLC-PDA-HRMS-MS/MS de las fracciones de los extractos de las cepas PR33 y PR35