



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA XOCHIMILCO

INFORME FINAL DEL SERVICIO SOCIAL

División CBS Ciencias Biológicas de la Salud

Rafael Fernando Galeana Villadero

Lic. en Química Farmacéutica Biológica

2183067827

2183067827@alumnos.xoc.uam.mx

Cel:5535627459, Tel:59424872

Nombre del proyecto: Sistemas biosintéticos NRPS y PKS en actinobacterias

Proyecto Genérico: Obtención de materias primas, principios activos,  
medicamentos y productos biológicos

Etapas: Diseño y desarrollo de productos biológicos por métodos biotecnológicos o  
de ingeniería genética

Fecha de inicio y terminación:14-Ene-2022 al 18-Jul-2022

Lugar de Realización: Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Xochimilco  
Laboratorio 202, Edificio N. Calzada del Hueso 1100, Col. Villa Quietud,  
Delegación Coyoacán, Ciudad de México.

QFB. Nora Lidia Sánchez Saucedo  
Nombre, firma y Vo.Bo del asesor interno  
Coordinadora de proyectos de servicio  
social del laboratorio de Producción de  
Biológicos.  
Número económico: 18752

Dr. Ángel Sandoval y Trujillo  
Nombre, firma y Vo.Bo del asesor  
interno. Jefe del Laboratorio de  
Producción de Biológicos.  
Número económico: 1156

## RESUMEN

Las actinobacterias son un grupo de bacterias de crecimiento filamentosos y se encuentran ampliamente distribuidas en la naturaleza y materia orgánica. La mayoría de las actinobacterias son organismos saprófitos que habitan en el suelo y pasan la mayor parte de sus ciclos de vida como esporas latentes, especialmente en condiciones de nutrientes limitados. Además, son capaces de producir una amplia variedad de metabolitos secundarios de interés comercial e industrial.

Dentro de su genoma se encuentran un determinado conjunto de genes conocidos como sistemas biosintéticos; entre los más conocidos se encuentran los sistemas policétidos sintasa (PKS) y sintetasas de péptidos no ribosomales (NRPS), capaces de sintetizar metabolitos secundarios; cada uno de estos genes se divide en 3 categorías, los tipos I, II y III, en ambos sistemas.

En este trabajo se analizaron 19 cepas de bacterias. Se realizaron pruebas fenotípicas para su descripción e identificación y se estandarizaron las técnicas de biología molecular para amplificar los sistemas biosintéticos NRPS1 y PKS1 para su detección y predicción de producción de metabolitos secundarios de interés farmacológico.

La importancia de este trabajo destaca a nivel taxonómico, ya que es importante conocer a las bacterias que estamos estudiando a nivel metabólico. Por otra parte, es importante estandarizar técnicas que se emplean por primera vez en el laboratorio para futuros estudios de licenciatura y posgrado.

Palabras clave: Actinobacterias, sistemas biosintéticos NRPS-I y PKS-I.

<b>Índice de contenido</b>	
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>5</b>
Actinobacterias.....	5
Infecciones causadas por <i>Actinobacterias</i> .....	12
Sistemas biosintéticos.....	14
Sistemas PKS .....	15
Sistemas NRPS.....	18
Identificación de actinobacterias .....	22
Herramientas bioinformáticas para la búsqueda de sistemas biosintéticos .....	22
Cepas de estudio .....	24
<b>PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA</b> .....	<b>24</b>
<b>JUSTIFICACIÓN:</b> .....	<b>25</b>
<b>OBJETIVOS:</b> .....	<b>25</b>
General: .....	25
Específicos:.....	25
<b>METODOLOGÍA:</b> .....	<b>26</b>
Activación y siembra de cepas .....	26
Pruebas bioquímicas.....	27
API 20E.....	27
API 20NE .....	29
Sensibilidad a antibióticos .....	30
Análisis fenotípico .....	31
Extracción de ADN .....	34
Amplificación del gen 23S .....	35
Amplificación de los sistemas PKS1 y NRPS1.....	36
Identificación de las actinobacterias con capacidad biosintética .....	36
Predicción de metabolitos secundarios .....	37
<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b> .....	<b>37</b>
<b>OBJETIVOS Y METAS ALCANZADAS</b> .....	<b>46</b>
<b>CONCLUSIONES</b> .....	<b>46</b>
<b>RECOMENDACIONES:</b> .....	<b>46</b>
<b>ANEXOS:</b> .....	<b>47</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....	<b>65</b>

## Índice de figuras

Figura 1. Imagen microscópica de <i>Streptomyces</i> .....	6
Figura 2. Representación de una colonia de actinomicetos .....	6
Figura 3. Clasificación del filo Actinobacteria. ....	7
Figura 4. Producción de metabolitos secundarios pigmentados por colonias de <i>Streptomyces</i> .....	8
Figura 5 Dibujos esquemáticos de los diferentes tipos de cadenas de esporas producidas por actinomicetos.....	9
Figura 6. Lesión nodular en extremidad inferior por actinomicetoma .....	13
Figura 7. Organización modular del complejo PKS-I.....	16
Figura 8. Esquema del funcionamiento de los tres tipos de PKS.....	17
Figura 9. Módulos que comprende a los sistemas NRPS .....	19
Figura 10. Biosíntesis lineal de la vancomicina. ....	20
Figura 11. Biosíntesis iterativa de la micotoxina eniatina .....	20
Figura 12. Biosíntesis no lineal del sideróforo vibriobactina.....	21
Figura 13. Resultados positivos y negativos de la prueba API20E .....	28
Figura 14. Resultados positivos y negativos de la prueba API20NE.....	30
Figura 15. Matriz de datos de las pruebas bioquímicas .....	31
Figura 16. Resultado posible de una cepa .....	32
Figura 17. Matriz de semejanza entre cepas dependiendo de su Ssm.....	33
Figura 18. Ejemplo de dendrograma. Agrupación de cepas a partir de las matrices jerarquizadas.....	34
Figura 19. Predicción de metabolitos secundarios de <i>Nocardia Brasiliensis</i> utilizando AntiSMASH .....	37
Figura 20. Microscopia de algunas de las cepas de origen clínico.....	38
Figura 21. Crecimiento colonial de algunas cepas de origen clínico.....	38
Figura 22. Ejemplo de galerías.....	39
Figura 23. Ejemplos de la prueba de sensibilidad a antibióticos. ....	40
Figura 24. Dendrograma de análisis de similitud de los datos obtenidos de las pruebas de sensibilidad a antibióticos y bioquímicas .....	41
Figura 25. Dendrograma de similitud de características fenotípicas de actinobacterias ya clasificadas vs nuestras cepas de estudio.....	41
Figura 26. Ejemplo de la amplificación del inserto del gen RNAr 23S.....	43

Figura 27. Amplificación del sistema PKS1, la cepa utilizada como positivo fue la 94.0728 .....	44
Figura 28. Amplificación del sistema NRPS1 .....	45
Figura 29. Imágenes macroscópicas de las colonias de nuestras cepas de estudio .....	63
Figura 30. Imágenes microscópicas de nuestras cepas de estudio .....	64

### Índice de tablas

Tabla 1. Diferentes grupos de actinomicetos .....	11
Tabla 2. Lista de algunos antibióticos producidos por <i>Streptomyces</i> sp .....	12
Tabla 3. Actinomicetos patógenos encontrados en especímenes clínicos.....	14
Tabla 4. Bio-actividad de los compuestos sintetizados por el sistema PKS.....	18
Tabla 5. Bio-actividad de los compuestos sintetizados por el sistema NRPS .....	21
Tabla 6. Softwares utilizados para la búsqueda y análisis de BGC.....	24
Tabla 7. Identificación de las actinobacterias .....	42
Tabla 8. Predicción de sistemas biosintéticos de <i>Streptomyces albus</i> , <i>Nocardia otitidiscaviarum</i> y <i>Nocardia brasiliensis</i> .....	45
Tabla 9. Características morfológicas de las cepas de estudio.....	48
Tabla 10. Resultados de la prueba de sensibilidad a antibióticos .....	49
Tabla 11. Resultados de las pruebas bioquímicas 20NE .....	51
Tabla 12. Resultados de la prueba bioquímica API 20E .....	52
Tabla 13. Resultados de la amplificación de los sistemas PKS 1 y NRPS 1.....	53
Tabla 14. Datos de sensibilidad a antibióticos de actinobacterias de referencia...	55
Tabla 15. Datos de API 20NE de actinobacterias de referencia.....	58
Tabla 16. Datos de API 20E de actinobacterias de referencia .....	61
Tabla 17. Predicción de metabolitos secundarios producidos por <i>Streptomyces albus</i> , <i>Nocardia otitidiscaviarum</i> y <i>Nocardia brasiliensis</i> .....	62

## INTRODUCCIÓN

### Actinobacterias

Las actinobacterias son un grupo de bacterias de crecimiento filamentosos capaces de producir una amplia variedad de enzimas extracelulares y metabolitos secundarios de interés comercial e industrial (Medina Cuevas & Martínez, 2011). Se encuentran ampliamente distribuidas en la naturaleza en agua dulce, agua marina y materia orgánica. La mayoría de las actinobacterias (los estreptomicetos en particular) son organismos saprófitos que habitan en el suelo y pasan la mayor parte de sus ciclos de vida como esporas latentes, especialmente en condiciones de nutrientes limitados (Barka, et al, 2015). Comprenden aproximadamente del 20 al 60% de la población microbiana donde su función ecológica principal es la descomposición de la materia orgánica (Tipán Guijarro, 2012).

Al igual que otras bacterias del suelo, las *Actinobacterias* son en su mayoría mesófilas, con un crecimiento óptimo a temperaturas entre 25 y 30 °C. La mayoría crecen en suelos con un pH neutro. Crecen mejor a un pH entre 6 y 9 con un crecimiento máximo (Barka, et al, 2015). Se caracterizan por no producir mucopolisacáridos, de ahí que se observen en placas de agar como colonias secas y no cremosas. Dentro de sus características particulares presentan un olor típico a suelo húmedo por la producción de un metabolito llamado geosmina (Dávila Medina, et al. 2013).

Estas bacterias son microorganismos Gram positivos, en su mayoría aerobias, presentan crecimiento micelar formado por hifas septadas (Figura 1) (Quiñones Aguilar, et al. 2017). Presentan una diversidad morfológica, desde formas bacilares hasta formas filamentosas ramificadas, terminando en una esporulación compleja (Tipán Guijarro, 2012), por lo que se han considerado como hongos en el pasado, pero se ha demostrado que corresponden al orden bacteriano *Actinomycetales*, del griego *aktino* (rayo) y *mikes* (hongo), pues estos filamentos recuerdan a las hifas de los hongos (Figura 2) (González Camacho, 2013). Sus filamentos tienen un diámetro de 1 µm o menor, más pequeño que el de la estructura tubular (hifa) característica de los hongos; además, los filamentos de los actinomicetos son más frágiles, se fragmentan fácilmente en formas bacilares y tienen las dimensiones típicas de las bacterias (González Camacho, 2013). La pared celular contiene ácido murámico y ácido diaminopimélico, que son constituyentes característicos de la pared celular de las bacterias; en cambio, no están presentes ni quitina ni glucanos, componentes de la pared celular de los hongos (González Camacho, 2013).

Las bacterias de este tipo presentan un alto contenido de guanina y citosina (G+C) en su ADN, encontrándose en el rango de 51 a 78%. Constituyen el orden de los

*Actinomycetales* (Figura 3), dentro del filo *Actinobacteria*, se reproducen por fisión binaria o fragmentación ("Paillé Jiménez, 2011", "Tipán Guijarro, 2012").

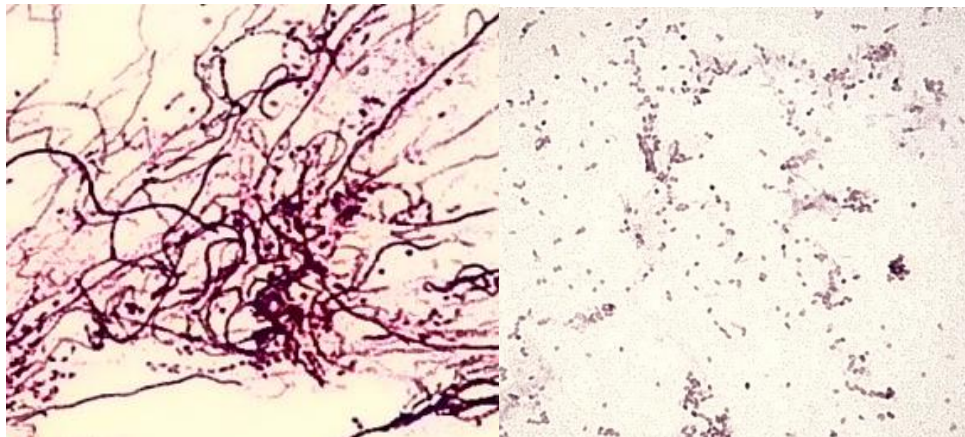


Figura 1. Imagen microscópica de *Streptomyces*, en la foto de la izquierda la actinobacteria presenta hifas que ramifican. En la foto de la derecha se observa fragmentación por mayor tiempo de cultivo.

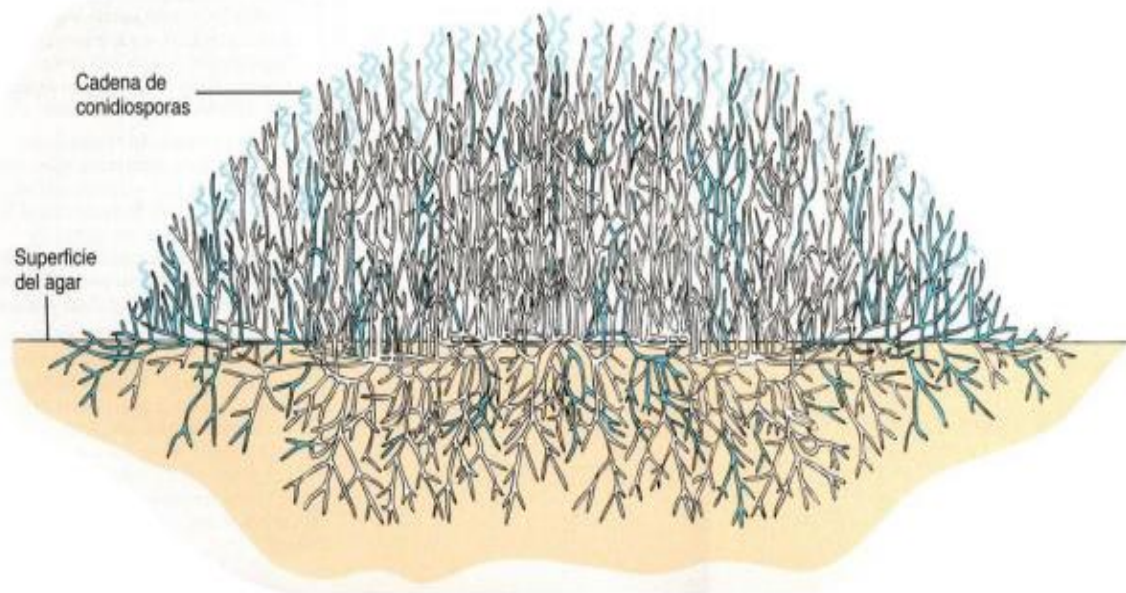


Figura 2. Representación de una colonia de actinomicetos, se representan de azul las hifas vivas, blanco las hifas muertas, micelio aéreo con cadena de conidiosporas (González Camacho, 2013).

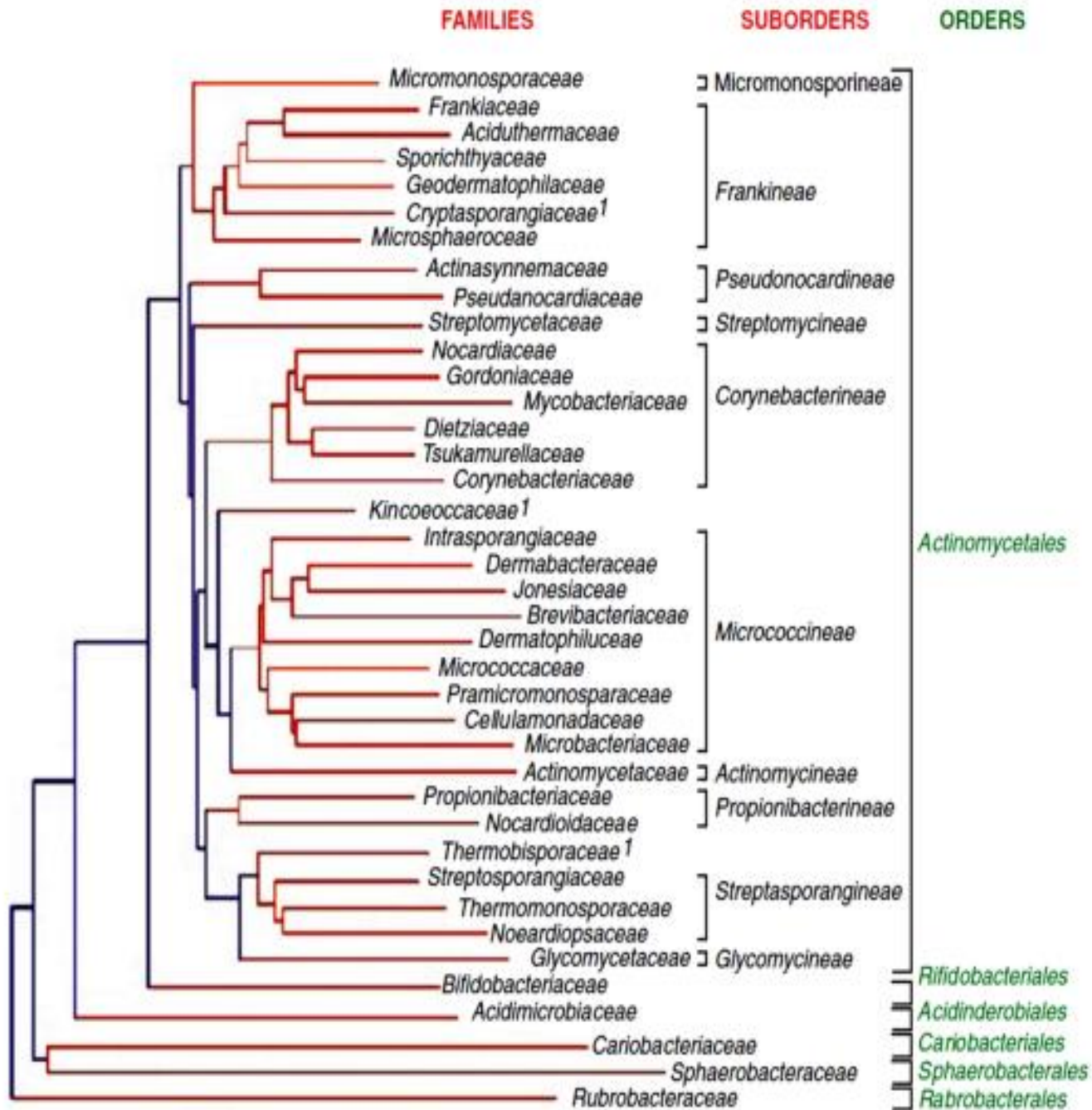


Figura 3. Clasificación del filo Actinobacteria (Paillé Jiménez, 2011).

Las principales características utilizadas para delinear la taxonomía de actinobacteria a nivel de género y especie son la morfología microscópica y la quimiotaxonomía. La última de estas características se relaciona principalmente con la composición de la pared celular (Barka, et al, 2015).



Los actinomicetos se caracterizan por la diferente producción de pigmentos. Estos pigmentos suelen ser azul, violeta, rojo, rosa, amarillo, verde, marrón y negro. Los pigmentos pueden difundirse en el medio o pueden quedar retenidos en el micelio (Figura 4) (Mohamed Selim, et al. 2021).

La capacidad de estos organismos para producir pigmentos depende de las diversas condiciones de nutrición y cultivo, donde puede aumentar mucho o perderse por completo. Por lo tanto, es muy importante mejorar la combinación correcta de diferentes condiciones de cultivo para fomentar el crecimiento y la producción de pigmentos (Mohamed Selim, Abdelrazek Abdelhamid, & Saleh Mohamed, 2021).

Por ejemplo, el pigmento biológico actinorrodina es producido por *Streptomyces coelicolor*, *Streptomyces violaceusruber* y *Streptomyces lividans*, es de color azul con base en el pH 6. Este pigmento tiene diferentes aplicaciones como antibiótico contra bacterias Gram positivas (Mohamed Selim, Abdelrazek Abdelhamid, & Saleh Mohamed, 2021).



Figura 4. Producción de metabolitos secundarios pigmentados por colonias de *Streptomyces* (Mohamed Selim, Abdelrazek Abdelhamid, & Saleh Mohamed, 2021).

Las esporas son extremadamente importantes en la taxonomía de actinobacteria (Figura 5). Los pasos iniciales de la esporulación en varias *Actinobacterias* oligospóricas pueden considerarse procesos de gemación.

Las esporas pueden formarse sobre el sustrato y/o el micelio aéreo como células individuales o en cadenas de diferentes longitudes. En otros casos, las esporas pueden albergarse en vesículas especiales (esporangios) y dotadas de flagelos (Barka, et al, 2015).

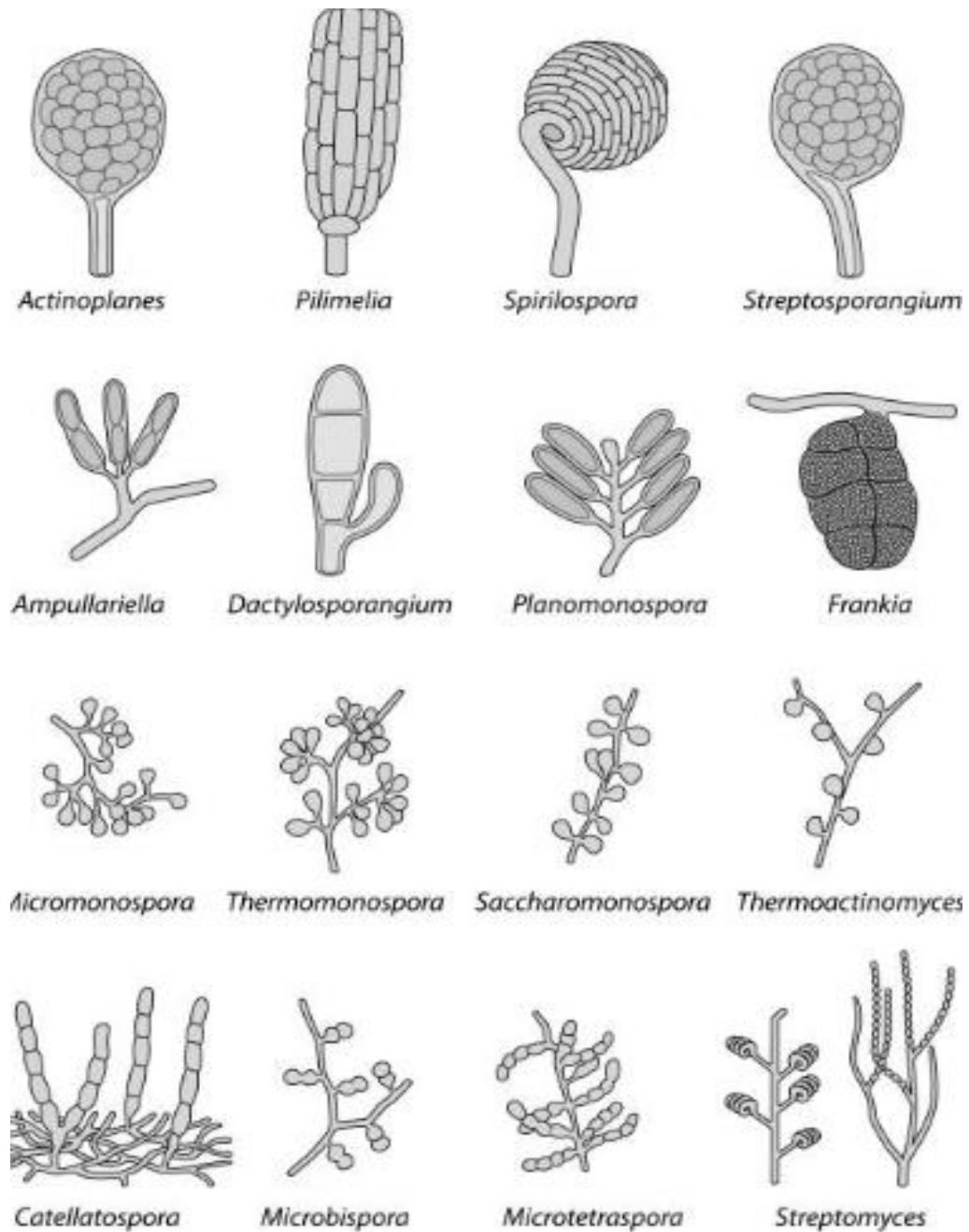


Figura 5 Dibujos esquemáticos de los diferentes tipos de cadenas de esporas producidas por actinomicetos. Barka, et al, 2015

Con base en criterios morfológicos y químicos, los actinomicetos se han agrupado en diferentes géneros como se describen en la tabla 1 (Mohamed Selim, Abdelrazek Abdelhamid, & Saleh Mohamed, 2021).

<b>Sección</b>	<b>Características</b>
<i>Nocardioformactinomicetos</i>	Aeróbico, puede ser ácido-alcohol resistente; crecen como bastoncillos, cocos y filamentos ramificados o forman sustrato y micelio aéreo que se fragmenta; contienen ácidos micólicos.
Actinomicetos con esporangios multiloculares	Aeróbico a facultativamente anaeróbico; el micelio se divide en todos los planos, sin hifas aéreas.
<i>Actinoplanetas</i>	Los <i>esporoactinomicetos</i> aerobios, inmóviles, las esporas pueden estar encerradas dentro de vesículas; sin micelio aéreo.
<i>Streptomyces</i> y géneros relacionados	<i>Esporoactinomicetos</i> aerobios; forman un sustrato ampliamente ramificado y micelio aéreo.
<i>Thermomonospora</i> y géneros relacionados	<i>Espordactinomicetos</i> aerobios; forman un sustrato ampliamente ramificado y un micelio aéreo, los cuales pueden portar una cadena de esporas; esporas móviles o inmóviles.
<i>Termoactinomicetos</i>	Los filamentos estables producen un crecimiento aéreo. Las esporas individuales (endosporas) se forman en los filamentos aéreos y vegetativos. Todas las especies son termófilas. La pared celular contiene ácido diaminopimélico, pero no tiene aminoácidos ni azúcares característicos.

<i>Otros géneros</i>	Todos ellos producen cadenas de esporas portadoras de crecimiento aéreo.
----------------------	--

Tabla 1. Diferentes grupos de actinomicetos (Mohamed Selim, Abdelrazek Abdelhamid, & Saleh Mohamed, 2021).

Las actinobacterias son el grupo más prolífico en cuanto a la producción de antibióticos; muestran actividades biológicas variadas que pueden ser de tipo antibacteriano, antifúngico, anticancerígeno, antiparasitario o antiviral. Se ha reportado que de los 7.500 antibióticos de origen microbiano descubiertos hasta hoy, más del 50% corresponden a los actinomicetos, y de los cuales un poco más de una centena son comercializados (Tipán Guijarro, 2012), donde cerca del 76% es producido por especies del género *Streptomyces* (Pérez Sosa, 2010), de uso frecuente en clínica humana y/o animal que se han descubierto en los últimos 50 años (Tabla 2) (Parada, Marguet, & Vallejo, 2017)

Streptomyces sp.	<b>Antibiótico</b>
<i>S. orquídea</i>	Cicloserina N
<i>S. orientalis</i>	Vancomicina
<i>S. fradiae</i>	Neomicina, actinomicina, fosfomicina, dekamicina
<i>S. nodoso</i>	Anfotricina B
<i>S. noursei</i>	Nistanina
<i>S. mediterráneo</i>	Rifampicina
<i>S. griseus</i>	Estreptomina
<i>S. knanamyceticus</i>	Kanamicina
<i>S. tenebrarius</i>	Tobramicina
<i>S. spectabilis</i>	Espectinomina
<i>S. viridifaciens</i>	Tetraciclina
<i>S. lincolensis</i>	Lincomicina, clindamicina
<i>S. rimosus</i>	Oxitetraciclina

<i>S. erythraeus</i>	Eritromicina
<i>S. vensuella</i>	Cloranfenicol
<i>S. aureofaciens</i>	Clortetraciclina, dimetilcloro
<i>S. ambofaciens</i>	Espiramicina
<i>S. avermitilis</i>	Avermicina
<i>S. alboniger</i>	Puromicina
<i>S. niveus</i>	Novobicina
<i>S. platensis</i>	Platenmicina
<i>S. roseosporus</i>	Daptomicina
<i>S. ribosidificus</i>	Ribostamicina
<i>S. garyphalus</i>	Cicloserina
<i>S. vinaceus</i>	Viomicina
<i>S. clavuligerus</i>	Cefalosporina

Tabla 2. Lista de algunos antibióticos producidos por *Streptomyces sp* (Mohamed Selim, Abdelrazek Abdelhamid, & Saleh Mohamed, 2021)

### **Infecciones causadas por *Actinobacterias***

Entre las enfermedades causadas por las actinobacterias se encuentra el actinomicetoma, que es una infección granulomatosa crónica causada por diversas bacterias filamentosas, siendo las especies más frecuentes *Nocardia brasiliensis* y *Nocardia asteroides*. Es una enfermedad ocupacional que aparece habitualmente en personas de mediana edad de países tropicales que caminan descalzos, especialmente en México y Brasil (Hernández Bel, Mayorga, & Pérez, 2010).

El agente causal de actinomicetoma, cuyo hábitat más frecuente es el suelo, se introduce mediante un traumatismo percutáneo producido con una espina de planta, (por ejemplo: cactus o planta espinosa), astillas de madera, etc. El estado nutricional, susceptibilidad a la infección, respuesta inmune y tratamiento inicial determinarán que se resuelva la infección o que se instale la entidad, con el cuadro clínico característico ( Sandoval & Serrano, 2003).



Figura 6. Lesión nodular en extremidad inferior por actinomicetoma (Hernández Bel, Mayorga, & Pérez, 2010).

En la tabla 3 se enumeran algunos otros ejemplos de actinomicetos patógenos que afectan al ser humano.

<b>Organismos</b>	<b>Ocurrencia en el hombre</b>	<b>Enfermedad producida</b>
<i>Nocardia asteroides</i>	Generalmente patógeno	Nocardiosis, ocasional micetoma
<i>N. brasiliensis</i>	Generalmente patógeno	Micetoma, ocasionalmente nocardiosis
<i>N. otitidiscaviarum</i>	Generalmente patógeno	Nocardiosis y micetoma
<i>N. farcinica</i>	Raro (Generalmente en animales)	Nocardiosis
<i>Actinomadura madurae</i>	Generalmente patógeno	Actinomicosis
<i>A. pelletieri</i>	Generalmente patógeno	Actinomicosis
<i>Nocardiopsis dassonvillei</i>	Generalmente patógeno	Actinomicosis
<i>Streptomyces somaliensis</i>	Generalmente patógeno	Actinomicosis

<i>Dermatophilus congolensis</i>	Generalmente patógeno en animales	Dermatitis
<i>A. israelii</i>	Generalmente patógeno	Actinomicosis
<i>A. naeslundii</i>	Generalmente patógeno	Actinomicosis

Tabla 3. Actinomicetos patógenos encontrados en especímenes clínicos ( Sandoval & Serrano, 2003)

### Sistemas biosintéticos

Los genomas bacterianos están compuestos por genes, algunos conjuntos de genes se llaman sistemas biosintéticos y son capaces de codificar metabolitos secundarios. Los metabolitos secundarios bacterianos son compuestos orgánicos que no están directamente involucrados en el crecimiento y desarrollo, si no que tienen funciones auxiliares que incluyen la defensa y la comunicación. Los metabolitos secundarios pueden tener actividad antibiótica, antifúngica, anticancerígena, etc. Los sistemas biosintéticos mejor conocidos son los policétido sintasa (PKS) y los sintetetasas de péptido no ribosomales (NRPS). La capacidad de tener genes PKS y NRPS aumenta cuando el tamaño del genoma es mayor, como en las actinobacterias (González Nava, 2021).

Los metabolitos secundarios pueden ser utilizados para el desarrollo de nuevos productos naturales de interés farmacológico. Los productos naturales se sintetizan mediante *clúster* de genes biosintéticos (por sus siglas en inglés, BGC). Estos están contruidos por módulos que catalizan la producción de enzimas especializadas, proteínas reguladoras, transportadoras y de procesamiento. Los sistemas PKS y NRPS producen la mayoría de las moléculas bioactivas (González Nava, et al. 2021).

En las últimas décadas se ha presentado un enorme progreso en investigaciones sobre la biosíntesis de metabolitos secundarios con actividades biológicas, producidos por microorganismos. Hay muchos ejemplos donde la búsqueda por PCR de los genes asociados al metabolismo secundario es usada para evaluar el potencial biosíntesis de metabolitos secundarios en *Actinobacterias*, esto incluye identificar los sistemas PKS y NRPS (Alonso, Carmona, 2017).

La producción de metabolitos secundarios por parte de los actinomicetos, puede ser optimizada bajo diferentes condiciones de cultivo; por lo tanto, los componentes del medio de cultivo y la capacidad metabólica del microorganismo productor influyen la biosíntesis de antibióticos y de los metabolitos secundarios en general (Pérez Sosa, 2010).

## Sistemas PKS

Los sistemas biosintéticos policétidos sintasa (PKS) producen la mayoría de las moléculas bioactivas, estas moléculas codifican enzimas con características muy similares de funciones, las cuales permiten la construcción de estructuras (González Nava, Carmona, Manzanares Leal, Sandoval Trujillo, & Ramírez Durán, 2021).

La biosíntesis de los policétidos se da por la incorporación sucesiva de carbono como unidades de elongación a partir de una unidad iniciadora (Marfil Santana, 2017), las cuales pueden ser: acetil-, propionil- y benzoil-CoA, para así formar una cadena lineal (Hernández Duarte, 2018), ambas unidades son activadas al unirse a una molécula de coenzima A (Malonil- y metilmalonil-CoA), formando los correspondientes tioésteres CoA (Marfil Santana, 2017).

La organización modular de las policétido sintasas está constituida por dominios. En cada módulo siempre están presentes 3 dominios principales: dos dominios catalíticos: aciltransferasa (AT), cetosintasa (KS) y un dominio ACP (proteína transportadora de grupos acilo), responsables de la elongación de la cadena principal del policétido (Hernández Duarte, 2018). Los dominios esenciales son (Del Cerro Sánchez, 2015):

- Dominio cetosintasa (KS): su función es la de catalizar una condensación Claisen descarboxilativa (reacción química orgánica que tiene lugar entre dos ésteres o un éster y una cetona en presencia de una base fuerte, dando lugar a un  $\beta$ -cetoéster o a una  $\beta$ -dicetona) entre el policétido que está siendo sintetizado y una nueva unidad que extiende la cadena (Figura 7). Este dominio genera enlaces C-C y cada ciclo catalítico resulta en la adición de dos carbonos a la cadena creciente si se utiliza una unidad malonil o bien tres carbonos si se utiliza una unidad metilmalonil
- Dominio acil-transferasa (AT): es el encargado de seleccionar y cargar el grupo acilo que extiende la molécula en el dominio ACP durante el ciclo de elongación
- Dominio portador (Acyl Carrier Protein) (ACP): se trata de un dominio pequeño (80-100 residuos) no catalítico que se encarga de sostener, mediante un enlace tioéster, la cadena creciente policetídica así como la nueva unidad encargada de extender dicha cadena



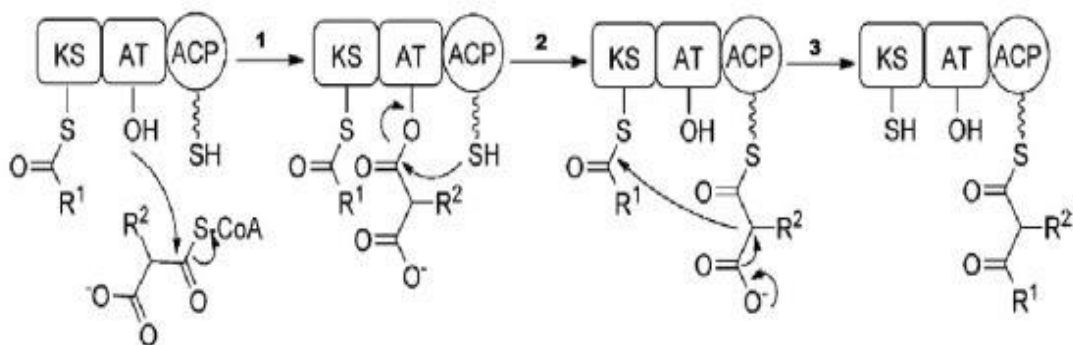


Figura 7. Organización modular del complejo PKS-I. (AT) aciltransferasa, (KS) cetosintasa y ACP (proteína transportadora de grupos acilo) (Marfil Santana, 2017)

Por otro lado, además de estos tres dominios esenciales, existen otros para realizar distintas modificaciones sobre la molécula que está siendo sintetizada: (Del Cerro Sánchez, 2015):

- Dominio tioesterasa (TE): Es capaz de romper el enlace tioéster del dominio ACP catalizando la ciclación o la hidrólisis del sustrato acilo
- Dominio ceto-reductasa (KR): Se encargan de reducir el grupo carbonilo de los intermediarios  $\beta$ -cetoacil-ACP.
- Dominio deshidratasa (DH): se encargan de catalizar reacciones reversibles de deshidratación en los intermediarios  $\beta$ -hidroxi-acil unidos a los dominios ACP. El resultado de esta reacción genera un intermediario acil-ACP  $\alpha$ - $\beta$ -insaturado ya sea en configuración cis o trans.
- Dominio enoil-reductasa (ER): catalizan la reducción de un intermediario enoil-ACP a un acil-ACP  $\alpha$ - $\beta$ -saturado.
- Dominio metil-transferasa (MT): catalizan la transferencia de un grupo metilo desde una adenosilmetionina (SAM o AdoMet) a un átomo de carbono, nitrógeno u oxígeno del residuo que está siendo introducido en la cadena, estos dominios se pueden dividir en C-MT, N-MT y O-MT, respectivamente.

Todas las PKS poseen la actividad  $\beta$ -ceto sintasa. En algunos sistemas biosintéticos, los llamados dominios portadores (ACP), se encuentran en proteínas distintas a las que contienen el dominio catalítico. En estos casos, estas proteínas actúan en trans para acabar formando complejos para las elongaciones de la cadena de acilos. Sin embargo, existen otros sistemas en los que los dominios portadores se encuentran en la misma proteína que los dominios catalíticos fusionados en cis, formando módulos y haciendo posible la generación de una línea de ensamblaje. Los PKS se han clasificado de acuerdo con la organización de sus

dominios enzimáticos, así como con la naturaleza de las unidades de elongación . De esta manera, se clasifican en PKS tipo I, tipo II y tipo III (Marfil Santana, 2017).

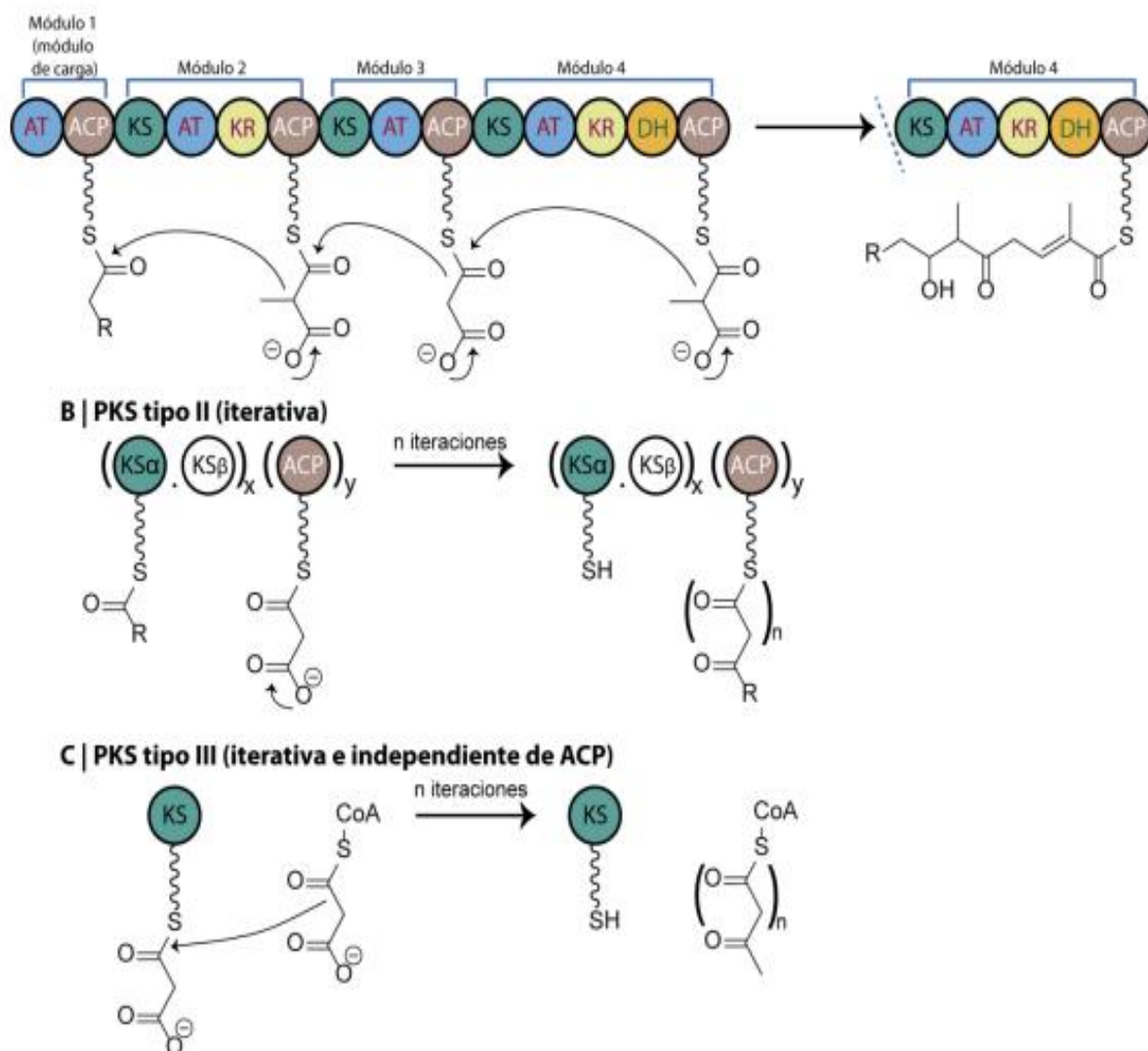


Figura 8. Esquema del funcionamiento de los tres tipos de PKS (Del Cerro Sánchez, 2015).

En la Tabla 4 se muestran algunos de los ejemplos más conocidos de compuestos y su función bioactiva, los cuales son sintetizados por el sistema PKS.

Compuesto	Bioactividad
Eritromicina	Antibiótico
Oleandomicina	Antibiótico
Dinamicina	Antibiótico
Puromicina	Antibiótico
Rifamicina	Antibiótico
Rampamicina	Posee actividad inmunosupresora en trasplantes de órganos
FK506 y FK520	Inmunosupresores
Nistatina	Antifúngico
Pimaricina ó Natamicina	Antifúngico
Anfotericina	Antifúngico
Espinosina	Insecticida
Avermectina	Antihelmíntico e insecticida

Tabla 4. Bio-actividad de los compuestos sintetizados por el sistema PKS, fuente: (Alonso, Carmona, 2017)

## Sistemas NRPS

Los sistemas de sintetasa de péptidos no ribosomales (NRPS) son compuestos por un grupo de genes que codifican para módulos con múltiples actividades enzimáticas. Cada módulo está formado por 1,000-1,100 aminoácidos de largo y están compuestos por dominios responsables de la incorporación de una unidad monomérica del péptido (figura 9). (González Nava, 2021).

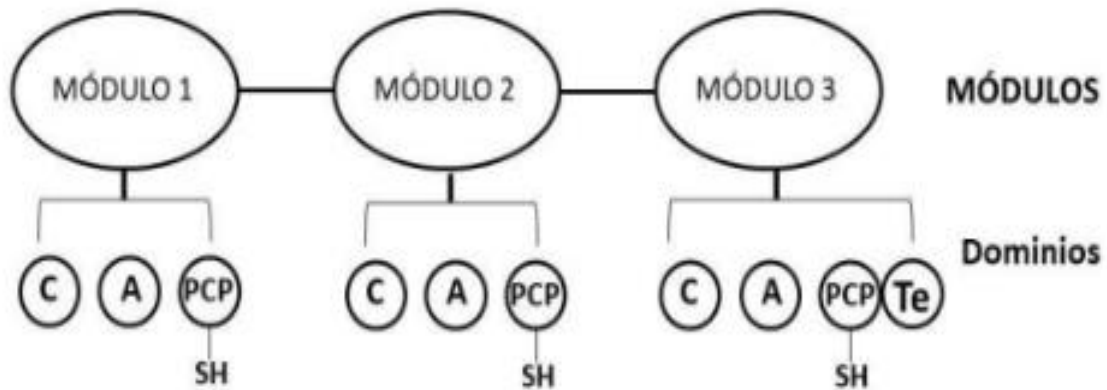


Figura 9. Módulos que comprende a los sistemas NRPS: contienen tres dominios básicos (C, A y PCP), y en algunos casos dominios auxiliares (Te, E, M, Cy y Ox), (González Nava, 2021).

La composición de cada módulo está constituida por tres dominios catalíticos, los cuales, son necesarios para un completo ciclo de elongación en la síntesis de péptidos catalizados por un NRPS. Estos dominios son (Alonso, Carmona, 2017):

- a) Adenilación (A): Es responsable del reconocimiento y activación del aminoácido relacionado al ácido hidroxilo
- b) Acarreador-peptidil (PCP): Actúa después que el sustrato es activado para transferencia y activación del acarreador-peptidil del mismo módulo.
- c) Condensación (C): Este dominio es responsable de la formación del enlace carbono nitrógeno entre la cadena larga y el aminoácido activado .

Para completar cada módulo es necesaria la presencia de dominios auxiliares, como (Alonso, Carmona, 2017):

- d) Epimerización (E): Este dominio cambia un L-aminoácido ácido en un D-aminoácido, así como el dominio de doble/epimerización que son responsables tanto de la epimerización y la condensación.
- e) Ciclación (Cy): Estos dominios pueden reemplazar a los dominios responsables de la incorporación de cisteína, serina o treonina.
- f) Dominio de oxidación (Ox): Cataliza la formación de un tiazol aromático a través de la oxidación de un anillo de tiazolina.
- g) Dominios tioesterasa (TE): Se encuentran normalmente en el módulo final y libera el péptido final producido de la enzima a través de ciclación o la hidrólisis.

Existen tres tipos de NRPS que dependen del tipo de biosíntesis que producen (González Nava, 2021):

- NRPS tipo A lineal. El número y secuencia de los módulos es co-lineal al número y orden de los aminoácidos en el péptido (Figura 10).

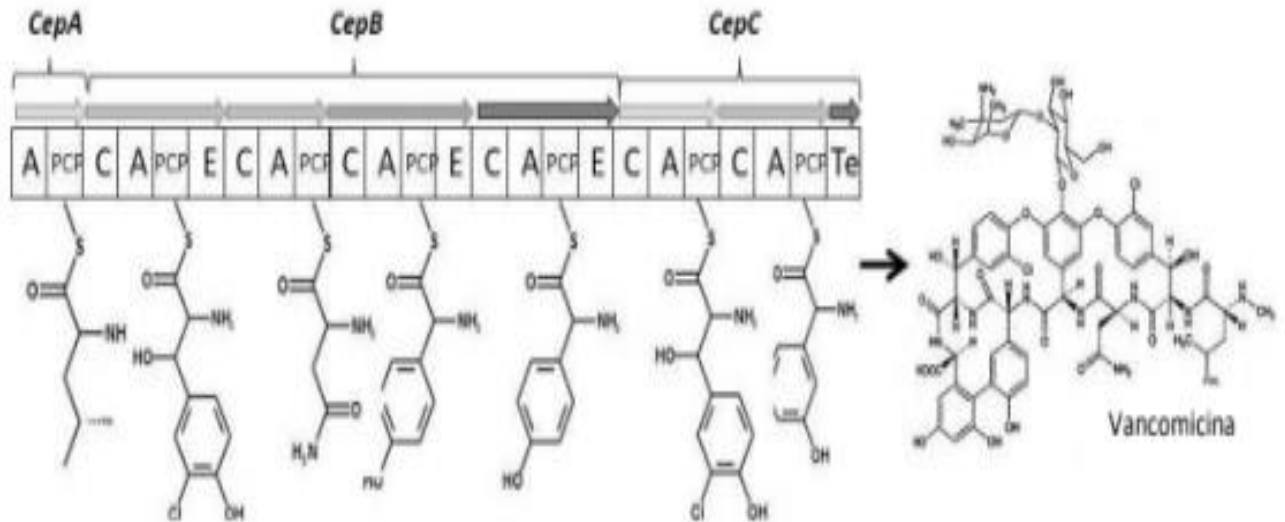


Figura 10. Biosíntesis lineal de la vancomicina. Los genes (CepA, CepB y CepC) hechos por módulos (flechas) que contienen módulos (A, PCP, C, E y Te) sintetiza una porción del producto final (González Nava, 2021)

- NRPS tipo B iterativo. Los módulos y dominios son usados más de una vez para sintetizar el péptido, lo cual, consiste de varias secuencias (Figura 11).

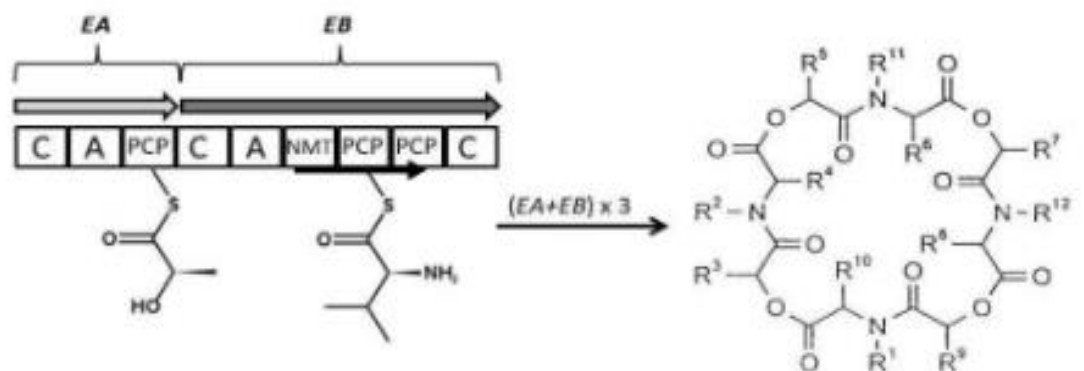


Figura 11. Biosíntesis iterativa de la micotoxina eniatina; la síntesis de cada estructura primaria se lleva a cabo tres veces para crear el metabolito (González Nava, 2021).

- > NRPS tipo C no lineal. Genera péptidos en los cuales la secuencia de los aminoácidos no está correlacionada al acomodo de los módulos(Figura 12).

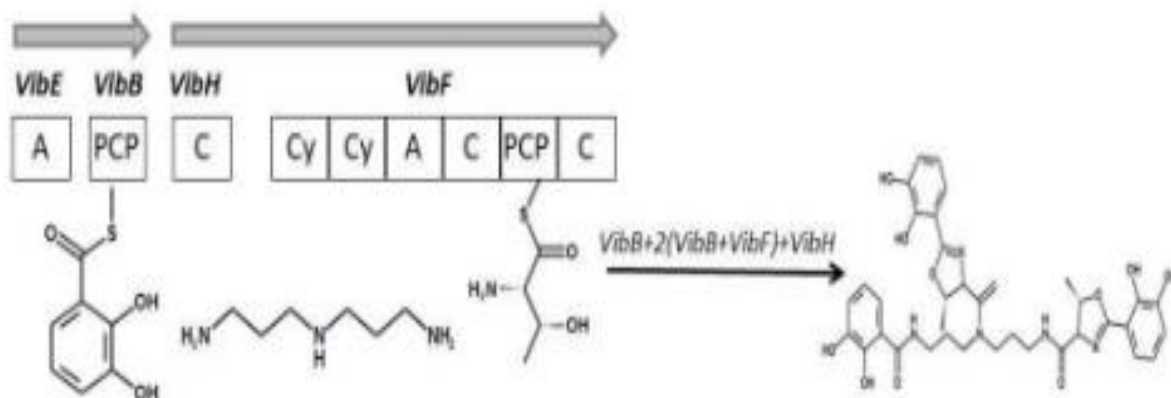


Figura 12. Biosíntesis no lineal del sideróforo vibriobactina. Se pueden repetir los procesos al azar para formar el producto final (González Nava, 2021).

En la Tabla 5 se muestran algunos de los ejemplos más conocidos de compuestos sintetizados por el sistema NRPS y su actividad

Compuesto	Bio-actividad
Cloroeremomicina	Antibiótico
Pristinamicina	Antibiótico
Cefamicina	Antibiótico
Balimicina	Antibiótico
Vancomicina	Antibiótico
Ciclosporina	Inmunosupresor.
Rapamicina y FK506 (Tacrolimus)	Inmunosupresor.
Actinomicina ó Dactinomicina	Tratamiento para quimioterapia
7-aminoactinomicina D	En tinciones para microscopía y en cartometría de flujo.
Epotilona	Citostático.

Tabla 5. Bio-actividad de los compuestos sintetizados por el sistema NRPS, fuente: (Alonso, Carmona, 2017)

## Identificación de actinobacterias

El estudio de la morfología de los actinomicetos se basa principalmente en las características macroscópicas y microscópicas del microorganismo, por otra parte se utilizan las pruebas bioquímicas para estudiar su metabolismo y las pruebas moleculares para estudiar los genes (González Jiménez, 2010)

Para llevar a cabo estudios de caracterización morfológica, es necesario tener en cuenta diversos parámetros como la estructura del micelio, la forma, ramificación y fragmentación de las hifas, la forma de la colonia, criterios bioquímicos, sensibilidad a determinados antibióticos, etc (González Jiménez, 2010).

Las técnicas moleculares han aportado a la taxonomía una reclasificación bacteriana, demostrando una mayor diversidad dentro de la familia *Actinomycetaceae*, especialmente dentro del género *Streptomyces*, el cual difiere mucho en su morfología, fisiología, bioquímica y actividades como productores de antibióticos (González Jiménez, 2010).

La amplificación del marcador molecular presente en el gen rRNA 23S, es un ejemplo de una técnica molecular que sirve para verificar la pureza de las cepas, debido a que todas las *Actinobacterias* amplifican un inserto del gen de 350pb y las eubacterias de 250pb (González Nava, 2021).

## Herramientas bioinformáticas para la búsqueda de sistemas biosintéticos

Desde que se secuenciaron los primeros genomas bacterianos, el interés por descubrir nuevos productos naturales ha aumentado, lo que ha llevado a muchos investigadores a desarrollar técnicas de biología molecular y herramientas bioinformáticas para la predicción de BGC (González Nava, Carmona, Manzanares Leal, Sandoval Trujillo, & Ramírez Durán, 2021).

Las herramientas bioinformáticas comparan miles de genes y genomas completos para predecir sus estructuras moleculares. Las herramientas bioinformáticas generalmente usan cortes seleccionados para identificar genes o dominios con precisión en un grupo de secuencias alineadas para detectar clases conocidas de vías biosintéticas. Algunos BGC son rápidamente detectados, como los sistemas PKS y NRPS (González Nava, Carmona, Manzanares Leal, Sandoval Trujillo, & Ramírez Durán, 2021).

Se conocen muchas rutas biosintéticas y la predicción la confiabilidad es alta en los programas de bioinformática como los antibióticos y el metabolito secundario, estos sistemas codifican enzimas de las mismas familias, como oxidoreductasas,

metiltransferasas, ligasas y citocromo P-450, también codifican operones (González Nava. et al, 2021) La Tabla 6 describe algunos programas de bioinformática utilizados en el análisis de genes y genomas para buscar metabolitos que están disponibles gratuitamente.

Base de datos	Características
AntiSMASH	Identificación, anotación y análisis de genes de biosíntesis de metabolitos secundarios en genomas bacterianos y fúngicos
NP.searcher	Exploración de secuencias de genomas procarióticos en busca de policétidos, péptidos no ribosomales y productos naturales de combinación mixta
ClustScan	Búsqueda de enzimas biosintéticas PKS, NRPS y PKS/NRPS híbridas; muestra estructuras químicas pronosticadas a partir de procariotas, animales invertebrados y ADN metagenómico
MultiGeneBlast	Búsqueda de homología(relación) con operones o grupos de genes como unidades básicas en lugar de genes individuales
MIBiG	Base de datos de genes biosintéticos y sus productos naturales.
DoBISCUIT	Integración de información bibliográfica actual; proporciona descripciones estandarizadas de genes, módulos y dominios relacionados con grupos de genes.
ClusterMine360	Base de datos de grupos de genes procarióticos PKS y NRPS.
ChEBI	Búsqueda de información enfocada en inmunología y productos naturales. Es un diccionario de entidades moleculares, pequeños compuestos químicos, productos naturales o sintéticos utilizados en los procesos de los organismos.
ChEMBL	Recopilación de datos químicos, genómicos y de bioactividad para traducir la información genómica en nuevos fármacos eficaces.



KNApSack	Centrado en la investigación en metabolómica (estudio de sustancias llamadas metabolitos presentes en las células y los tejidos), nutrigenómica (estudio de la influencia de los nutrientes en la expresión de genes) y ómica de los alimentos, también puede desarrollar nuevos fármacos y materiales.
NRPSpredictor	Predicción de dominios NRPS tipo A bacterianos y fúngicos.
NORINE	Completamente dedicado al análisis NRPS.
StreptomeDB	Búsqueda de información sobre estructuras moleculares producidas por <i>Streptomyces</i> .

Tabla 6. Softwares utilizados para la búsqueda y análisis de BGC (González Nava. et al , 2021).

## Cepas de estudio

El laboratorio de Producción de Biológicos de la UAM Xochimilco cuenta con una colección de actinomicetos obtenidas de diferentes fuentes, la colección de cepas que se trabajó en el presente estudio fueron las clasificadas bajo el nombre de “serie 4000”, aisladas de casos clínicos, las cuales anteriormente fueron identificadas dentro del género *Nocardia*.

Las cepas de estudio fueron proporcionadas por el laboratorio 202 ubicado en el edificio N de la UAM-Xochimilco.

La recolección de diferentes cepas de actinomicetos del laboratorio de Producción de Biológicos de la UAM Xochimilco data de hace más de 30 años y su función principal es la conservación *ex situ* (González Nava, 2016), cuyo principal objetivo es mantener la supervivencia a través de un proceso en el que se protege a una especie fuera del ambiente en el que habita. Esta conservación de biodiversidad de actinomicetos ha sido de gran importancia y estudio de diferentes proyectos de investigación, proyectos escolares, docencia y tesis de licenciatura, maestría y doctorado (González Nava, 2016).

## PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La adecuada clasificación y detección de microorganismos patógenos dará un mayor grado de confiabilidad al tratamiento contra estos mismos, cuando no se conoce el agente causal de una enfermedad se dispone al paciente a un tratamiento empírico, esto es un problema, ya que podría llevar a un mal diagnóstico

perjudicando su bienestar, cuanto antes se inicie el tratamiento con antimicrobianos adecuados, mayor será la posibilidad de beneficiar al paciente.

Las actinobacterias son el grupo de producción de metabolitos secundarios bioactivos mayormente utilizado en beneficio de la salud, como la síntesis de antibióticos, antifúngicos, antiparasitarios, etc. El descubrimiento de nuevos metabolitos secundarios no solo radica en la obtención de compuestos que puedan conducirse de una mejor manera en un tratamiento sino en el posible reemplazo de medicamentos que hayan sido suspendidos debido a la resistencia microbiana a estos. Por ello es que la predicción y descubrimiento de nuevos metabolitos secundarios de interés farmacológico resulta ser importante.

Gracias al desarrollo en biología molecular ha sido posible el descubrimiento de nuevas especies o el correcto agrupamiento de especies mal clasificadas; esto ha permitido un mejor conocimiento de la biología de cada especie, sus aspectos patogénicos, epidemiología, un mejor diagnóstico y tratamiento en clínica, aplicaciones en biotecnología y más.

## **JUSTIFICACIÓN:**

La identificación de actinobacterias es importante debido a que son el grupo más prolífico en cuanto a la producción de antibióticos; muestran actividades biológicas variadas que pueden ser de tipo antibacteriano, antifúngico, anticancerígeno, antiparasitario o antiviral, debido a que contienen genes biosintéticos capaces de codificar productos naturales que se pueden utilizar en clínica humana y veterinaria, en la industria de alimentos, en agricultura y en biotecnología. La búsqueda de moléculas activas, a partir de Actinobacterias, es esencial para el desarrollo de fármacos, enzimas utilizadas en biodegradación, productos usados como control biológico, etc.

En este estudio se analizaron 19 cepas de actinobacterias de origen clínico para buscar los sistemas PKS-I y NRPS-I para predecir la producción de metabolitos biosintéticos, para ello se estandarizó una técnica de identificación de dichos sistemas con la Go Taq® G2 Green Master Mix de la marca PROMEGA.

## **OBJETIVOS:**

### **General:**

Realizar un análisis taxonómico de actinobacterias y detectar los sistemas biosintéticos NRPS1 y PKS1 en las cepas de estudio.

### **Específicos:**

1. Estandarizar los sistemas biosintéticos NRPS-I y PKS-I para actinobacterias de origen clínico y ambiental.
2. Detectar sistemas biosintéticos PKS-I NRPS-I en las 19 cepas de actinobacterias

3. Identificar el género de las actinobacterias con capacidad biosintética

### **METODOLOGÍA:**

#### **Activación y siembra de cepas**

Se prepararon medios de cultivo de medio Agar Dextrosa Sabouraud complementado con papa al 1%, la preparación fue la siguiente:

- Disolver 65g del medio Agar Dextrosa Sabouraud deshidratado (marca BD Bioxon) en un litro de agua destilada,
- Calentar agitando frecuentemente y hervir durante un minuto.
- Esterilizar a 118-121°C por 15 minutos.
- Distribuir el medio en cajas Petri y dejar gelificar.

Se prepararon medios de cultivo Sauton, por cada Litro de agua destilada se agrega:

- 4g Asparagina
- 2 g Ácido cítrico
- 0.5 g  $MgSO_4$ (sulfato de magnesio)
- 0.5 g  $K_2HPO_4$ (Fosfato dipotásico)
- 1000  $\mu$ L de una solución de 0.05g/mL citrato férrico amoniacal
- 1000  $\mu$ L de solución de Sales de Sauton
- 60 mL de Glicerina
- Regular con NaOH hasta un pH de 7.4-7.8
- 1% Hojuelas de papa
- 1.5 % Carbón activado
- 1.5% Agar bacteriológico
- Calentar agitando frecuentemente
- Esterilizar a 118-121°C por 15 minutos.
- Distribuir el medio en cajas Petri y dejar gelificar.

Las cepas se sembraron por estría cruzada en las placas de ambos medios de cultivo y se incubaron a 37°C hasta su crecimiento.

## Pruebas bioquímicas

Las pruebas bioquímicas sirven para conocer el metabolismo de microorganismo a analizar.

Primero se transfirió biomasa de las cepas a una solución salina fisiológica (SSF) de 0.8% con perlas de vidrio, se sometió a vortex, en donde ya obtenida una solución visiblemente “translúcida, densa” se procedió a la realización de las pruebas bioquímicas automatizadas y estandarizadas API® 20E y API® 20NE.

Cada prueba se realizó de la siguiente manera (González Nava, 2016):

### API 20E

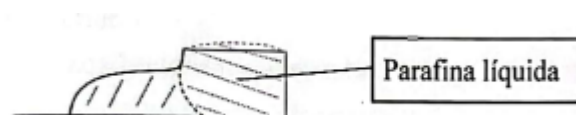
1. Se agregó agua destilada en los alvéolos para crear ambiente húmedo.
2. Se agregó la suspensión bacteriana con referencia a 1 McFarland en los tubos de la galería evitando formar burbujas al fondo del tubo
  - Para las pruebas CIT, VP Y GEL se llenó el tubo y la cúpula



- Para las demás pruebas se llenó sólo los tubos



- Para las pruebas ADH, LDC, ODC, H<sub>2</sub>S y URE se llenó la cúpula con aceite de parafina para crear ambiente anaerobio



3. Se cerró la cámara e incubó a 37°C por 2 días

4. Se realizó la lectura e interpretó de acuerdo con la tabla del instructivo
- Se agrego una gota de reactivo TDA a la prueba TDA. Un color rojo-marrón indicó positivo
  - Se agrego una gota de reactivo JAMES a la prueba de IND. Un color rosa indicó positivo.
- Esta prueba se realizó al final por posible desprendimiento de gases
- Se agrego una gota de reactivo VP1 y VP2 a la prueba VP y esperamos 10 min. Un color rosa-rojo indicó positivo, si aparece 10 minutos después es negativo
5. Las pruebas que no se encuentren bien definidas se incubaron 24horas más y posteriormente se realizó la lectura sin agregar nuevamente reactivos.
- En los ensayos complementarios(reducción de nitratos y nitritos así como formación de nitrógeno). Se agrego una gota de reactivos NIT 1 y NIT 2 en la prueba GLU y esperamos de 2 a 5 min.
  - Un color rojo indicó positivo ( $\text{NO}_3$ )
  - Un color amarillo o presencia de microburbujas indicó negativo( $\text{N}_2$ ) y se agregó de 2 a 3 mg de Zinc en la prueba GLU y esperamos 5 minutos, amarillo indicó positivo ( $\text{N}_2$ ), si cambio a naranja-rojo indicó negativo( $\text{NO}_2$ )

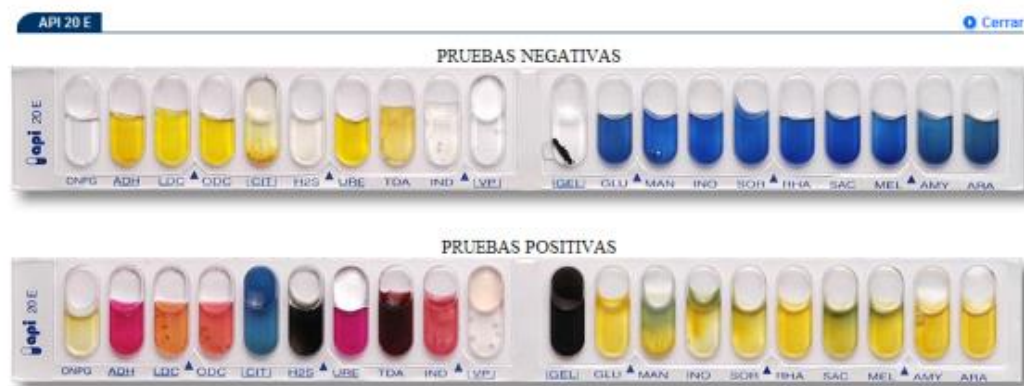
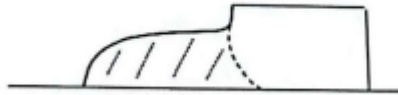


Figura 13. Resultados positivos y negativos de la prueba API20E

### API 20NE:

1. Se agrego agua destilada en los alveolos para crear ambiente húmedo.
2. Se rellenaron los tubos de  $\text{NO}_3$  a PNPG con la suspensión bacteriana de patrón 0.5 de McFarland.



- Se transfirieron 200 microlitros de suspensión McFarland en la ampolla API AUX Medium.
- Se rellenaron los tubos y cúpulas desde GLU a PAC.



- Se rellenaron con aceite de parafina los ensayos GLU, ADH y URE para crear ambiente anaerobio.

3. Se cerro la cámara e incubó por 2 días.
4. Se realizó la lectura y se interpretó de acuerdo con la tabla del instructivo.

- Se anotaron los ensayos convencionales (GLU, ADH, URE, ESC, GEL y PNPG).
- Se añadió una gota del reactivo NIT1 y NIT2 en la cúpula de  $\text{NO}_3$  después de 5 minutos un color rojo nos indicó positivo. Si fue negativo, se agregó 2-3 mg de reactivo Zinc en la cúpula de  $\text{NO}_3$  después de 5 min incoloro indico positivo, un color rosa-rojo indico negativo.
- Se añadió una gota de reactivo JAMES en TRP, un color rosa en toda la cúpula indico positivo(solo se deben leer 24hr después).
- En los ensayos de asimilación una cúpula indico positivo.

5. Las pruebas que no se encontraron bien definidas se incubaron 24 horas más y posteriormente se realizó la lectura.



Figura 14. Resultados positivos y negativos de la prueba API20NE

### Sensibilidad a antibióticos

1. Se depositaron biomasa de la cepa a analizar en una SSF 0.9% con perlas de vidrio, se sometió a vortex 2 minutos, posteriormente se agregó 1 mL en medio Agar Dextrosa Sabouraud 1% papa (ADS 1% p)
2. Se colocaron los siguientes discos con antibióticos comerciales sobre las placas de petri con la actinobacteria sembrada.

- DC Dicloxacilina
- AM Ampicilina
- PE Penicilina
- CF Cefalotina
- CFX Cefotaxima
- CPF Ciprofloxacino
- CLM Clindamicina
- GE Gentamicina
- TE Tetraciclina
- VA Vancomicina
- E Eritromicina
- SXT Sulfametoxazol /Trimetoprima
- B Bacitracina

- CB Carbenicilina
- PIP Piperacilina
- S Estreptomicina
- AN Amikacina
- RA Rifampicina
- AMC Amoxicilina +Ácido clavulánico
- MA Cefamandol
- CAZ Ceftazidima

3. Se marcó sobre la caja en donde se observó un halo de inhibición.

### Análisis fenotípico

1. Las bacterias por ser clasificadas se analizaron a través de pruebas bioquímicas y morfológicas. En seguida se creó una matriz de datos en el programa Excel donde las propiedades positivas se reportaron como “+” y las negativas como “-“ como se muestran de la siguiente manera:

	A	B	C	D	E	F	G	H	I
1	-	+	+	+	+	+	-	-	+
2	+	-	+	+	-	+	+	+	+
3	+	+	+	+	+	+	+	+	+
4	+	-	+	-	+	+	+	+	-
5	+	+	+	+	-	-	-	-	+
6	-	-	+	+	+	-	+	+	-
7	+	+	+	+	-	+	-	-	+
8	+	-	+	-	+	-	+	+	-
9	-	+	-	+	+	-	+	+	-
10	-	-	+	-	+	+	+	+	-

Figura 15. Matriz de datos de las pruebas bioquímicas



2. Cada una de las cepas con cada una de las restantes utilizando el programa NTSYS (Numeral Taxonomy System) el cual hace lo siguiente: las propiedades entre cada par de cepas en comparación se les estableció un valor numérico, las propiedades iguales en cada cepa tuvieron valor de “uno” y las propiedades que no fueron iguales se les estableció un valor de “cero”

		Cepa 1	
		+	-
Cepa 2	+	a 1	b 0
	-	c 0	d 1

Figura 16. Resultado posible de una cepa

- El grado de semejanza fue determinado por el coeficiente de similitud simple (Ssm).

También puede expresarse como:

Donde  $\Sigma a$  es el número de caracteres positivos(+) compartidos entre dos cepas,  $\Sigma d$  es el número de caracteres negativos(-) compartidos y “n” el número total de caracteres.

- A partir del %Ssm se realiza una matriz de similitud no jerarquizada que posteriormente se reorganizara en grupos con base en el Ssm mas alto, a esto se le llama “Análisis de grupo”

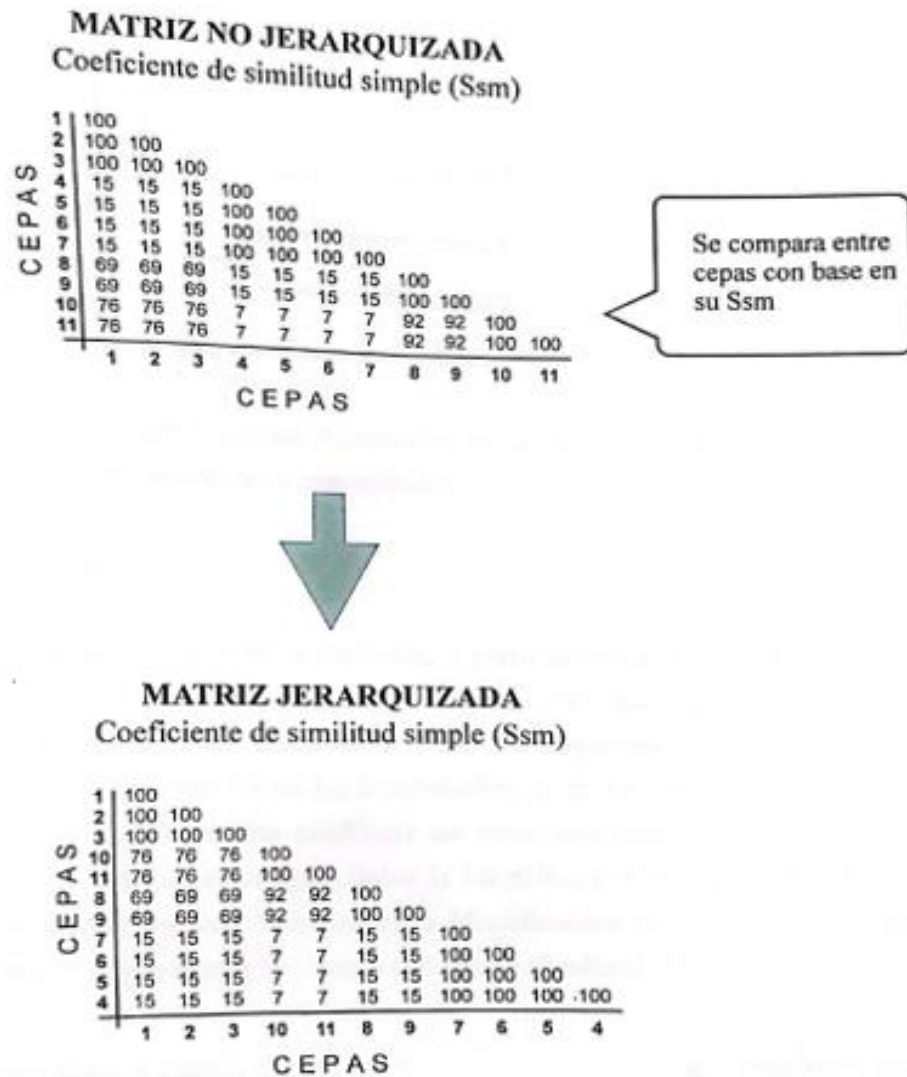


Figura 17. Matriz de semejanza entre cepas dependiendo de su Ssm

- Cada cepa se extrajo de la matriz en el nivel más alto de similitud de acuerdo con cualquier otra cepa formando núcleos(clusters) de grupos, a esto se le llama “dendrograma”
- En el dendrograma final nos permite analizar los datos obtenidos con las pruebas bioquímicas y resolver el problema de clasificación con base a asociaciones o similitudes entre miembros del mismo o diferente cluster (González Nava, 2016).

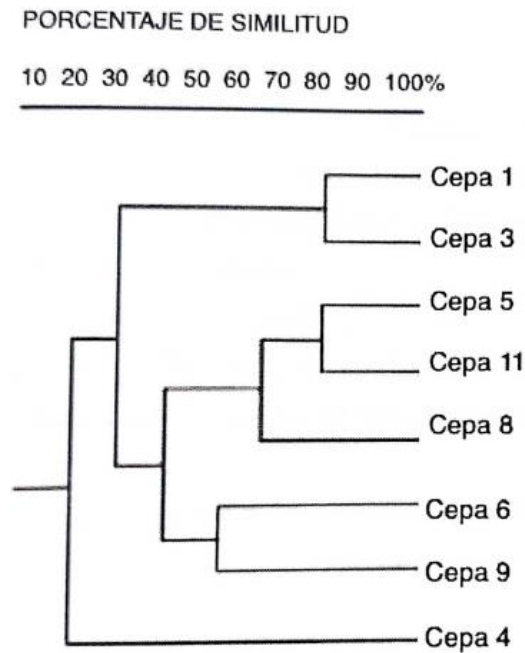


Figura 18. Ejemplo de dendrograma. Agrupación de cepas a partir de las matrices jerarquizadas

## Extracción de ADN

Se llevó a cabo siguiendo el protocolo especificado por el fabricante del kit Promega Wizard® del laboratorio Genomic (González Nava, 2021).

- Se resuspendieron las células con 480  $\mu$ l de EDTA 0.5 M en un tubo eppendorf de 2 ml.
- Se adicionó 120  $\mu$ l de lisozima y se mezcló cuidadosamente.
- La muestra se incubó a 37°C por 1 hora, se centrifugó a 14000 rpm durante 2 minutos y se removi6 el sobrenadante.
- Se agregó 600  $\mu$ l de solución de lisis nuclear de paquete de purificación de ADN y se mezcló.
- Se incubó a 80°C durante 5 minutos en baño María y se dejó enfriar a temperatura ambiente.
- Se adicionó 3  $\mu$ l de solución de RNAsa y se mezcló por inversión del tubo por 3 veces.
- Se incubó el tubo a 37°C por 1 hora, y se dejó enfriar a temperatura ambiente.

- 200 µl de solución de precipitación de proteínas se añadió y agitó con vortex durante 20 segundos.
- Se incubó la mezcla en hielo durante 5 minutos.
- Posteriormente se centrifugó a 14000 rpm por 3 minutos y se transfirió el sobrenadante a un tubo eppendorf de 1.5 ml estéril el cual contenía 600 µl de isopropanol
- Después se mezcló suavemente hasta que se observó la formación de hebras de DNA.
- Se centrifugó a 14000 rpm durante 2 minutos
- Fue drenado cuidadosamente el tubo en papel absorbente.
- Se adicionó 600 µL de etanol al 70% y se agitó varias veces el tubo delicadamente cuidando de no despegar el pellet de DNA.
- Se centrifugó a 14000 rpm durante 2 minutos, se eliminó cuidadosamente el etanol y se dejó secar al aire de 10 a 15 minutos.
- Finalmente, se agregó 100 µl de solución de rehidratación y fue colocado en refrigeración a 4°C por una noche.

### **Amplificación del gen 23S**

La amplificación del inserto del gen de rRNA ubicado en la subunidad mayor del ribosoma bacteriano, es un biomarcador que sirve para la identificación del grupo actinobacteria, cuya amplificación mediante PCR es visualizada en una electroforesis a 350pb.

En esta técnica son utilizados 2 cebadores:

- 23S Insf, 5'-(AC)A(AGT)GCGTAG(AGCT)CGA(AT)GG-3'
- 23S InsR 5'-GTG(AT)CGGTTT(AGCT)(GCT)GGTA-3'.

Las condiciones de PCR fueron: un ciclo de pre-desnaturalización durante 5 minutos (94 °C); desnaturalización, 30 segundos (94 °C); acoplamiento, 45 segundos (46 °C); elongación, 50 segundos (72 °C); repetir 29 ciclos y un ciclo de post elongación

de 5 minutos a (72 °C). Los fragmentos amplificados se observaron en un gel de agarosa al 1.5% teñido con bromuro de etidio (Karam Calderón, Zaragoza Bastida, Bustamante Montes, Sandoval Trujillo, & Ramírez Durán, 2014).

### **Amplificación de los sistemas PKS1 y NRPS1**

La amplificación de estos *clusters* es necesaria para conocer si la actinobacteria será capaz de producir productos bioactivos. Para la estandarización de la amplificación del sistema PKS-I y NRPS-I se utilizaron diferentes concentraciones de Taq® G2 Green Master Mix, DNA, agua libre de nucleasas y de los primers correspondientes para cada sistema.

Los primers utilizados para la amplificación del sistema PKS1 fueron los siguientes (González Nava, 2021):

- K1f(5'-TSAAGTCSAACATCGGBCA-3')
- M6r(5'-CGCAGGTTSCSGTACCAGTA-3')

En donde el tamaño del gen es de 1100-1200pb

En el caso de los NRPS-I, los primers utilizados fueron:

- A3f (5'-GCSTACSYSATSTACACSTCSGG-3')
- A7r (5'-SASGTCVCCSGTSCGGTAS-3')

En donde el tamaño del gen es de 700-800pb

Para la amplificación de los sistemas biosintéticos PKS1 y NRPS1 se utilizó la Go Taq® G2 Green Master Mix.

### **Identificación de las actinobacterias con capacidad biosintética**

Utilizando el programa NTSYS, las actinobacterias anteriormente identificadas por biología molecular y a quienes se les realizaron las mismas pruebas bioquímicas que las cepas de estudio fueron utilizadas como cepas de referencia. Las cepas de estudio se utilizaron en el análisis para crear agrupaciones con relación al género y la especie de la actinobacteria con mayor similitud de características fenotípicas respecto las de referencia, realizando un dendrograma que expusiera esas similitudes y así su identificación.

Los datos de las actinobacterias ya identificadas fueron recabados de la tesis doctoral de González Nava, 2021.

## Predicción de metabolitos secundarios

Utilizando la base de datos del NCBI, se obtuvo la secuencia de referencia del genoma de especies de actinobacterias que se utilizaron en el dendrograma fenotípico. Con el número de referencia se buscó en el software AntiSMASH los metabolitos secundarios que codifican esos genomas de referencia para predecir los compuestos bioactivos que pueden producir las especies bacterianas de nuestras cepas de estudio.

En el programa AntiSMASH es posible visualizar el total de clusters biosintéticos de una especie bacteriana, así como las regiones en donde se ubican, el metabolito que sintetizan y el porcentaje de identidad de dicho metabolito respecto a otras bases de datos.

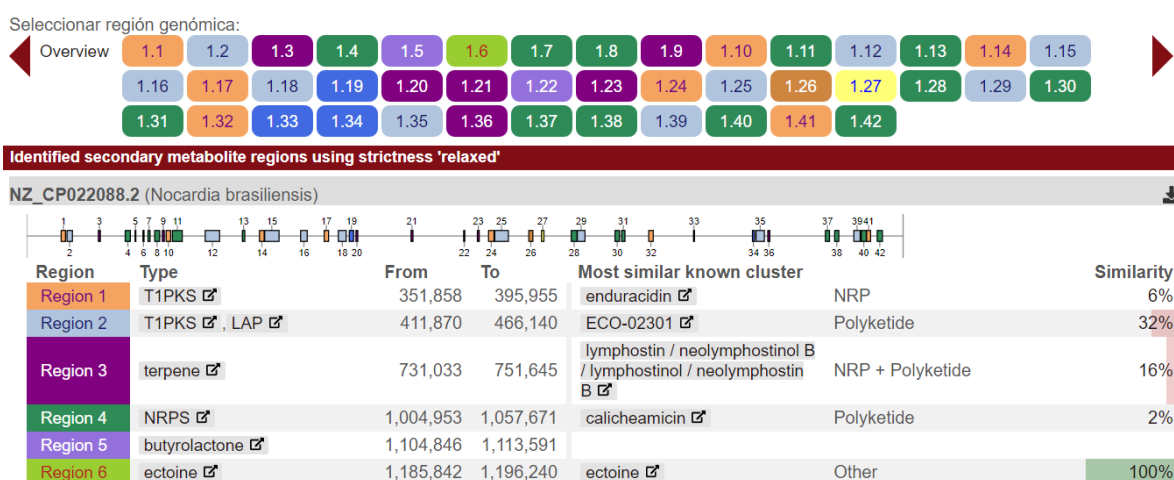


Figura 19. Predicción de metabolitos secundarios de Nocardia Brasiliensis utilizando AntiSMASH

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El crecimiento de las cepas de estudio es lento, así como la mayoría de las actinobacterias, crecieron en un periodo de 11-34 días.

En cuanto a sus características microscópicas se observó que todas son gram positivas, la forma más común fueron hifas que ramifican e hifas que fragmentaban.

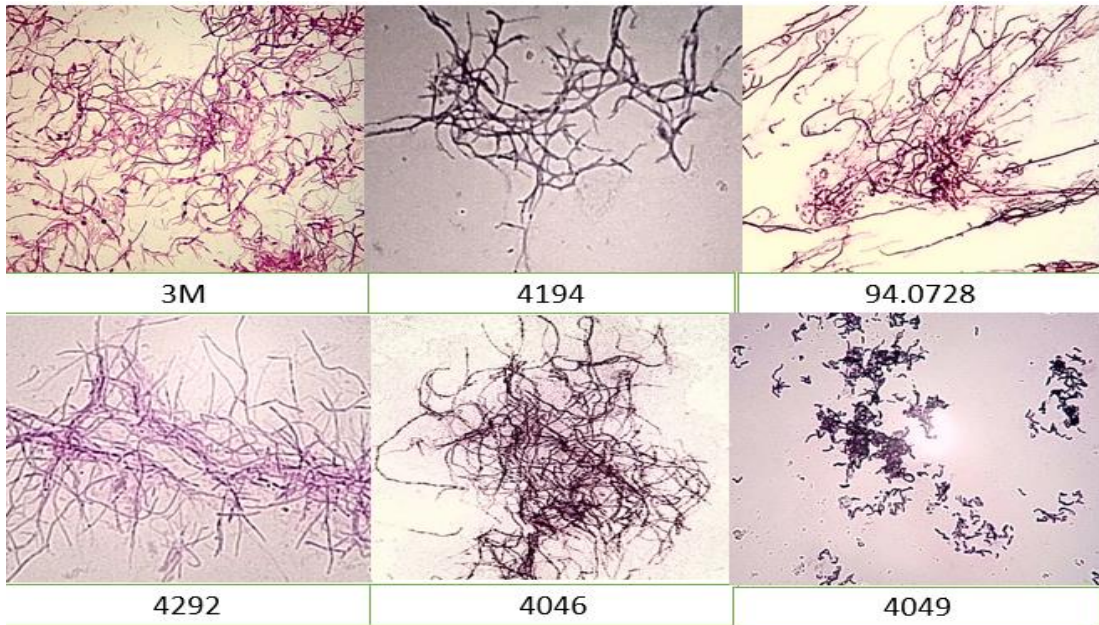


Figura 20. Microscopia de algas de las cepas de origen clínico

En la morfología macroscópica se pudo observar variabilidad en el color, la forma y el tamaño, el crecimiento temprano en la mayoría de las colonias es de color amarillo o naranjado, sin embargo este puede cambiar a tonos mas oscuros mientras envejece el cultivo; algunas cepas presentaron en la superficie un color blanco polvoso, referente al micelio aéreo de las colonias.



Figura 21. Crecimiento colonial de algunas cepas de origen clínico.

Las pruebas bioquímicas nos permitieron conocer las necesidades nutricionales de nuestras cepas de estudios.

Se realizaron las modificaciones del protocolo para las pruebas bioquímicas utilizadas por González Nava, 2016 para la aplicación de las pruebas API 20E y API 20NE en actinobacterias.



Figura 22. Ejemplo de galerías. Resultado de dos pruebas bioquímicas automatizadas a 48hr de su realización e incubación de la cepa 4270

Las pruebas de sensibilidad a antibióticos nos proporcionan información acerca de la sensibilidad y resistencia de dicha bacterias a ciertos antibióticos, se observó que la sensibilidad cambia entre cada cepa, a pesar de ser el mismo genero.



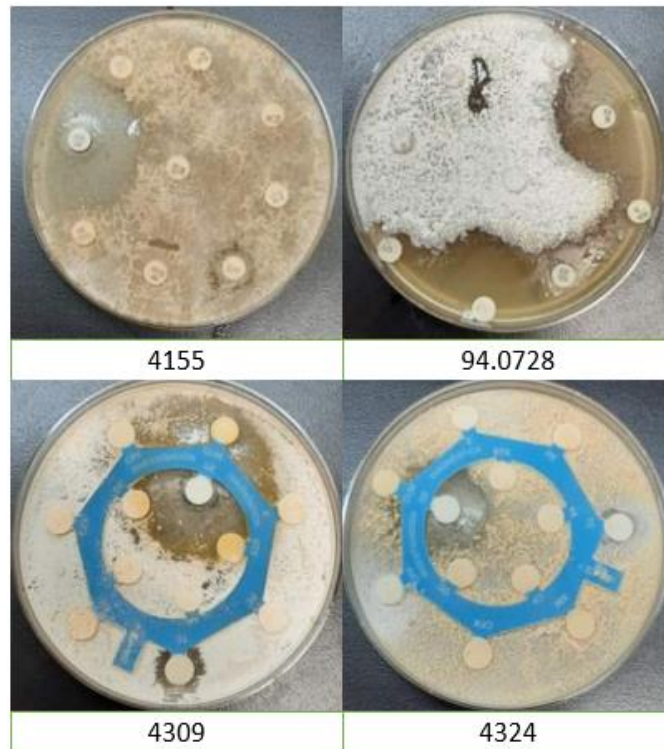


Figura 23. Ejemplos de la prueba de sensibilidad a antibióticos. Los halos de inhibición representan la sensibilidad de la cepa a el antibiótico.

Los datos obtenidos en las pruebas bioquímicas y en los antibiogramas nos ayudan para establecer una relación fenotípica de las cepas de estudio y las cepas de referencia utilizando el programa NTSYS r mediante un dendrograma que agrupa las cepas respecto a sus similitudes expresables(figura 24).

Se seleccionaron 4 actinobacterias de referencia de 12 analizadas, las cuales compartían una mayor similitud con las características fenotípicas con las cepas de estudio. Las cepas usadas como referencia fueron: *Streptomyces albus*, *Nocardia nova*, *Nocardia otitidiscaviarum* y *Nocardia brasiliensis*, mismas que se utilizarón para la creación de un nuevo dendrograma( figura 25), cuyas bifurcaciones mostraron una relación entre las cepas de referencia y las de estudio.

Los datos de las características fenotípicas de las actinobacterias de González Nava, 2021 se muestran en Anexos

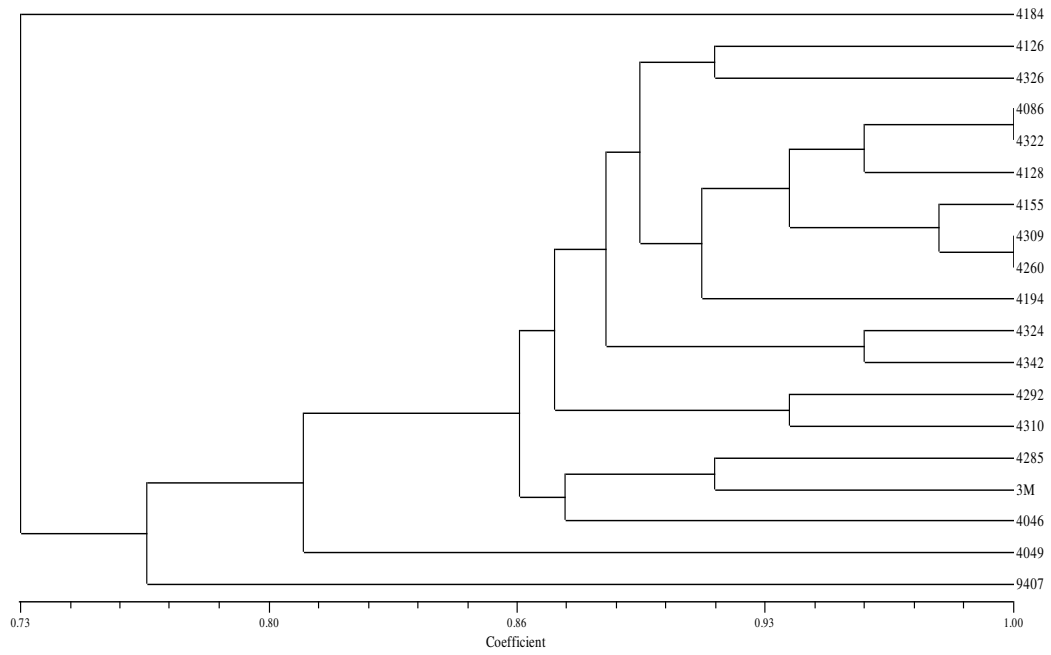


Figura 24. Dendrograma de análisis de similitud de los datos obtenidos de las pruebas de sensibilidad a antibióticos y bioquímicas

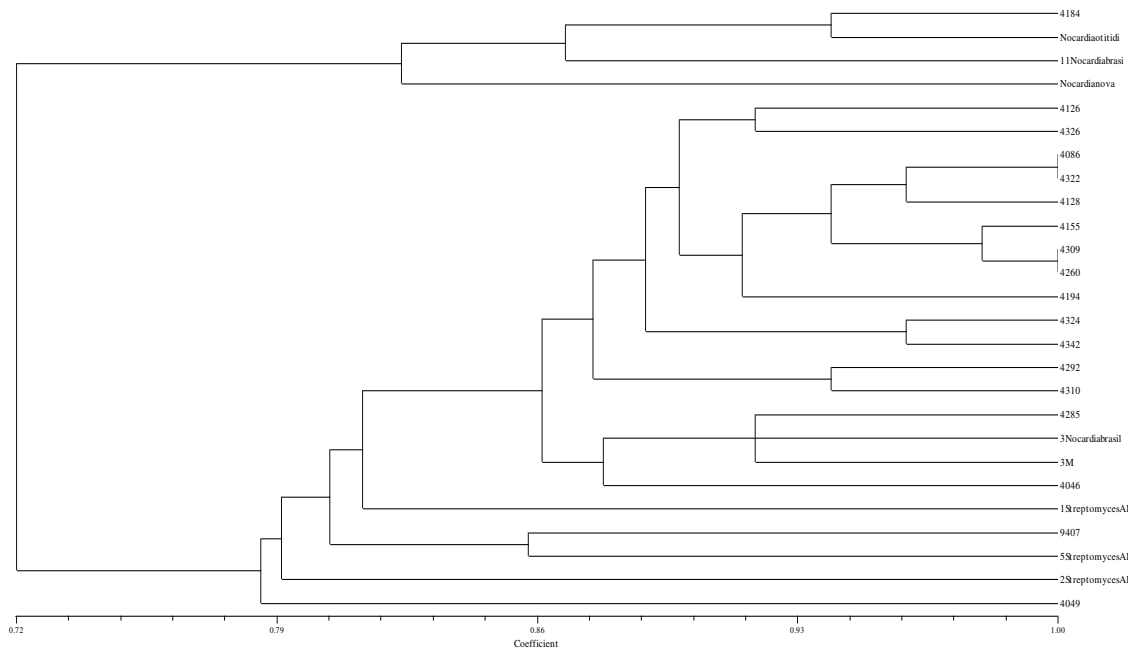


Figura 25. Dendrograma de similitud de características fenotípicas de actinobacterias ya clasificadas vs nuestras cepas de estudio

En el dendrograma, las cepas de estudio se agruparon de tal manera que demuestra que el 95% se relacionan con 3 actinobacterias de referencia, la cepa 4049 no

mostró relación con ninguna de las actinobacterias de referencia, por eso es necesario la identificación molecular de esta cepa.

CEPA	ACTINOBACTERIA
4184	<i>Nocardia otitidiscaviarum</i>
4126	<i>Nocardia brasiliensis</i>
4086	<i>Nocardia brasiliensis</i>
4155	<i>Nocardia brasiliensis</i>
4292	<i>Nocardia brasiliensis</i>
4128	<i>Nocardia brasiliensis</i>
4285	<i>Nocardia brasiliensis</i>
4309	<i>Nocardia brasiliensis</i>
4194	<i>Nocardia brasiliensis</i>
4310	<i>Nocardia brasiliensis</i>
4326	<i>Nocardia brasiliensis</i>
4322	<i>Nocardia brasiliensis</i>
4324	<i>Nocardia brasiliensis</i>
4260	<i>Nocardia brasiliensis</i>
4046	<i>Nocardia brasiliensis</i>
4342	<i>Nocardia brasiliensis</i>
3M	<i>Nocardia brasiliensis</i>
94.0728	<i>Streptomyces albus</i>
4049	Sin relación

Tabla 7. Identificación de las actinobacterias.

Las tablas de los resultados completos de las características morfológicas, pruebas bioquímicas y antibiogramas se encuentran en los anexos

Por su lento crecimiento es necesario mantener las cepas de estudio en estado puro y asegurarnos que no haya crecimiento de otras bacterias y hongos que crecen rápidamente, por esta razón se amplificó el inserto 23S rRNA, y así asegurar la

pureza de las cepas. En la siguiente figura se ejemplifica la amplificación del inserto del gen 23S RNAr.

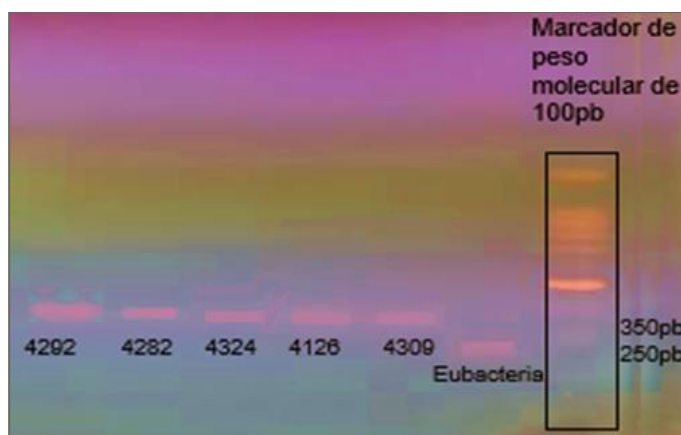


Figura 26. Ejemplo de la amplificación del inserto del gen RNAr 23S en las cepas 4292, 4282, 4329, 4126, 4309, en donde se utilizó como negativo un bacilo.

Las pruebas moleculares para la identificación de los sistemas biosintéticos se realizaron por separado, hubo bacterias en donde solo se amplificó un sistema, pero otras en donde se amplificaron los dos, como el caso de 94.0728. Se realizaron varias concentraciones de los elementos de amplificación utilizando la GoTaq® G2 Green Master Mix. El protocolo establecido para la amplificación de NRPS-I, con un volumen total de 25ul. Además se utilizaron dos controles, el control negativo y el positivo, dos cepas de actinobacterias que se utilizaron con otro protocolo para la amplificación de los sistemas PKS y NRPS. El protocolo que se estableció para la detección del sistema PKS-I fue:

- 3µL ADN
- 12µL Go Taq® G2 Green Master Mix
- 2µL PrimerK1f
- 2µL Primer M6r
- 6µL Agua libre de nucleasas

Las condiciones en el ciclo térmico fueron: la desnaturalización a 95°C por 5 minutos, y 34 ciclos de 95°C por 30 segundos, 58°C por 2 minutos, 72°C por 4 minutos y 72°C por 7 minutos.

Para la visualización en gel de agarosa se tomaron 12 µL del amplicon a 100volts por 27 minutos.



Figura 27. Amplificación del sistema PKS1, la cepa utilizada como positivo fue la 94.0728

Como se puede observar en la imagen las cepas en donde se vea la banda de 1100-1200pb amplificaron el sistema PKS-I.

En el caso del sistema NRPS-I también se utilizaron los controles positivo y negativo de otro protocolo. El protocolo establecido para la amplificación de este sistema utilizando la polimerasa Go Taq® G2 Green Master Mix fue el siguiente:

- 3µL ADN
- 12.5µL Go Taq® G2 Green Master Mix
- 2µL Primer A3f
- 2µL Primer A7r
- 5.5µL Agua libre de nucleasas

Las condiciones en el ciclo térmico fueron: la desnaturalización a 95°C por 5 minutos, y 34 ciclos de 95°C por 30 segundos, 58°C por 2 minutos, 72°C por 4 minutos y 72°C por 10 minutos.

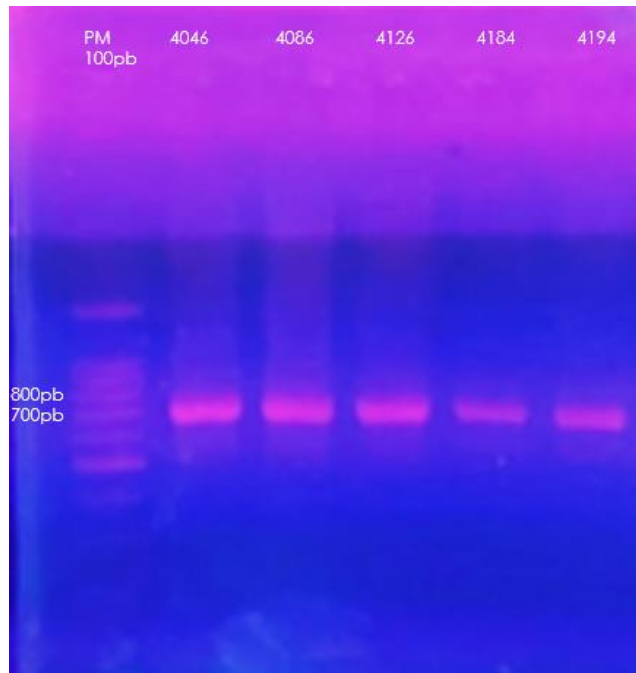


Figura 28. Amplificación del sistema NRPS1

En la imagen se observa la banda de referencia de 700pb en el marcador de peso molecular de 100pb, las bandas que se visualizan representan que a las cepas se les amplificó el sistema NRPS-I con bandas de tamaño de 700 a 800pb.

Utilizando AntiSMASH fue posible predecir los siguientes datos de las especies bacterianas de estudio:

<b>Actinobacteria</b>	Número de Clústers Biosínteticos	PKS1	NRPS	Otros clústers biosintéticos
<i>Nocardia Brasiliensis</i>	42	8	13	Terpenos, butirolactonas, ectoínas, PKS2, PKS3, etc.
<i>Nocardia otitidiscaviarum</i>	26	4	11	Terpenos, ectoínas, etc.
<i>Streptomyces albus</i>	27	5	7	Terpenos, sideróforos, etc.

Tabla 8. Predicción de sistemas biosintéticos de *Streptomyces albus*, *Nocardia otitidiscaviarum* y *Nocardia brasiliensis*.

Los datos generales de los clusters biosintéticos y los metabolitos sintetizados por dichos sistemas se encuentran en anexos.

## **OBJETIVOS Y METAS ALCANZADAS**

- Se realizó un análisis fenotípico de las actinobacterias de estudio, en donde se agruparon dependiendo de sus características nutricionales y sensibilidad a antibióticos. Este análisis nos permitió comparar los grupos formados y hacer una identificación con base en sus características fenotípicas.
- Se realizaron varios protocolos para la identificación de los sistemas biosintéticos NRPS-I y PKS -I utilizando la polimerasa Go Taq® G2 Green Master Mix, la cual, demostró ser eficiente en la amplificación de estos sistemas y es de menor costo para el análisis de genes biosintéticos.
- Con el protocolo establecido para la detección de sistemas NRPS-I y PKS-I, los proyectos del laboratorio podrán realizarse efectivamente.

## **CONCLUSIONES**

Es posible identificar el género de nuestras cepas por medio de un análisis comparativo en relación a sus características fenotípicas con otras actinobacterias que ya han sido identificadas.

Para comprobar la identificación es necesario el uso de un análisis molecular.

Se estandarizaron las técnicas de amplificación de los sistemas biosintéticos PKS1-NRPS1 utilizando la Go Taq® G2 Green Master Mix

Las actinobacterias de estudio presentan potencial biosintético de compuestos de interés farmacológico.

La estandarización para la amplificación de los sistemas PKS1 y NRPS1 es importante para futuros proyectos de laboratorio de producción de biológicos

## **RECOMENDACIONES:**

Se estandarizaron protocolos para la detección de los sistemas biosintéticos NRPS-I y PKS-I, los cuales son genes que sintetizan metabólicos secundarios de interés farmacológico como antibióticos, antifúngicos, anticancerígenos, etc. Sin embargo, existen otros tipos de PKS y NRPS (los tipo II y III), que también deberían ser estandarizados para la detección de más familias de metabolitos secundarios.

Además, existen otros tipos de sistemas biosintéticos como los terpenoides, los RiPP, lantibióticos, entre otros, que deberían ser considerados para la búsqueda de nuevos compuestos bioactivos.

Este trabajo es la herramienta inicial para la búsqueda y detección de metabólicos secundarios con actividad farmacéutica. Los protocolos establecidos podrán realizarse en actinobacterias clínicas y ambientales.

## ANEXOS:

CEPA	CARACTERÍSTICAS COLONIALES				CARACTERÍSTICAS CELULARES	
	COLOR	FORMA	TAMAÑO	TEXTURA	FORMA	GRAM
3M	Crema	Irregular	Distintos	Suave	Hifas que ramifican	+
94.0728	Blanca	Circular	Grande	Suave	Hifas que ramifican	+
4046	Crema	Irregular	Chica	Suave	Hifas que ramifican	+
4049	Amarillo	Cumulo	Grande	Suave	Hifas que ramifican	+
4086	Naranja	Circulo	Pequeña	Rugosa	Hifas que ramifican	+
4126	Naranja	Cumulo	Grande	Rugosa	Hifas que ramifican	+
4128	Amarilla	Cumulo	Grande	Rugosa	Hifas que ramifican	+
4155	Naranja	Cumulo	Mediano	Rugosa	Hifas que ramifican	+
4184	Naranja	Cumulo	Grande	Suave	Hifas que ramifican	+
4194	Naranja	Estrella	Mediana	Suave	Hifas que ramifican	+
4260	Naranja	Cumulo	Grande	Rugosa	Hifas que ramifican	+
4285	Naranja	Cumulo	Grande	Rugosa	Hifas que ramifican	+
4292	Naranja	Cumulo	Grande	Rugosa	Hifas que ramifican	+



4309	Naranja	Circular	Pequeña	Rugosa	Hifas que ramifican	+
4310	Amarillo	Aro	Distintos	Suave	Hifas que fragmentan	+
4322	Amarilla	Aro	Pequeña	Suave	Hifas que ramifican	+
4324	Naranja	Cumulo	Grande	Rugosa	Hifas que ramifican	+
4326	Naranja	Cumulo	Grande	Suave	Hifas que ramifican	+
4342	Naranja	Cumulo	Grande	Rugosa	Hifas que fragmentan	+

Tabla 9. Características morfológicas de las cepas de estudio

CEP A	Discos individuales							Disco completo para bacterias gram S serie 2														
	B B	C P	PI P	S n	A A	R A	Am C	M A	CA Z	E E	P E	T E	A M	CF X	CP F	CL M	G E	SX T	V A	C F	D C	
4184	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
4126	R	R	R	R	S	R	R	R	R	S	R	S	R	R	R	S	S	R	R	R	R	R
4086	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R
4155	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R
4292	R	R	R	R	S	R	R	R	R	S	R	S	R	R	R	S	R	S	R	R	R	R
4128	R	R	R	R	S	S	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R
4285	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	S	R	R	S	S	S	R	R	R	R	S
4309	R	R	R	R	S	R	R	S	R	R	R	S	R	R	R	S	S	R	R	R	R	R
4194	R	R	R	R	R	R	S	R	S	S	R	S	R	R	R	S	S	R	R	R	R	R

4310	R	R	R	R	S	S	S	S	S	S	R	S	R	S	S	S	S	R	R	S
4326	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R
4322	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	S	R	R	R	R
4324	S	S	S	S	S	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	S	R	R	R	R
4260	R	R	R	R	S	R	R	S	R	R	R	S	R	R	R	S	S	R	R	R
4046	S	S	S	S	R	S	R	S	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R
4342	S	S	S	S	R	R	S	S	R	R	R	S	R	R	R	R	S	R	R	R
94.07 28	R	S	R	S	S	S	R	R	R	R	R	S	R	R	S	R	S	R	S	R
4049	S	S	R	R	S	R	R	R	S	R	R	S	R	S	R	S	S	S	S	R
3M	S	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	S	R

Tabla 10. Resultados de la prueba de sensibilidad a antibióticos R= resistente y S= sensible



4260	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
4046	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
4342	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
94.072 8	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-	+	-
4049	+	-	-	-	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
3M	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-

Tabla 11. Resultados de las pruebas bioquímicas 20NE (+)= hubo crecimiento y/o la prueba resultado positiva (-)= no hubo crecimiento y/o la prueba resultado negativa

<b>CEPA</b>	<b>20E</b>																
	ONPG	<u>ADH</u>	<u>LDC</u>	<u>ODC</u>	<u>CIT</u>	<u>H2S</u>	<u>URE</u>	TDA	IND	<u>VP</u>	<u>GEL</u>	GLU	MAN	INO	SOR	RHA	
4184	+	-	-	-	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-
4126	+	-	-	-	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-
4086	+	-	-	-	+	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-
4155	-	-	-	-	+	-	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-

4292	+	-	-	-	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-
4128	+	-	-	-	+	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-
4285	+	-	-	-	+	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-
4309	+	-	-	-	+	-	+	+	-	+	+	-	-	-	-
4194	+	-	-	-	+	-	+	+	-	+	+	-	-	-	-
4310	+	-	-	-	+	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-
4326	-	-	-	-	+	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-
4322	+	-	-	-	+	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-
4324	+	-	-	-	+	-	+	+	-	+	+	-	-	-	-
4260	+	-	-	-	+	-	+	+	-	+	+	-	-	-	-
4046	+	-	-	-	+	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-
4342	+	-	-	-	+	-	+	+	-	+	+	-	-	-	-
94.072 8	+	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
4049	-	-	-	-	+	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-
3M	+	-	-	-	+	-	-	+	-	+	+	+	-	-	-

Tabla 12. Resultados de la prueba bioquímica API 20E

<b>CEPA</b>	<b>PKS 1</b>	<b>NRPS 1</b>
4046	-	+
4049	-	+
4086	+	+
4126	+	+
4128	-	+
4155	-	+
4184	-	+
4194	-	+
4220	+	+
4260	+	+
4270	+	+
4282	-	+
4285	-	+
4292	-	+
4307	-	+
4309	-	+
4310	+	+
4322	+	+
4324	-	+
4326	+	+
4342	-	+
94.0728	+	+
3M	+	+

Tabla 13. Resultados de la amplificación de los sistemas PKS 1 y NRPS 1

<b>Actinobacteria</b>	Antibiogramas								
	AM	CB	CF	GE	SXT	DC	E	PE	TE
<i>1 Streptomyces Albus</i>	S	R	R	R	R	R	R	R	R
<i>2 Streptomyces Albus</i>	R	R	S	R	R	R	S	R	R
<i>3 Streptomyces Albus</i>	R	R	R	R	R	R	R	R	R
<i>5 Streptomyces Albus</i>	R	R	S	R	R	R	R	R	R
<i>6 Streptomyces Albus</i>	R	R	R	S	R	R	R	R	S
<i>1 Nocardia brasiliensis</i>	S	S	S	S	S	S	S	S	R
<i>2 Nocardia brasiliensis</i>	S	S	S	S	R	S	R	S	R
<i>3 Nocardia brasiliensis</i>	R	R	R	R	R	R	R	R	R
<i>4 Nocardia brasiliensis</i>	R	R	S	S	S	R	S	R	S
<i>5 Nocardia brasiliensis</i>	R	R	R	R	R	R	R	R	R
<i>6 Nocardia brasiliensis</i>	R	S	R	S	R	R	R	R	S
<i>7 Nocardia brasiliensis</i>	R	R	R	S	R	R	R	R	S
<i>8 Nocardia brasiliensis</i>	R	R	R	R	R	R	S	R	S
<i>9 Nocardia brasiliensis</i>	R	R	R	S	S	R	S	R	S
<i>1R Nocardia brasiliensis</i>	S	R	R	S	S	R	S	R	S
<i>11 Nocardia brasiliensis</i>	R	R	R	R	R	R	R	R	S
<i>Nocardia exalbida</i>	R	R	R	R	R	R	R	R	R
<i>1 Nocardia nova</i>	R	R	R	R	R	R	R	R	R
<i>Nocardia vulneris</i>	S	S	S	R	S	S	S	S	S
<i>Nocardia beijingensis</i>	R	R	R	R	R	R	R	R	R

<i>Nocardia cyriacigeorgica</i>	R	R	R	R	S	R	R	R	R
<i>Nocardia veterana</i>	S	R	S	R	S	R	S	R	S
<i>Rhodococcus rhodochrous</i>	R	S	S	S	S	S	S	S	S
<i>Nocardia kroppenstedtii</i>	R	R	R	R	S	R	R	R	S
<i>2Nocardia nova</i>	S	R	R	S	S	R	S	R	S
<i>Nocardia mexicana</i>	S	R	S	S	S	R	R	R	S
<i>Nocardia otitidiscaviarum</i>	R	R	R	R	R	R	R	R	S
<i>Nocardia veterana</i>	R	R	R	R	R	R	R	R	S
<i>3Nocardia nova</i>	R	R	R	R	R	R	S	R	S

Tabla 14. Datos de sensibilidad a antibióticos de actinobacterias de referencia (González Nava, 2021).



**Actinobacteria**

## API 20 NE

	NO3	TRP	<u>GLU</u>	<u>ADH</u>	<u>URE</u>	ESC	GEL	PNG	<u>GLU</u>	<u>ARA</u>	<u>MNE</u>	<u>MAN</u>	<u>NAG</u>	<u>MA</u>
1 <i>Streptomyces Albus</i>	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+
2 <i>Streptomyces Albus</i>	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
3 <i>Streptomyces Albus</i>	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+
5 <i>Streptomyces Albus</i>	+	-	-	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-
6 <i>Streptomyces Albus</i>	+	-	-	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-
1 <i>Nocardia brasiliensis</i>	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
2 <i>Nocardia brasiliensis</i>	+	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+
3 <i>Nocardia brasiliensis</i>	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
4 <i>Nocardia brasiliensis</i>	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
5 <i>Nocardia brasiliensis</i>	-	+	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-

6 <i>Nocardia brasiliensis</i>	+	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-
7 <i>Nocardia brasiliensis</i>	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-
8 <i>Nocardia brasiliensis</i>	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-
9 <i>Nocardia brasiliensis</i>	+	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-
10 <i>Nocardia brasiliensis</i>	+	-	-	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-
11 <i>Nocardia brasiliensis</i>	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-
<i>Nocardia exalbida</i>	+	-	-	-	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-
1 <i>Nocardia nova</i>	+	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
<i>Nocardia vulneris</i>	+	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+
<i>Nocardia beijingensis</i>	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-
<i>Nocardia cyriacigeorgica</i>	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Nocardia veterana</i>	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Rhodococcus rhodochrous</i>	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Nocardia kroppenstedtii</i>	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-

<i>2Nocardianova</i>	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-
<i>Nocardia mexicana</i>	+	-	-	-	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-
<i>Nocardia otitidiscaviarum</i>	+	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	+	-
<i>Nocardia veterana</i>	+	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-
<i>3Nocardia nova</i>	+	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
<i>Nocardia wallacei</i>	+	-	-	-	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-

Tabla 15. Datos de API 20NE de actinobacterias de referencia

<b>Actinobacteria</b>	API 20E															
	ON PG	<u>AD</u> <u>H</u>	<u>LD</u> <u>C</u>	<u>OD</u> <u>C</u>	<u>CI</u> <u>I</u>	<u>H<sub>2</sub></u> <u>S</u>	<u>UR</u> <u>E</u>	TD A	IN D	<u>V</u> <u>P</u>	<u>GE</u> <u>L</u>	GL U	MA N	IN O	SO R	RH A
<i>1 Streptomyces Albus</i>	+	-	-	-	+	-	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-
<i>2 Streptomyces Albus</i>	+	-	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-

3 <i>Streptomyces Albus</i>	+	-	-	-	+	-	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-
5 <i>Streptomyces Albus</i>	+	-	-	-	+	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-
6 <i>Streptomyces Albus</i>	+	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-
1 <i>Nocardia brasiliensis</i>	+	-	-	-	+	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-
2 <i>Nocardia brasiliensis</i>	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-
3 <i>Nocardia brasiliensis</i>	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-
4 <i>Nocardia brasiliensis</i>	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
5 <i>Nocardia brasiliensis</i>	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-
6 <i>Nocardia brasiliensis</i>	+	+	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	+	-
7 <i>Nocardia brasiliensis</i>	+	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-
8 <i>Nocardia brasiliensis</i>	+	-	-	-	+	-	+	-	-	+	-	-	+	+	+	+

9 <i>Nocardia brasiliensis</i>	+	-	-	-	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-
10 <i>Nocardia brasiliensis</i>	-	-	-	-	+	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-
11 <i>Nocardia brasiliensis</i>	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-
<i>Nocardia exalbida</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-
1 <i>Nocardia nova</i>	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	+	-	-	-	-
<i>Nocardia vulneris</i>	+	-	-	-	+	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-
<i>Nocardia beijingensis</i>	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-
<i>Nocardia cyriacigeorgica</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-
<i>Nocardia veterana</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
<i>Rhodococcus rhodochrous</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	-	-	-	-

<i>Nocardia kroppenstedtii</i>	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-
<i>2Nocardia nova</i>	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-
<i>Nocardia mexicana</i>	+	-	-	-	+	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-
<i>Nocardia otitidiscaviarum</i>	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Nocardia veterana</i>	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
<i>3Nocardia nova</i>	-	-	-	-	+	-	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-
<i>Nocardia wallacei</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Tabla 16. Datos de API 20E de actinobacterias de referencia

<b>Actinobacteria</b>	<i>Nocardia Brasiliensis</i>	<i>Nocardia otitidiscaviarum</i>	<i>Streptomyces albus</i>
<b>Clústers Biosintéticos</b>	PKS1, PKS2, PKS3, LAP, terpenos, butirolactonas, ectoínas, Ciclodipéptido sintasas dependientes de ARNt, fosfonatos, furanos, oligosacaridos, lantipéptido clase I, 3 y 4, arilpolieno, ladderanos, rantipéptidos, productos peptídicos modificados postraduccionalmente, y similares a PKS, NRPS	NRPS, terpenos, arilpolienos, PKS3, ectínas, sideróforos, PKS1 y similares a peptídicos modificados postraduccionalmente, PKS1 y NRPS	lazopéptidos, enduracidina, terpenos, lantipéptido clase I, Ciclodipéptido sintasas dependientes de ARNt, PKS1, sideróforos, lazopéptidos, PKS2, prodigiosina, similares a NRPS y peptídicos modificados postraduccionalmente
<b>Metabolitos sintetizados por PKS 1</b>	Enduracidina, ECO-02301 calcheamicina, fosfomicina, brasilinolide A, B y C,	Nargenicina, estrptolidigina, monencina,	Aldgamicina J, K, P y E, xantolipina, ibomicina, meilingicina y guadinomina
<b>Metabolitos sintetizados por NRPS</b>	Calcheamicina, butirolactol A, antramicina, mayamicina, atratumicina, istamicina, funisamina, kanamicina, heterobactina A, S2 y antibiótico disonitrilo SF2768	Berninamicina A, butirolactol A, heterobactina A, S2, zorbamicina, calcheamicina, lobosamida A, B y C, amiquelina, prodigiosina, micobactina, nocobactina NA y ulleungmicina A	Enduracidina, aldgamicina J, K, P y E, paenibactina, 2-cloropentostatina meilingicina y coelibactina

Tabla 17. Predicción de metabolitos secundarios producidos por *Streptomyces albus*, *Nocardia otitidiscaviarum* y *Ncardia brasiliensis*

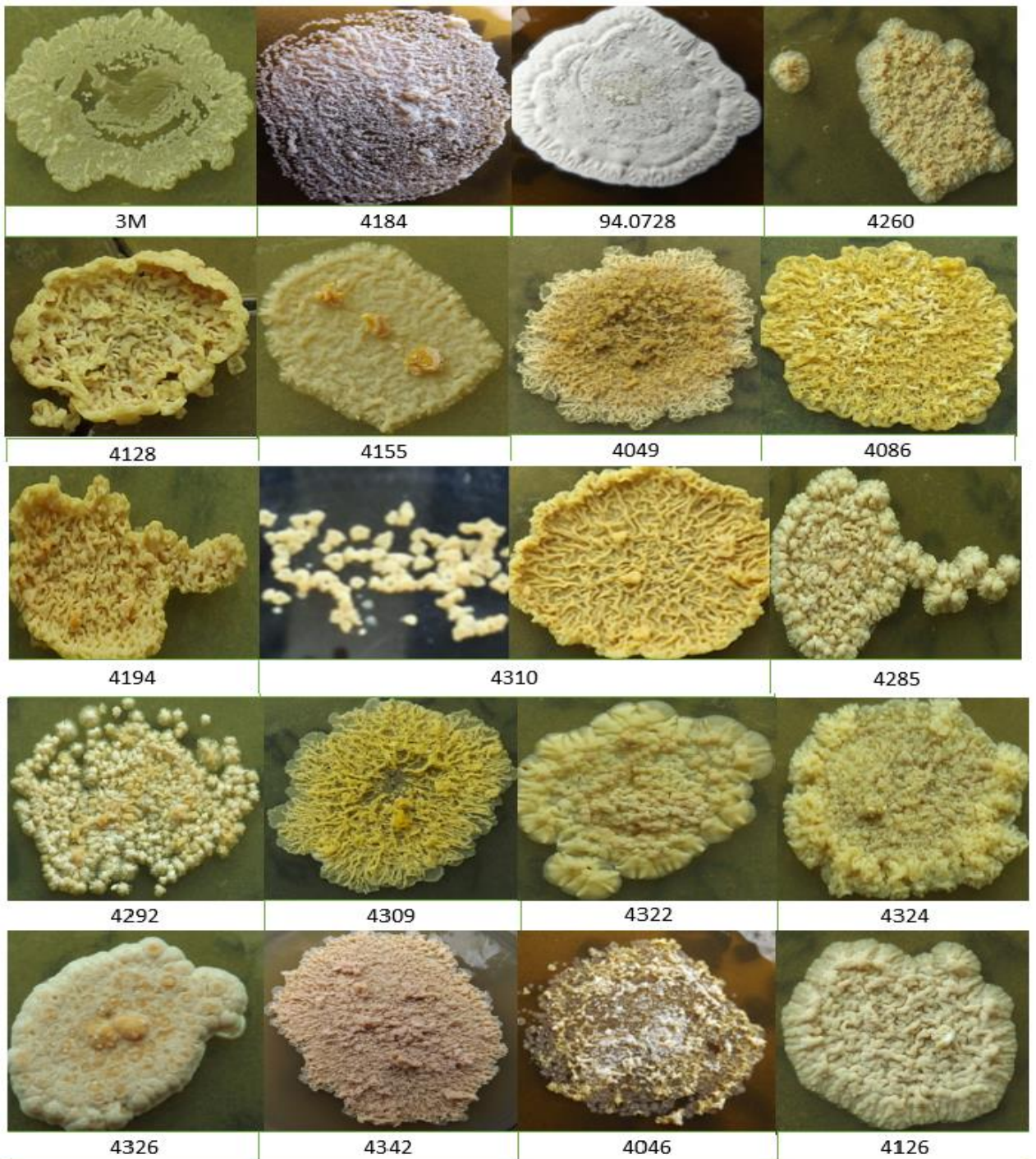


Figura 29. Imágenes macroscópicas de las colonias de nuestras cepas de estudio



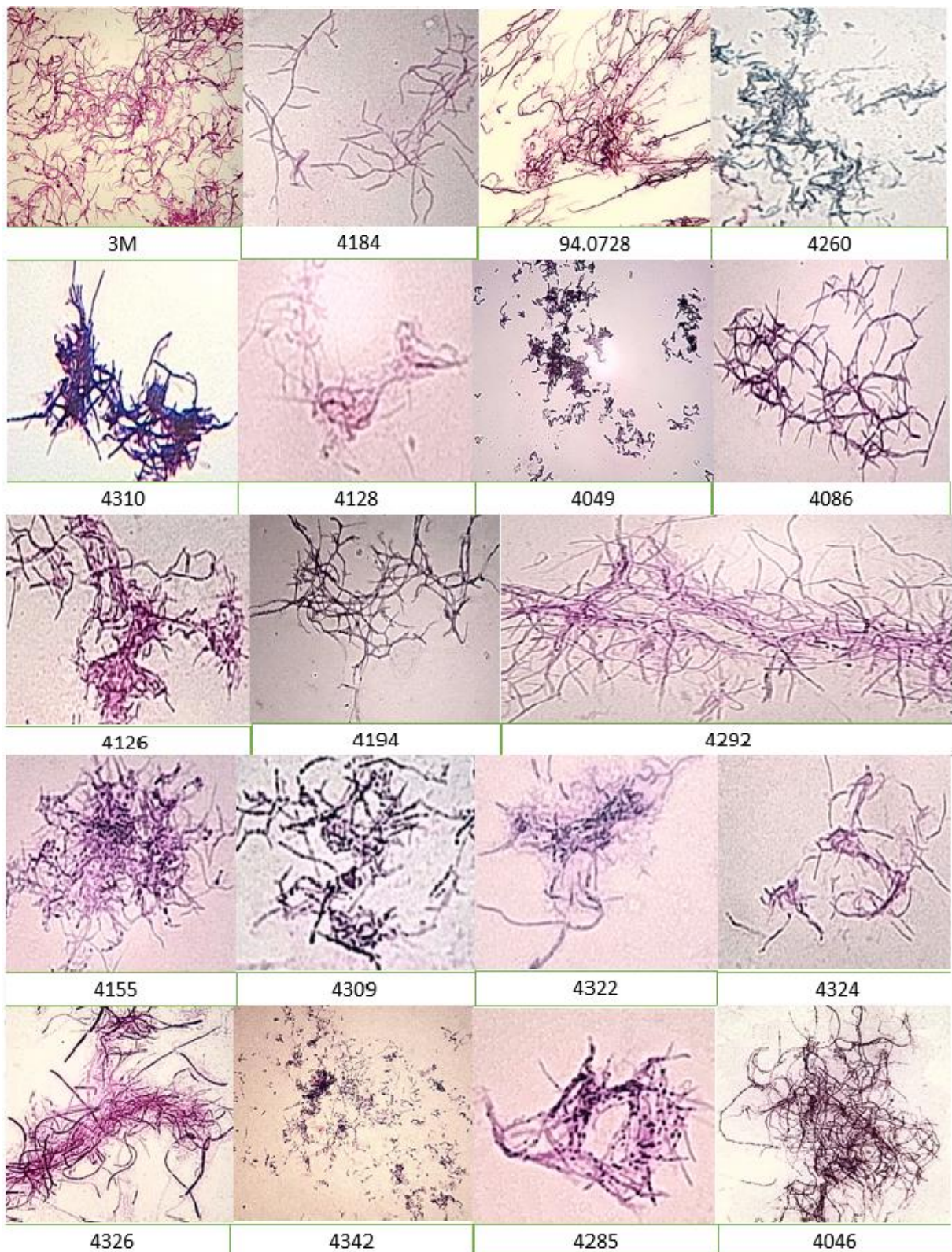


Figura 30. Imágenes microscópicas de nuestras cepas de estudio

## BIBLIOGRAFÍA

- Sandoval , A. A., & Serrano, J. A. (2003). The Mycetoma. Review. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología*, 70-79.
- Alonso, Carmona, G. S. (2017). *Identificación y caracterización de Actinobacterias con presencia de los sistemas PKS y NRPS*. Toluca, Estado de México: Facultad de Enfermería y Obstetricia UAEM.
- Barka, E. A., Vatsa, P., Sanchez, L., Gaveau-Vaillant, N., Jacquard, C., Klenk, H.-P., . . . Van Wezel, G. (2015). Taxonomy, Physiology, and Natural Products of Actinobacteria. *Microbiology and Molecular Biology* , 2-7.
- Dávila Medina, M. D., Gallegos Morales, G., Hernández Castillo, F. D., Ochoa Fuente, Y. M., & Flores Olivas, A. (2013). Antagonistic actinomycetes against phytopathogenic fungi of agricultural importance. *Scielo*, 1187-1196.
- Del Cerro Sánchez, C. (2015). *DESARROLLO DE HERRAMIENTAS MOLECULARES PARA LA PRODUCCIÓN DE POLICÉTIDOS Y PÉPTIDOS NO RIBOSOMALES*. Madrid: CIB .
- González Camacho, D. A. (2013). *Manual electrónico de Actinomicetos*. CDMX: Dirección General de Publicaciones y Fomento Editorial (UNAM).
- González Jiménez, Y. T. (2010). *Los Actinomicetos: Una Visión Como Promotores De Crecimineto Vegetal*. Bogotá: PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA.
- González Nava, J. B. (2016). *Reconsideración Taxonómica de actinomicetos aislados de suelos mexicanos*. Tesis de maestría, Universidad Autónoma Metropolitana Xochimilco, Ciudad de México.
- González Nava, J. B. (2021). *Detección de sistemas biosintéticos implicados en la producción de metabolitos secundarios en Actinobacterias de origen clínico*. Toluca, Estado de México: UAEM.
- González Nava, J. B., Carmona, S. A., Manzanares Leal, G. L., Sandoval Trujillo, H., & Ramírez Durán, N. (2021). Current Techniques for the Search for Natural Products in Actinobacteria. *American College of Gastroenterology (ACG)*, 274-292.
- Hernández Duarte, D. E. (2018). *ANÁLISIS DE LA PRESENCIA DE LOS COMPLEJOS ENZIMÁTICOS PKS*,. Bogota, Colombia: PROGRAMA DE BACTERIOLOGÍA Y LABORATORIO CLÍNICO.
- Hernández Bel, P., Mayorga, J., & Pérez, M. E. (2010). Actinomicetoma por *nocardia brasiliensis*. *Anales de Pediatría* , 213-214.

- Karam Calderón, M. Á., Zaragoza Bastida, A., Bustamante Montes, L. P., Sandoval Trujillo, Á. H., & Ramírez Durán, N. (2014). Marcador molecular de actinomicetos utilizado para detectar micobacterias en muestras de esputo. *Revista mexicana de ciencias farmacéuticas*, vol.45 no.1.
- Marfil Santana, M. D. (2017). *Diversidad de genes de policetido sintasa tipo 1 en un metagenoma de agua subterránea del acuífero de Yucatan*. Mérida, Yucatan: Centro de investigación científica de yucatan, A.C.
- Medina Cuevas, H. M., & Martínez, Z. E. (2011). Aislamiento y búsqueda de actinobacterias del suelo productoras de enzimas extracelulares y compuestos con actividad antimicrobiana. *UNACAR tecnociencia*, 72.
- Mohamed Selim, M. S., Abdelrazek Abdelhamid, S., & Saleh Mohamed, S. (2021). Secondary metabolites and biodiversity of actinomycetes. *Journal, genetic engineering & biotechnology*, 3.
- Pailé Jiménez, D. (2011). *Aislamiento Y Caracterización Preliminar De Genes De Policétido Sintetas Tipo I En Actinomicetos Aislados A Partir De Hormigas Cortadoras De Hojas Atta Cephalotes*. Bucaramanga Colombia: UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER Repositorio.
- Parada, R. B., Marguet, E. R., & Vallejo, M. (2017). Isolation and partial characterization of soils. *Revista colombiana de Biotecnología*, 15-23.
- Pérez Sosa, N. M. (2010). *Metabolitos Secundarios Producidos Por Actinomicetos Aislados De Suelos Colombianos*. Bogotá: Pontificia Universidad Javeriana Repositorio .
- Quiñones Aguilar, E. E., Evangelista Martínez, Z., & Rincón Enríquez, G. (2017). Potencial biotecnológico de las actinobacterias aisladas de suelos de México como fuente natural de moléculas bioactivas: compuestos antimicrobianos y enzimas hidrolíticas. *Temas de Ciencia y Tecnología*, 39.
- Rodríguez Nava, V., Couble , A., Molinard , C., Sandoval, H., & Laurent, F. (2004). *Nocardia mexicana* sp. nov., a New Pathogen Isolated from Human Mycetomas. *Journal of Clinical Microbiology*, 4530–4535.
- Tipán Guijarro, D. C. (2012). *DETERMINACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE ANTIBIÓTICOS*. Ambato-Ecuador: FACULTAD DE CIENCIA E INGENIERÍA EN ALIMENTOS .