



---

---

Universidad Autónoma del Estado de México  
Facultad de Enfermería y Obstetricia

Doctorado en Ciencias de la Salud

**“Identificación y caracterización de actinobacterias con  
presencia de los sistemas PKS y NRPS”**

**TESIS**

Para obtener el grado de  
Doctora en Ciencias de la Salud

Presenta:

M. en C.S. Gabriela Scarlett Alonso Carmona

Comité Tutorial

Dra en C. Ninfa Ramírez Durán

Tutora Académica

Dr.en C. Leobardo Manuel Gómez Oliván

Tutor Interno

Dr. en C. Ángel Horacio Sandoval Trujillo

Tutor Externo



Toluca, Estado de México

Octubre 2017

El presente trabajo de tesis titulado:

**“Identificación y caracterización de actinobacterias con presencia de los sistemas PKS y NRPS”**

Fue posible gracias al financiamiento mediante el otorgamiento de la beca de estudios de Doctorado, así como de las becas mixtas para estancia nacional e internacional.



**SEP • CONACYT**

*Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología*



## ÍNDICE

Resumen .....	11
Abstract.....	12
1. ANTECEDENTES .....	13
1.1. Sistemas policétidosintetasa (PKS) y Sintasa de péptidos no ribosomales (NRPS) .....	14
1.1.1. Sistema policétidosintetasa, PKS .....	14
1.1.2. Sistema sintasa de péptidos no ribosomales, NRPS.....	16
1.2. Detección de metabolitos secundarios en microorganismos.....	18
1.2.1. Detección de metabolitos secundarios en actinobacterias.....	19
1.2.2. Relevancia de las actinobacterias como productoras de metabolitos secundarios.....	20
1.3. Microorganismos con presencia de los sistemas PKS y NRPS.....	21
1.3.1. Actinobacterias con presencia de los sistemas PKS y NRPS.....	21
1.4. Determinación de metabolitos secundarios en actinobacterias a través de primers específicos para los sistemas PKS y NRPS.....	22
1.5. Identificación de microorganismos por técnicas de biología molecular .....	23
1.6. Identificación de actinobacterias mediante amplificación del Gen 16S rRNA .....	24
1.6.1. 16S rRNA en la estructura de los ribosomas.....	25
1.7. Estudio filogenético.....	25
2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	27
3. JUSTIFICACIÓN.....	28
4. HIPÓTESIS .....	29
5. OBJETIVOS.....	30
6. MATERIAL Y MÉTODOS .....	31
6.1. Diseño de Estudio.....	31
6.2. Criterios de inclusión, exclusión y eliminación .....	31
6.3. Procedimiento.....	32
6.3.1. Medio de cultivo para Actinobacterias halófilas.....	32
6.3.2. Caracterización morfológica de actinobacterias.....	35
6.3.3. Caracterización fisiológica de actinobacterias.....	36
6.3.4. Extracción de DNA .....	36
6.3.5. Detección de los sistemas PKS y NRPS .....	38
6.3.6. Identificación genética.....	40
6.3.7. Ribotipificación .....	41
6.4. Implicaciones Bioéticas.....	42
7. RESULTADOS .....	43
7.1. Draft genome sequence of <i>Saccharomonospora</i> sp. LRS4.154, a moderately halophilic actinobacteria with the biotechnologically relevant systems PKS and NRPS .....	43
7.1.1. Página frontal del artículo publicado.....	43
7.1.2. Carta de Aceptación .....	44
7.1.3. ABSTRACT .....	45
7.1.4. Apartados del artículo.....	45

7.2. Artículo enviado: IDENTIFICATION OF HALOPHILIC AND HALOALKALOPHILIC ACTINOBACTERIA WITH PRESENCE OF POLYKETIDE SYNTHASE AND NONRIBOSOMAL PEPTIDE SYNTHETASE SYSTEMS.....	49
7.2.1. Carta de envío.....	50
7.2.2. Abstract.....	51
7.2.3. Introducción.....	52
7.2.4. MATERIALS AND METHODS .....	53
7.2.5. RESULTS.....	57
7.2.6. DISCUSSION .....	64
7.2.7. Acknowledgments .....	66
7.2.8. REFERENCES.....	66
7.3. RESULTADOS ADICIONALES.....	74
8. DISCUSIÓN GENERAL .....	86
9. CONCLUSIONES GENERALES .....	88
9.1. Conclusiones .....	88
9.2. Limitaciones .....	88
9.3. Recomendaciones.....	89
10. Referencias Bibliográficas.....	90
12. ANEXO .....	102

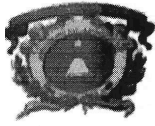
## INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Bio-actividad de los compuestos sintetizados por el sistema PKS .....	12
Tabla 2. Bio-actividad de los compuestos sintetizados por el sistema NRPS.....	15
Tabla 3. Detección de los sistemas PKS, NRPS y PKS/NRPS en actinobacterias halófilas .....	76
Tabla 4. Resultados de la Ribotipificación.....	77
Tabla 5. Detección de los sistemas PKS, NRPS y PKS/NRPS en actinobacterias Haloalcalófilas moderadas.....	83
Tabla i. Phyla de bacterias en donde se han identificado los sistemas PKS y NRPS.....	102
Tabla ii. Distribución de los sistemas PKS y NRPS en actinobacterias.....	105
Tabla iii. Generos de actinbacterias con producción de biomoléculas sintetizadas Por los sistemas PKS y NRPS.....	111

## INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Esquema de iniciación y extencion de modulos del sistema PKS .....	11
Figura 2. Esquema de iniciación y extencion de modulos del sistema NRPS .....	14
Figura 3. Mapa de la República Mexicana donde se muestran los sitios de muestreo. 71	
Figura 4 . Amplificación de los sistemas PKS y NRPS de las colección I .....	76
Figura 5. Arbolfilogenético de la colección I.....	81
Figura 6. Amplificaciín de los sistemas PKS y NRPS de la colección II.....	84
Figura 7. Arbolfilogenético de la colección II.....	85

## Votos aprobatorios



Universidad Autónoma del Estado de México  
Facultad de Enfermería y Obstetricia

Doctorado en Ciencias de la Salud

Fecha: 30 de Junio de 2017

### DICTAMEN DE VOTOS APROBATORIOS TESIS

Los docentes que integran el **COMITÉ DE TUTORES** de la maestra: **Gabriela Scarlett Alonso Carmona**, egresada del programa del Doctorado en Ciencias de la Salud, **Generación Catorce periodo 2013-2016**, quien realizó el trabajo de tesis titulado: **"Identificación y caracterización de actinobacterias con presencia de los sistemas PKS y NRPS"**, bajo la Tutoría Académica de la **Dra. Ninfa Ramírez Durán**, han dirigido, revisado y discutido dicho trabajo, por lo que se ha considerado **DICTAMINARLO COMO APROBADO**, ya que reúne los requisitos que exige el Artículo 75 del Reglamento de Estudios Avanzados de la Universidad Autónoma del Estado de México.

**A T E N T A M E N T E**

**PATRIA, CIENCIA Y TRABAJO**

**"2017, Año del Centenario de la Promulgación de la Constitución Política de los Estados Unidos Mexicanos"**

Dra. Ninfa Ramírez Durán  
Tutor Académico

Dr. Leobardo Manuel Gómez Oliván  
Tutor Interno

Dr. Ángel Horacio Sandoval Trujillo  
Tutor Externo

Paseo Tolloca s/n esq. Jesús Carranza  
col. Moderna de la Cruz. C.P. 50180  
Toluca, Estado de México  
Tel. (722) 2706270 / 2702357  
leyo@uacemex.mx



## Resumen

Uno de los pasos más importantes en el proceso de obtención de nuevos metabolitos secundarios, a partir de productos naturales de origen microbiano es la selección de bacterias adecuadas, como las actinobacterias. Este phylum se caracteriza por su capacidad para producir diferentes compuestos bioactivos, los cuales se sabe que son producidos por los sistemas modulares policétido sintasa (PKS) y el sintetasa de péptido no ribosomal (NRPS).

Con el objetivo de explorar la presencia y distribución de estos sistemas biosintéticos en actinobacterias, se han diseñado iniciadores específicos para las regiones del sistema PKS y NRPS, permitiendo una rápida detección de dichos sistemas en actinobacterias. En este estudio se identificaron actinobacterias halófilas y haloalcalófilas con la presencia de los sistemas PKS y NRPS para predecir la síntesis de moléculas bioactivas. Se aislaron e identificaron 51 cepas de actinobacterias halófilas y haloalcalófilas, provenientes de ambientes salinos y salino-sódicos de México. El análisis filogenético basado en la secuenciación del gen 16S rRNA mostró que las cepas aisladas pertenecen a los géneros *Saccharomonospora*, *Actinopolyspora* y *Nocardiopsis*. El sistema PKS fue detectado en 5 cepas del género *Saccharomonospora*. El sistema NRPS fue detectado en 6 cepas pertenecientes a los géneros *Nocardiopsis* y *Saccharomonospora*. La presencia de ambos sistemas PKS y NRPS fue detectada en 37 cepas correspondientes a los tres géneros identificados. Tres cepas no demostraron la presencia de los sistemas PKS y NRPS.

La determinación de la presencia de regiones génicas específicas permitirá identificar si una cepa de actinobacteria es potencialmente productora de compuestos con posible aplicación en biomedicina.

## **Abstract**

One of the most important steps in the process of obtaining new secondary metabolites from natural products of microbial origin is the selection of suitable bacteria, such as actinobacteria. This phylum is characterized by its ability to produce different bioactive compounds, which are known to be produced by polyketide synthase (PKS) modular systems and non-ribosomal peptide synthetase (NRPS).

In order to explore the presence and distribution of these biosynthetic systems in actinobacteria, specific primers have been designed for the regions of the PKS and NRPS system, allowing rapid detection of these systems in actinobacteria. This study identified halophilic and haloalkylophilic actinobacteria with the presence of the PKS and NRPS systems to predict the synthesis of bioactive molecules. 51 strains of halophilic and haloalkylophilic actinobacteria from saline and saline-sodium environments of Mexico were isolated and identified. Phylogenetic analysis based on the sequencing of the 16S rRNA gene showed that the strains isolated belong to the genera *Saccharomonospora*, *Actinopolyspora* and *Nocardiopsis*. The PKS system was detected in 5 strains of the genus *Saccharomonospora*. The NRPS system was detected in 6 strains belonging to the genera *Nocardiopsis* and *Saccharomonospora*. The presence of both PKS and NRPS systems was detected in 37 strains corresponding to the three genera identified. Three strains did not demonstrate the presence of the PKS and NRPS systems.

The determination of the presence of specific gene regions will allow to identify if an actinobacteria strain is potentially producing compounds with possible application in biomedicine.

## 1. ANTECEDENTES

Desde el descubrimiento de la penicilina hace 78 años, para el año 2016 aproximadamente más de 23,000 nuevos productos naturales han sido caracterizados, de los cuales la mayoría son producidos por bacterias, destacando el orden de los *Actinomycetales* como uno de los más grandes productores (1).

Después del descubrimiento de la estreptomicina por Selman Waksman y sus colaboradores de la Universidad de Rutgers en la década de 1940, se han invertido grandes esfuerzos en el descubrimiento de nuevos productos naturales por parte de compañías farmacéuticas, principalmente en Estados Unidos, Europa y Japón, así como por laboratorios académicos en todo el mundo. Cabe mencionar los excepcionales esfuerzos que realizan los investigadores en laboratorios académicos como el premio Nobel en 2015 el profesor Satoshi Ōmura de la Universidad Kitasato en Tokio, así como por los fallecidos: Hamao Umezawa investigador en el Instituto de Antibióticos en Tokio y Hans Zähler de la Universidad de Tübingen en Alemania, investigadores de estos laboratorios identificaron más de 1000 nuevos productos naturales (2).

En la época que estamos viviendo es necesario el descubrimiento de nuevos antibióticos para combatir la creciente amenaza de los patógenos resistentes a los antibióticos para lo cual microorganismos de hábitats poco estudiados tales como microorganismos marinos y microorganismos terrestres incultivables, representan fuentes naturales sin explotar para el descubrimiento de nuevos antibióticos. Una forma eficaz de aprovechar este potencial es la detección mediante el estudio del metagenoma de una muestra ambiental o de las colecciones de cepas puras, identificando genes contenidos en genomas microbianos, así como enzimas esenciales para la producción de biomoléculas, mediante el análisis por métodos de bioinformática, minería genoma, la interrupción de genes, expresión de genes heterólogos, y análisis bioquímicos (2).

Actualmente las investigaciones para el descubrimiento de biomoléculas en microorganismos están impulsadas hacia el estudio de la estructura, biosíntesis e identificación de los sistemas multifuncionales PKS y NRPS (2).



## 1.1. Sistemas policétido sintetasa (PKS) y sintetasa de péptido no ribosomal (NRPS)

El policétido sintetasa (PKS, polyketide synthase) y el sintetasa de péptido no ribosomal (NRPS, non ribosomal peptide synthetase) son sistemas multifuncionales sintetizados por grupos de genes codificados para un número variable de módulos con múltiples actividades enzimáticas, cada módulo está conformado por 1,000-1,500 aminoácidos (3, 4).

### 1.1.1. Sistema policétido sintetasa PKS

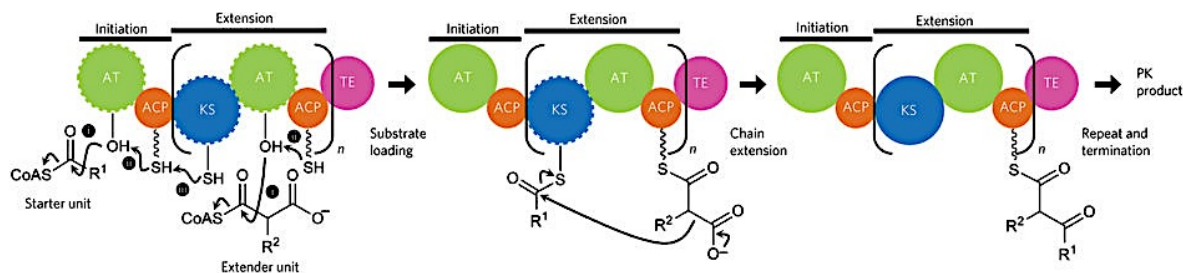
Los módulos del policétido sintetasa (PKS), son agrupaciones de genes que biosintetizan compuestos de interés en biomedicina. La estructura y función análoga de los módulos del policétido sintetasa (PKS) está conformada por tres dominios catalíticos, los cuales, son necesarios para un completo ciclo de elongación en la síntesis del sistema PKS (5):

- Acil-transferasa (AT): Incorpora malonil o metilmalonil-CoA como unidad de extensión.
- Proteína acarreadora de acilos (ACP): Realiza la transferencia y activación de los monómeros malonil o metilmalonil-CoA.
- Quetosintasa (KS): Forma el enlace C-C, que cataliza la condensación de la unidad de extensión con una creciente cadena de policétido (6).

Dentro de los módulos también pueden estar presentes las enzimas de procesamiento que actúan como auxiliares, estos dominios son:

- Quetorreductasa (KR): Reduce el grupo  $\beta$ -ceto de la cadena de policétido recién extendida a un grupo  $\beta$ -hidroxi.
- Dehidratación (TE): Realiza el producto final a través de ciclación o hidrólisis (6).

Figura 1. Esquema de iniciación y extensión de módulos del sistema PKS. *Weissman K. The structural biology of biosynthetic megaenzymes. Nature Chemical Biology 2015 11, 660-670.*



La codificación de los genes del sistema PKS se realiza por lo general agrupandolos con sus elementos auxiliares y reguladores en el genoma, y los productos de esta codificación se clasifican en los tipos I, II, y III en función al dominio dentro de su organización (7).

- 1) **PKS tipo I:** Es el primer tipo de policétido descubierto y ampliamente descrito en distintos taxones bacterianos como en proteobacterias, cianobacterias y actinobacterias, se encarga de la síntesis de compuestos con actividad: antibiótica, antiparasitaria, insecticida y antifúngica. En estudios anteriores se reportó la presencia del sistema PKS de tipo I en plantas (7).
  
- 2) **PKS tipo II:** Una característica del PKS tipo II es la presencia de más dominios de composición, y el uso de dominios repetidos para sintetizar un producto. Los estudios del sistema PKS tipo II y sus policétidos se han realizado en un número limitado de genomas, sin embargo el progreso actual de los métodos de cálculo para incrementar los datos de secuenciación del genoma en distintos taxones bacterianos, ha creado nuevas posibilidades para caracterizar exhaustivamente la producción de policétidos en una mayor cantidad de genomas en distintos microorganismos. Los dominios de PKS tipo II, están codificados por una agrupación de genes que se sabe contiene regiones conservadas en especies relacionadas; por lo tanto, es posible descubrir nuevos dominios de PKS tipo II sobre la base de similitudes de secuencias en homología a dominios de PKS tipo II (8).
  
- 3) **PKS tipo III:** Este tipo de policétido contiene múltiples dominios catalíticos y a diferencia del sistema PKS tipo II, este utiliza un mecanismo distinto a la proteína acarreadora de acilos (ACP), el cual se clasifico en dos grupos: el iniciador corto de grupo-acilo y el iniciador largo de grupo-acilo (9).

En la Tabla 1 se muestran algunos de los ejemplos más conocidos de compuestos y su función bio-activa, los cuales son sintetizados por el sistema PKS (10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17).

**Tabla 1. Bio-actividad de los compuestos sintetizados por el sistema PKS**

Compuesto	Bio-actividad
<b>Eritromicina</b>	Antibiótico
<b>Oleandomicina</b>	Antibiótico
<b>Dinamicina</b>	Antibiótico

<b>Puromicina</b>	Antibiótico
<b>Rifamicina</b>	Antibiótico
<b>Rampamicina</b>	Posee actividad inmunosupresora en trasplantes de órganos.
<b>FK506 y FK520</b>	Inmunosupresores
<b>Nistatina</b>	Antifúngico
<b>Pimaricina ó Natamicina</b>	Antifúngico
<b>Anfotericina</b>	Antifúngico
<b>Espinosina</b>	Insecticida
<b>Avermectina</b>	Antihelmintico e insecticida

Fuente: Aparicio JF, A complex multi enzyme system encoded by the five polyketide synthase genes is involved in the biosynthesis of the 26-membered polyenemacrolide depimaricin in *Streptomyces natalensis*. Chem Biol; 2000 (7): 895-905.

### 1.1.2. Sistema sintetasa de péptido no ribosomal NRPS

Los sistemas del sintetasa de péptido no ribosomal, son agrupaciones de genes que codifican para una amplia gama de compuestos de gran utilidad en biomedicina, que van desde antibióticos (por ejemplo, la penicilina, vancomicina), toxinas (por ejemplo, la Kahalalide F), sideróforos (como enterobactina, vibriobactin), anti-inflamatorios e inmunosupresores (por ejemplo, ciclosporina A) (18, 19, 20, 21).

Estos compuestos son relevantes en farmacología, lo que ha motivado a realizar extensas búsquedas de nuevos genes de NRPS en cepas de origen microbiano de muestras ambientales. Un ejemplo de ello fue la creación de primers dirigidos a la amplificación de la región conservada de este sistema, estos cebadores se han utilizado para conocer la diversidad de los genes del sistema NRPS en: actinobacterias, actinobacterias marinas, hongos endófitos de las plantas, y microorganismos aislados de esponjas marinas, cianobacterias de agua dulce (22).

Estructuralmente las sintetatas de péptido no ribosomal (NRPS) son enzimas grandes y multi-modulares que se organizan en bloques o módulos, la síntesis de cada bloque hace que sea posible hacer predicciones acerca de la naturaleza química del producto de la secuencia de ADN del clúster (23).

La composición de cada modulo está constituida por tres dominios catalíticos, los cuales, son necesarios para un completo ciclo de elongación en la síntesis de péptidos catalizados por un NPRS (23), estos dominios son:

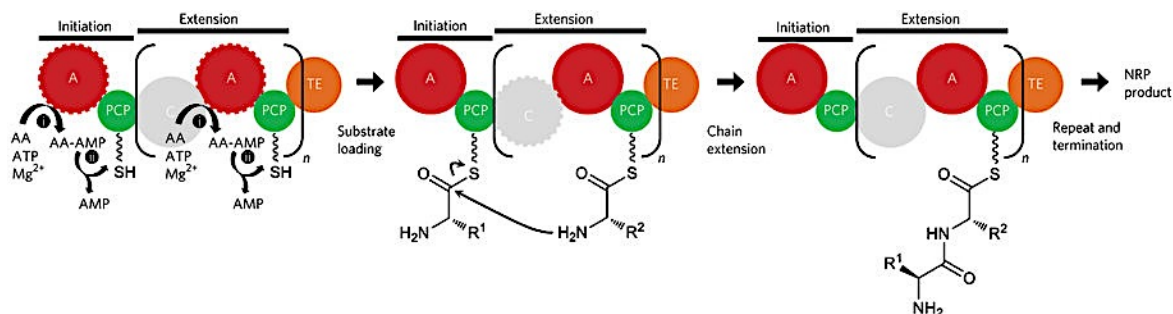
- a) Adenilacion (A): Es responsable del reconocimiento y activación del aminoácido relacionado a ácido hidroxilo (24).

- b) Acarreador-peptidil (PCP): Actúa después que el sustrato es activado para transferencia y activación del acarreador-peptidil del mismo módulo (25).
- c) Condensación (C): Este dominio es responsable de la formación del enlace carbono-nitrógeno entre la cadena larga y el aminoácido activado (25).

Para completar cada modulo es necesaria la presencia de dominios auxiliares, como:

- 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 (26).
- e) Ciclación (Cy): Estos dominios pueden reemplazar a los dominios responsables de la incorporación de cisteína, serina o treonina (26).
- f) Dominio de oxidación (Ox): Cataliza la formación de un tiazol aromático a través de la oxidación de un anillo de tiazolina.(27).
- 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 (28, 29).

**Figura 2. Esquema de iniciación y extension de modulos del sistema NRPS. Weissman K. *Th structural biology of biosynthetic megaenzymes. Nature Chemical Biology* 2015 11, 660-670.**



- 1) **El NRPS tipo I A lineal:** Es un análogo del policétido sintasa tipo I (PKS I), en cada módulo alberga un conjunto distinto de actividades responsables de la catálisis de un enlace peptídico en la cadena de elongación. En este sistema, la secuencia de aminoácidos de la cadena del péptido lineal resultante es co-lineal con el número y orden de los módulos (30).
- 2) **El NRPS tipo II B iterativo:** Utiliza sus módulos o dominios más de una vez en el ensamble de un solo producto. Esta estrategia se emplea para construir cadenas de péptidos que contienen secuencias repetidas más pequeñas (30).

- 3) **El NRPS tipo III C no lineal:** Aloja una inusual disposición de los módulos o dominios con dos diferencias principales del NRPS tipo I A, una de ellas es la ciclación interna inusual o el punto de ramificación de sintasa que conduce a una desviación de la función normal del NRPS lineal, lo que resulta en un producto peptídico no lineal (30).

En la Tabla 2 se muestran algunos de los ejemplos mas conocidos de compuestos sintetizados por el sistemas NRPS y su función bio-activa la cual es útil en distintas áreas de la salud (31, 32, 33, 34, 35, 36).

**Tabla 2. Bio-actividad de los compuestos sintetizados por el sistema NRPS**

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

## 1.2. Detección de metabolitos secundarios en microorganismos

Los microorganismos viven en ambientes donde su crecimiento es afectado tanto por interacciones con otras poblaciones como por las características físicas y químicas de su entorno, y por consecuencia se producen metabolitos secundarios con actividades variadas, que juegan un papel importante en su sobrevivencia. Tal es el caso del Phylum Cianobacteria del cual se sabe que produce microcistina y nodularina; el Phylum Firmicutes produce bacitracina y micosubtilina; el Phylum Proteobacterias sintetiza enterobactrina y chrisobactina (28).

La búsqueda de compuestos útiles en el laboratorio se realizaba siguiendo varios pasos, algunos de estos pasos aún siguen estando presentes en los protocolos de detección de metabolitos secundarios, los cuales se pueden mencionar a continuación:

- Colectar mediante distintas técnicas muestras de diversos ambientes.
- Hacer crecer a los microorganismos contenidos en las muestras en medios de cultivos selectivos.
- Obtener cultivos axénicos y probar la capacidad de los medios de cultivo donde crecían los microorganismos para inhibir el crecimiento de organismos patógenos.
- Recuperar las sustancias activas producidas por los microorganismos (37, 38).

En la actualidad el potencial que tiene el empleo de tecnologías de ADN recombinante ha permitido obtener metabolitos secundarios de cepas mejoradas, así como de cepas difíciles de cultivar en el laboratorio; también se han descubierto nuevos o mejores metabolitos secundarios (39).

### **1.2.1. Detección de metabolitos secundarios en actinobacterias**

Los métodos de aislamiento iniciados por investigadores de la industria han, tenido un impulso significativo para el descubrimiento de nuevos productos microbianos de importancia médica (40).

Un estudio referido en la Base de datos Bibliográfica de Antibióticos, por sus siglas en inglés (ABL), el cual se realizó en más de veintitrés mil productos de origen microbiano que poseen distintas actividades biológicas, como: propiedades antifúngicas, antibacterianas, antivirales, antitumorales, citotóxicas e inmunosupresoras, muestra que las cepas con estas propiedades pertenecen principalmente al reino de los Hongos (alrededor de 42%), seguido por cepas pertenecientes al género *Streptomyces* (32,1%); otros géneros de actinobacterias producen el 15,1% de los productos de origen microbiológico reportados en la base de datos y un grupo de actinobacterias en donde el estudio de su biología y aislamiento está poco estudiado está sobre el 10.6% (41).

El hallazgo de nuevas moléculas a partir de actinobacterias ha marcado una etapa en la investigación de nuevos antibióticos además de la posibilidad de encontrar nuevos antimicrobianos en cepas de actinobacterias poco estudiadas.

Desde el descubrimiento de la estreptomicina, un número elevado de antibióticos se han detectado, incluidos los principales agentes terapéuticos tales como: aminoglucósidos, cloranfenicol, tetraciclinas, macrólidos y más recientemente cefamicina-lactama, los cuales se han aislado a partir de cultivos de *Streptomyces* y *Streptoverticillium* (42).

### **1.2.2. Relevancia de las actinobacterias como productoras de metabolitos secundarios**

La relevancia del estudio de las actinobacterias es más importante si limitamos la investigación de metabolitos secundarios de origen microbiológico con potencial utilidad como agentes antimicrobianos, es decir, la determinación de moléculas activas contra células bacterianas y fúngicas., un género muy prolífico es el *Streptomyces* seguido, en términos de número de cepas productoras de moléculas anti-infecciosas, la familia *Micromonosporaceae* (principalmente *Micromonospora* y *Actinoplanes*), la familia *Pseudonocardiaceae* (principalmente *Amycolatopsis*, *Saccharopolyspora* y *Saccharothrix*) y la familia *Thermomonosporaceae* (principalmente *Actinomadura*), la familia *Nocardiaceae* (*Nocardia* y géneros relacionados) y la familia *Streptosporangiaceae* (principalmente *Streptosporangium*) (43, 44, 45).

Actualmente se sabe que de más de ocho mil productos antimicrobianos descritos en la base de datos del ABL, el 45,6% son producidos por el género *Streptomyces* y sólo el 21,5% son producidas por hongos, sin embargo muchos de los productos de hongos son: toxinas de plantas ó inhibidores de enzimas en mamíferos. Otros géneros bacterianos producen 16,9% de los agentes anti-infecciosos, un 16% producido por cepas que pertenecen a géneros poco estudiados de actinobacterias (46).

El objetivo, en la detección de nuevos metabolitos de interés industrial se ha enfocado en la detección de los marcadores en géneros de actinobacterias menos explotados, tales como: *Actinomadura*, *Actinoplanes*, *Amycolatopsis*, *Dactylosporangium*, *Kibdelosporangium*, *Microbispora*, *Micromonospora*, *Planobispora*, *Streptosporangium* y *Planomonospora*. La importancia de los géneros poco estudiados de actinobacterias es demostrado por el hecho de que muchos de los productos exitosos y con potencial actividad antibiotica en el mercado son producidos por: *Amycolatopsis mediterranei* que produce erifamicinas, *Saccharopolyspora erythraea* que produce eritromicina, *Actinoplanes teichomyceticus* con producción de teicoplanina, *Amycolatopsis orientalis* de la cual se obtiene vancomicina y *Micromonospora*

*purpurea* de la cual se obtiene la gentamicina. Estos microorganismos son tan fáciles de aislar como *Streptomyces* u otras actinobacterias (46, 47).

### **1.3. Microorganismos con presencia de los sistemas PKS y NRPS**

En las últimas décadas se ha presentado un enorme progreso en las investigaciones sobre la biosíntesis de metabolitos secundarios con actividades biológicas, producidos por microorganismos (48).

El acercamiento con nuevas tecnologías permitió conocer las secuencias de metabolitos secundarios del ADN en los microorganismos, lo cual facilitó el hecho de conocer cuales eran los segmentos de ADN con la responsabilidad de sintetizar las complejas y sofisticadas maquinas moleculares conocidas como los sistemas PKS y NRPS. La biología molecular no solo permitió conocer el grupo de genes encargados de sintetizar biomoléculas de gran interés en distintas áreas, si no que también permitió conocer la distribución en los distintos taxones bacterianos como lo muestran las Tablas i y ii en Anexos. Por lo cual en la actualidad se conoce que los sistemas PKS y NRPS se encuentran en el phylum (30):

1. Proteobacteria.
2. Firmicutes.
3. Cyanobacteria
4. Bacteriodetes.
5. Sphingobacteria.
- 6. Actinobacteria.**

#### **1.3.1. Actinobacterias con presencia de los sistemas PKS y NRPS**

Las actinobacterias son bacterias gram positivas que poseen un alto contenido de enlaces Guanina Citosina (G+C) en su ácido desoxirribonucleico (ADN) y crecen formando filamentos ramificados (49). Estas bacterias representan una de las mayores unidades taxonómicas entre los 18 principales linajes reconocidos actualmente en el dominio bacteria, el orden de los Actinomicetales (comúnmente llamados actinomicetos) incluye 5 subclases y 14 subórdenes (50).

Un ejemplo del amplio potencial metabólico de las actinobacterias, es la producción aproximada 10, 000 metabolitos secundarios que se han descubierto (51), sin embargo tan



solo 7,000 metabolitos se han reportado en el Diccionario de Productos Naturales (52). Dentro de estos compuestos naturales se ha determinado la producción de antibióticos, pigmentos, agentes antitumorales, agentes inmunosupresores y enzimas (53).

La gran mayoría de estos compuestos son derivados del género *Streptomyces*, este género por sí solo representa el 80% de los productos naturales provenientes de actinobacterias (54).

Los géneros de este grupo son muy diversos e incluyen algunos patógenos para el hombre y los animales, así como géneros de actinobacterias que se han aislado de diversos ambientes como: el suelo (donde se encuentran ampliamente distribuidos), agua dulce, agua marina, composta; también se han descrito actinobacterias provenientes de ambientes extremos, como son los que involucran altas y bajas temperaturas, pH ácido y alcalino, elevadas concentraciones de NaCl (55). Las actinobacterias halófilas representan un grupo de gran interés para diversas líneas de investigación, debido al amplio potencial para producir metabolitos secundarios que poseen, proporcionando una diversidad de productos que pueden ser utilizados en áreas como: medicina, farmacia, microbiología industrial, biotecnología, microbiología agrícola, microbiología veterinaria, agronomía y fitopatología (56).

#### **1.4. Determinación de metabolitos secundarios en actinobacterias a través de primers específicos para los sistemas PKS y NRPS**

Durante las últimas décadas el rápido desarrollo en los métodos de biología molecular han estado íntimamente relacionados con el mejoramiento en la producción de compuestos de origen bacteriano, este desarrollo ha sido significativo para entender las vías de señalización en la biosíntesis de compuestos y dar a conocer un innumerable grupo de genes. Con todos estos conocimientos que se han ido descubriendo y combinando el grado de avance de la bioinformática actualmente es posible la predicción razonable de una biomolécula producto de una vía de señalización (57, 58).

Múltiples métodos de huella molecular han sido desarrollados a partir de secuencias de bacterias, en específico para el orden de los Actinomycetales, las secuencias son elegidas al azar con aquellas del genoma bacteriano que muestran posibles aplicaciones (59). Alternativamente la amplificación de secuencias específicas de genes ribosomales o el análisis y restricción de los productos de rADN por medio de PCR (60), son frecuentemente utilizados para evaluar la

diversidad y distinguir estas secuencias específicas en actinobacterias. Hay muchos ejemplos donde la búsqueda por PCR de los genes asociados al metabolismo secundario es usada para evaluar la potencial biosíntesis de metabolitos secundarios en actinobacterias, esto incluye identificar los sistemas modulares PKS y NRPS (61, 62, 63), para lo cual en 2004 y 2005 Ayuso et. al. publicaron el diseño de primers específicos para detectar los sistemas PKS y NRPS específicamente para actinobacterias estos primers son:

Para el sistema PKS:

K1f: 5'-TSAAGTCSAACATCGGBCA-3'

M6r: 5'-CGCAGGTTSCSGTACCAGTA-3'

Para identificar el sistema NRPS los primers:

A3f: 5'-GCSTACSYSATSTACACSTCSGG-3'

A7r: 5'-SASGTCVCCSGTSCGGTAS-3' (21, 64).

El método de búsqueda de nuevos marcadores moleculares que expresaran metabolitos secundarios combinado con métodos tradicionales ha incrementado el conocimiento y las oportunidades de encontrar metabolitos secundarios con interesantes actividades biológicas. Los proyectos de secuencias en microorganismos han mostrado una diversidad comparable y novedosa en la detección de vías de síntesis. Los métodos de biología molecular y productos naturales químicos tienen que ir de la mano y hacer los descubrimientos accesibles o llevarlos a la práctica (65).

### **1.5. Identificación de microorganismos por técnicas de biología molecular**

Los métodos habituales para identificar las bacterias en microbiología están basados en las características fenotípicas tales como: morfología microscópica, tinción de Gram, características morfológicas de cultivo, reacciones bioquímicas para detectar algunos metabolitos, etc. Con los avances de la ciencia y la tecnología, se ha determinado la importancia de realizar análisis genotípicos mediante el empleo de técnicas moleculares para la identificación de microorganismos. Estos métodos son más exactos por la elevada conservación del ADN dentro de cada especie (66, 67).

## **1.6. Identificación de actinobacterias mediante amplificación del Gen 16S rRNA**

En 1970, los investigadores comenzaron a desafiar la clasificación taxonómica de procariotas basados en la secuencia de nucleótidos del gen 5S rRNA o secuencias de aminoácidos de las proteínas, tales como citocromo c y ferredoxina. Para 1977, Carl R. Woese clasifica a los organismos procariotas basándose en el catálogo de oligonucleótidos del gen de 16S rRNA que conforma a la pequeña subunidad ribosomal 30S, revelando que los organismos procariotas se clasifican en 2 diferentes dominios: Bacterias y Archaea, por lo que el desarrollo de la tecnología en métodos para el ADN recombinante y la secuenciación permitieron una rápida comparación y clasificación entre especies. Por la realización de diversos experimentos realizados se sabe que dos organismos con un 70% de homología de hibridación ADN-ADN muestran aproximadamente el 97% de homología en la secuencia del gen 16S rRNA, referencia que es apenas significativa para comparar la secuencia con las depositadas en bases de datos y ello conocer el género y especie bacteriana (68, 69, 70, 71).

Hay seis razones por las que el gen 16S rRNA se ha convertido en el estándar de oro para el análisis filogenético:

- 1.- Es menos propenso a haber sufrido una transferencia horizontal del gene entre las especies.
- 2.- Es ubicuo en procariotas.
- 3.- Contiene aproximadamente 1500 bases, que es adecuada (o suficiente) para el análisis.
- 4.- Las secuencias del gen 16S rRNA son altamente conservadas y por lo tanto comparables entre especies lejanamente relacionadas.
- 5.- El gen 16S rRNA también contiene regiones variables, que permite la comparación entre especies estrechamente relacionadas.
- 6.- Algunas regiones del gen 16S rRNA están completamente conservados, permitiendo el uso de cebadores "universales" para la detección de PCR o secuenciación (72).

La razón más importante por la cual se cree que el gen 16S rRNA se emplea para representar la filogenia en los microorganismos: es que el gen 16S rRNA no es susceptible a la transferencia horizontal de genes (73).

### **1.6.1. 16S rRNA en la estructura de los ribosomas**

El ribosoma es un aparato de traducción universal y la subunidad 30S, en la que se encuentra el gen 16S rRNA, juega un papel en el reconocimiento de los codones de mRNA mediante los anti-codones de tRNA (74). El gen 16S rRNA interactúa con, nada menos, que 21 diferentes proteínas ribosomales para la construcción de la subunidad 30S. La región conservada del 16S rRNA es sensible a la mutación; incluso a mutaciones sutiles (es decir, a un único punto de mutación) que a menudo hacen que el ribosoma completo no sea funcional, por lo tanto, es razonable para los biólogos evolutivos la hipótesis de la transferencia horizontal de genes como las mutaciones que ocurren en las secuencias de nucleótidos. En contraste, los estudios genéticos han demostrado que el gen 16S o el inserto 23S rRNA son algo flexibles cuando se producen mutaciones dentro de las regiones variables (regiones no conservadas entre especies), incluyendo sitios de unión para algunas proteínas ribosomales (75, 76).

### **1.7. Estudio filogenético**

El descubrimiento de las técnicas de biología molecular, así como los métodos de secuenciación del gen 16S rRNA, secuenciación de ADN (77) e hibridación de ADN-ADN (78), ha establecido un valioso avance para establecerla filogenia molecular en los organismos procariontes a lo largo de las últimas décadas. Los objetivos de la filogenia molecular son los estudios de la evolución y desarrollo de las especies, así como la comparación de secuencias de algunas macromoléculas con el fin de clasificar de forma ordenada a los organismos en grupos. Estos datos, son preferibles sobre otros métodos moleculares por poseer cercanías evolutivas, debido a que permiten interpretaciones cuantitativas y directas, además que van conformando una creciente base de datos para subsecuentes referencias (79). Anteriormente la taxonomía bacteriana se realizaba tomando en cuenta las características morfológicas de los microorganismos (80, 81).

Los métodos de clasificación bacteriana han evolucionado desde finales del siglo 19 hasta nuestros días, ya que en la actualidad las técnicas de biología molecular ahora son consideradas de rutina para los taxonomistas microbiólogos, estas técnicas han modificado drásticamente como los microbiólogos analizan sus objetos de estudio, ya que ahora pueden elegir para el análisis filogenético un solo gen o integrar un análisis global basado en microarreglos (82).

Por otro lado los Árboles filogenéticos son una herramienta esencial para comprender el estudio de la evolución, además de ser un componente importante de una amplia variedad de análisis biológicos, a partir del genoma de una comunidad bacteriana. Hasta hace poco, los métodos para identificación filogenética que se habían aplicado en gran parte a secuencias obtenidas a través de proyectos del genoma y a la secuenciación de genes individuales utilizando PCR. Por estas razones la filogenia bacteriana se ha limitado a los estudios de genes específicos, sin embargo se ha demostrado el éxito que se tiene al generar un árbol filogenético a partir de la secuenciación del gen 16S rRNA, y mediante la ayuda de herramientas de bio-informática las cuales permiten que dichas secuencias (de cepas individuales) sean clasificadas en Unidades Taxonómicas Operacionales (OTUs por sus siglas en inglés) (83).

El factor más importante en la construcción de árboles filogenéticos fiables, parece ser el número de aminoácidos o nucleótidos usados. Así, los nodos representan eventos de especiación / mutación o duplicación, y la longitud de las ramas representan el tiempo de evolución (84). Los principales métodos de búsqueda de árbol filogenético son los métodos basados en matriz de distancia, máxima parsimonia, máxima verosimilitud (ML), y los métodos bayesianos. Los cuatro métodos son computacionalmente intensivos, en particular el ML, y los métodos bayesianos con la cadena de Markov Monte Carlo (MCMC) técnicas para determinar las probabilidades posteriores (PP) (85). Los programas informáticos comúnmente utilizados son: CLUSTALW (86), PHYML (87), PAUP (88), PHYLIP (89), PHILO-WIN (90) y TREEPUZZLE (91).

El empleo de técnicas de biología molecular como la identificación de los sistemas PKS y NRPS mediante PCR, ha permitido identificar cepas de microorganismos con la capacidad de producir biomoléculas sintetizadas por estos sistemas, siendo las actinobacterias uno de los Phylum más estudiados por su gran capacidad para producir metabolitos secundarios. Por otro lado se conoce la existencia especies de actinobacterias que pertenecen al grupo de los extremófilos, específicamente a los halófilos ya que requieren de cierta concentración de NaCl para poder crecer, actualmente se cuenta con el reporte de actinobacterias aisladas de ambientes salinos en México, sin embargo aún no se conoce si estos microorganismos presentan los sistemas PKS y NRPS, esta detección permitiría conocer si las cepas aisladas son aptas para la síntesis y producción de biomoléculas

## **2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

La identificación molecular y caracterización biológica de microorganismos útiles como agentes productores de compuestos bioactivos, ha sido de gran interés para la medicina, farmacia, investigación bioquímica y la agricultura moderna, sin embargo y a pesar de la gran cantidad de compuestos identificados surgió la necesidad de una revisión de objetivos y métodos para la detección de genes responsables de sintetizar compuestos útiles en distintas áreas, y de microorganismos provenientes de diversos ambientes (21, 63).

Por otro lado en las últimas 3 décadas, ha existido un enorme progreso en los programas de búsqueda de productos naturales para lo cual la biología molecular abrió el camino en el descubrimiento de genes responsables de rutas biosintéticas de antibióticos, uno de los descubrimientos importantes ha sido el de las familias de policétidos y péptidos no ribosomales, sintetizados por sistemas enzimáticos conocidos como policétido sintasa (PKS) y sintetasa de péptido no ribosomal (NRPS) encargados de la producción de compuestos con importante aplicación en biomedicina entre los cuales se encuentran: antibióticos, antifúngicos, antihelmínticos, inmunosupresores, agentes antitumorales, inhibidores enzimáticos, antagonistas y agonistas de receptores, toxinas, feromonas, pesticidas y promotores del crecimiento en animales y plantas, estas familias han sido identificadas en distintos Taxones bacterianos, siendo las actinobacterias uno de los grupos bacterianos más reconocidos por la propiedad de ser excelentes productores de metabolitos secundarios (28, 60).

Las investigaciones que se han realizado en las últimas décadas se han centrado en la detección de los sistemas PKS y NRPS, en actinobacterias provenientes del suelo y del ambiente marino, por otro lado aún no se ha determinado la presencia de las familias de genes PKS y NRPS en actinobacterias aisladas de ambientes salinos.

### **Pregunta de Investigación**

**¿Los sistemas PKS Y NRPS, se encuentran en cepas de actinobacterias halófilas?**

### 3. JUSTIFICACIÓN

Las familias de policétidos y de péptidos no ribosomales, son sintetizados por sistemas enzimáticos conocidos como policétido sintasa (PKS) y sintetasa de péptido no ribosomal (NRPS) identificados en algunos microorganismos como bacterias y hongos, estos sistemas biosintéticos están involucrados en la síntesis de metabolitos secundarios con importante actividad biológica, estos compuestos presentan aplicación en las áreas como: medicina, farmacia, investigación bioquímica y agricultura, algunos de estos compuestos son: antibióticos como penicilinas, vancomicinas, eritromicinas, entre otros; antifúngicos como nistatina; agentes antitumorales como ansamitiocina, bleomicina; antihelmínticos como avermectina y agentes inmunosupresores como FK506, FK520 y ramanicina (19).

Los metabolitos secundarios producidos por bacterias representan una gran variedad de compuestos producidos en la naturaleza, dicha variedad se ve reflejada en cerca de los más de 23,000 metabolitos secundarios microbianos conocidos, de los cuales el 42% los producen los hongos, el 32% por actinobacterias y el resto por otros taxones bacterianos (60).

Es conocido que las actinobacterias representan una de las fuentes de aislamiento y descubrimiento de nuevos metabolitos con actividad biológica, en particular el caso de las cepas aisladas de *Streptomyces* representando el género más prolífero ya que el 50% de las cepas presentan algún compuesto activo perteneciente a los sistemas PKS y NRPS (61).

Las investigaciones para identificar los sistemas PKS y NRPS en actinobacterias comenzó a dar un giro importante, enfocándose en la búsqueda y aislamiento en géneros de actinobacterias en géneros poco estudiados (cepas de los géneros *Actinoplanes*, *Amycolatopsis*, *Planobispora*, *Microbispora*, entre otros), en cepas provenientes de ambientes inusuales como los ambientes extremos, también se conoce la existencia de actinobacterias patógenas en humanos y animales a las cuales se podría identificar la presencia de los sistemas PKS y NRPS, ya que actualmente este grupo de actinobacterias se encuentra poco explorado (59).

Es importante resaltar que la biología molecular y las herramientas de bioinformática aplicadas en el descubrimiento de genes encargados de sintetizar una amplia variedad de metabolitos secundarios producidos por actinobacterias han revolucionando la biomedicina al cambiar o incrementar la expectativa y calidad de vida (61).

## 4. HIPÓTESIS

**Hipótesis alterna:** Las cepas de actinobacterias halófilas, contienen los sistemas PKS y NRPS.

**Hipótesis nula:** Las cepas de actinobacterias halófilas no contienen los sistemas PKS y NRPS.



## 5. OBJETIVOS:

### General:

- ✓ Determinar la presencia de los sistemas PKS y NRPS en cepas de actinobacterias halófilas.

### Específicos:

- ✓ Establecer y estandarizar el protocolo para la detección de los sistemas PKS y NRPS en cepas de actinobacterias halófilas.
- ✓ Detectar la presencia de los sistemas PKS y NRPS en cepas de actinobacterias halófilas, utilizando primers específicos.
- ✓ Realizar un análisis de polimorfismo de longitud del fragmento de restricción de genes (RFLP), a los productos de PCR del gen 16S rRNA de las cepas de actinobacterias halófilas.
- ✓ Identificar por amplificación y secuenciación del gen 16S rRNA las actinobacterias con presencia de los sistemas PKS y NRPS.

## **6. MATERIAL Y MÉTODOS:**

### **6.1. Diseño de Estudio**

**Tipo de estudio:** Experimental, descriptivo prospectivo.

**Universo:** Cepas de actinobacterias aisladas de ambientes: extremos (salinos).

**Método de muestreo:** Muestreo aleatorio estratificado.

**Tamaño de muestra:** 51 Cepas de actinobacterias.

### **6.2. Criterios de inclusión, exclusión y eliminación**

**Criterios inclusión:** Cepas de actinobacterias halófilas.

**Criterios exclusión:** Cepas de taxones bacterianos que no pertenezcan al Phylum actinobacteria.

**Criterios eliminación:** Cepas de actinobacterias que no presenten crecimiento.

### 6.3. Procedimiento

Se trabajó con cepas que forman parte de dos colecciones, pertenecientes al cepario del Laboratorio de Investigación en Microbiología Médica y Ambiental de la Facultad de Medicina de la UAEMex, y de cepas procedentes Colección Americana de Cultivos Tipo (American Type Culture Collection ATCC) , las cuales se describen a continuación:

- Colección I: 34 cepas de actinobacterias aisladas de suelos salinos de Oaxaca y Sonora.
- Colección II: 17 cepas aisladas del suelo salino sódico del ex lago de Texcoco.
- Cepa de referencia: *Saccharomonospora caesia* ATCC 49227 (92).
- Cepa de referencia: *Streptomyces venezuelae* ATCC15439 (93).

Una vez definida la muestra de cepas con la que se trabajó, se sembraron en medios de cultivo necesarios para su crecimiento y asegurar una cepa pura, una vez que se aseguro el crecimiento, dicha cepa se inculo en medio liquido, con el fin de extraer el material genético de los microorganismos y poder identificar la presencia de los sistemas PKS y NRPS.

#### 6.3.1. Medio de cultivo para actinobacterias halófilas

En el caso de las actinobacterias halófilas el medio que se uso fue el MH (94).

Componentes	g/L
Extracto de levadura	10
Proteosa peptona	5
Glucosa	1
Agar	18
Solución de NaCl al 10%	esp IL

#### *Elaboración del medio de cultivo solido*

##### *Procedimiento*

1. Se pesó cada uno de los componentes en una balanza granataria.
2. Después se verterieron en un matraz Erlenmeyer, con solución salina.
3. Posteriormente se ajustó el pH a 7.4 y 8.5 con solución de NaOH 1M, en un potenciómetro.

- 
4. Se colocó el matraz sobre la parrilla con agitación, para que todos los componentes se incorporen y se colocó en la autoclave para su esterilización, a una temperatura de 120 ° C por 15 minutos.
  5. Finalmente se dejará enfriar el medio de cultivo, para posteriormente verterlo en cajas petrí.
- 

Una vez preparado el medio de cultivo se vertieron 20 ml de medio en cajas petrí, en las cuales se sembraron los microorganismos por la técnica en estría, con esta técnica se permitió observar el crecimiento de colonias aisladas, se incubaron las placas a 37°C de 7 a 10 días.

### ***Elaboración del medio de cultivo líquido***

#### *Procedimiento*

- 
1. Se pesarán cada uno de los componentes en una balanza granataria.
  2. Después se vertieron en un matraz Erlenmeyer, con solución salina.
  3. Posteriormente se ajustó el pH a 7.4 y 8.5 con solución de NaOH 1M, para lo cual se utilizó un potenciómetro.
  4. Al terminar lo anterior se colocó el matraz sobre la parrilla con agitación, para que todos los componentes se incorporaran y se colocó el medio en matraces de 150 ml en la autoclave para su esterilización, a una temperatura de 120 ° C por 15 minutos.
- 

Una vez que se dejó enfriar el medio líquido, se inoculará el microorganismo en los matraces con medio líquido, dejando en incubación a 37°C de 7 a 10 días.

### ***Elaboración del medio de cultivo sólido Extracto de Malta para reactivar las cepas de referencia***

Componentes	g/L
Extrato de Malta	10
Glucosa	1
Extracto de levadura	5
Peptona de carne	2
Peptona de caseína	4
Triptona	1
Agar	15
Agua destilada	esp IL

### *Procedimiento*

- 
1. Se pesaron y se midieron todos los componentes del medio de cultivo Extracto de Malta en una balanza granataria y probeta graduada.
  2. Después se agregaron los componentes en un matraz Erlenmeyer, con agua destilada.
  3. Se ajustó el pH a 7.5 con solución de NaOH 1M, para lo cual se utilizó un potenciómetro.
  4. Al terminar lo anterior se colocó el matraz sobre la parrilla con agitación, para que el agar y el agua se incorporaran y se colocó el medio en la autoclave para su esterilización, a una temperatura de 120 ° C por 15 minutos.
- 

Una vez preparado el medio de cultivo se vertieron 20 ml de medio en cajas petrí, en las cuales se sembraron los microorganismos por la técnica en estría, se incubaron las placas a 37°C de 7 a 10 días.

### ***Elaboración del medio de cultivo liquido***

#### *Procedimiento*

- 
1. Se pesaron y se midieron todos los componentes del medio de cultivo Extracto de Malta en una balanza granataria y probeta graduada.
  2. Después se vertieron en un matraz Erlenmeyer, con agua destilada.
  3. Posteriormente se ajustó el pH a 7.5 con solución de NaOH 1M, para lo cual se utilizó un potenciómetro.
  4. Se colocó el matraz sobre la parrilla con agitación, y se vació el medio en matraces de 150 ml en la autoclave para su esterilización, a una temperatura de 120 ° C por 15 minutos.
- 

Una vez que se dejó enfriar el medio líquido, se tomará una pequeña muestra de la cepa la cual se inoculará en los matraces con medio líquido, dejando en incubación a 37°C de 7 a 10 días.

### **6.3.2. Caracterización morfológica de actinobacterias**

#### ***Morfología macroscópica***

La selección de cepas de actinobacterias se realizó de acuerdo a las características morfológicas reportadas en el Manual de Bergey's (95) de acuerdo a: tamaño, color, forma, textura, presencia de esporulación y de pigmento difusible en el agar.

#### ***Morfología microscópica***

A las colonias seleccionadas se les realizó la tinción de Gram, y fueron observadas al microscopio óptico, se seleccionarán las cepas Gram positivas que presentarán células filamentosas ramificadas.

#### ***Frotis para realizar tinción de Gram***

##### *Procedimiento*

- 
1. Se colocó una pequeña gota de agua destilada en el centro de un porta objeto limpio.
  2. Posteriormente se esterilizó el asa de siembra, y se tomó una pequeña cantidad del cultivo bacteriano el cual fue transferido a la gota de agua.
  3. Después se removió la mezcla con el asa de siembra hasta formar una suspensión homogénea se dejó secar hasta la evaporación.
  4. Se pasó tres veces el portaobjetos por la llama durante unos segundos, para fijar las células.
- 

##### *Tinción de Gram*

- 
5. Se colocó unas gotas cristal violeta sobre el frotis seco, se dejó actuar al colorante por 1 minuto. Al transcurrir el minuto, se enjuagó bajo un chorro de agua.
  6. Se aplicó yodo lugol durante 1 minuto, el frotis se decoloró con alcohol-acetona, hasta que ya no escurrió el colorante, posteriormente se enjuagó bajo un chorro de agua.

7. Se tiñó, utilizando un colorante de contraste como la safranina, el cual se dejó actuar durante 30 segundos y se enjuagó con agua, se dejó secar y posteriormente se observó al microscopio óptico 100x colocando una gota de aceite de inmersión.
- 

### **6.3.3. Caracterización fisiológica de actinobacterias**

Se determinó el crecimiento óptimo de las cepas aisladas de actinobacterias en diferentes concentraciones de NaCl, pH y temperatura, para las cepas aisladas de actinobacterias.

Las cepas se inocularon en medio MH a las siguientes concentraciones de NaCl: 0, 0.5, 3, 5, 10, 15, 20, 25 y 30%; pH 7.4 y las mismas concentraciones de NaCl a pH 8.5 a 37 °C. El pH se evaluó en medio MH al 10% de NaCl en los siguientes valores: 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 y 12 a 37 °C. La temperatura se determinó incubando en medio MH al 10% de NaCl, en pH 7.4 y 8.5 a 21 °C, 26 °C, 37 °C, 42 °C, 45 °C y 50 °C. Se realizaron observaciones diarias durante 15 días. El crecimiento óptimo de las cepas para cada parámetro se estableció considerando el valor al cual el crecimiento fue más abundante.

### **6.3.4. Extracción de ADN**

Como primer paso para la identificación de los sistemas PKSy NRPS en las cepas de actinobacterias se realizó la extracción de ADN, se utilizó el kit Promega Wizard® Genomic No. de catalogo A1120.

#### ***Protocolo para la extracción de ADN***

---

1. Re suspender completamente el pellet de células con 480µL de EDTA 0.5M
2. Se adiciona 120µl de lizosima al pellet re suspendido, se mezcla cuidadosamente.
3. Después se incuba la muestra a 37° C por 1 hora, se centrifuga a 14 000 rpm durante 2 minutos y se removerá el sobrenadante.
4. Posteriormente se agregan 600µl de solución nuclear de lisis del paquete de purificación de ADN “Promega Wizard® Genomic” mezclando cuidadosamente.
5. Se incuba a 80° C durante 5 minutos y se deja enfriar a temperatura ambiente.

6. Se adicionan 3µL de solución de RNAsa del paquete de purificación de ADN “Promega Wizard® Genomic”, se mezcla por el método inversión el tubo 3 veces.
  7. Se Incuba el tubo a 37° C por 1 hora, se deja enfriar a temperatura ambiente.
  8. Se añaderán 200µl de solución de precipitación de proteínas del paquete de purificación de ADN “Promega Wizard® Genomic” al lisado tratado con RNAsa, se agitará con el vortex vigorosamente durante 20 seg. para mezclar.
  9. Se incubará la mezcla en hielo durante 5 min.
  10. Posteriormente se centrifuga a 14 000 rpm por 3 min y se transfiere el sobrenadante a un tubo de ependorf de 1.5 mL limpio y esteril conteniendo 600 µl de isopropanol.
  11. Se mezcla suavemente hasta que se observe la formación de hebras de ADN visibles.
  12. Después se centrifuga a 14 000 rpm durante 2 minutos.
  13. Se drena cuidadosamente el tubo en papel absorbente, se adiciona 600µl de etanol al 70% y se invierte el tubo varias veces delicadamente para no despegar el pellet de ADN.
  14. Se centrifugará a 14 000 rpm durante 2 minutos, se elimina cuidadosamente el etanol, y se deja secar el tubo durante 10 a 15 min.
  15. Finalmente se agregan 100µl de solución de rehidratación del paquete de purificación de ADN “Promega Wizard® Genomic” y se incuban en refrigeración (4° C).
- 

### ***Electroforesis***

Los productos de extracción se visualizarón para evaluar la presencia y la calidad del ADN en cada muestra.

### ***Elaboración***

- 
1. Se colocaron 0.25gr de agarosa y 25ml de solución TAE 1X en un matraz de 200ml.
  2. Se agito suevamente y se calentó en el horno de microondas por 40 segundos aproximadamente, hasta que se disuelvan los sólidos.
  3. Se armó la cámara de electroforesis horizontal y se verte la agarosa sobre el molde, se dejó solidificar la agarosa, se retiró cuidadosamente el peine.
  4. Se tomarón 5 µl de muestra y se mezcló con el buffer de carga, se colocó la mezcla en los pozos cuidadosamente. Se colocarón 5 µl marcador de peso molecular (300-10,000 bp, Trading New Technologies No. de catalogo Axygen M-ADN-1Kb).
  5. Se cerró la cámara de electroforesis y se programó a 120 Volts y 300 microAmpers por 35 min.
-



6. Se colocó el gel de agarosa en la cámara de tñido que contenía una solución de bromuro de tido (BrEt), durante 40 segundos.
  7. Se transfirió el gel al fotodocumentador, se colocó la tapa y se encendió la luz ultravioleta así como la cámara fotográfica.
  8. Finalmente se capturó la imagen y se guardó el archivo.
- 

### **6.3.5. Detección los sistemas PKS y NRPS**

#### *Amplificación de los sistemas PKS y NRPS*

Para la identificación de los sistemas PKS y NRPS se utilizaron los primers universales diseñados para Actinobacterias (21), así como las cepas de referencia *Saccharomonospora caesia* ATCC 49227 y *Streptomyces venezuelae* ATCC 15439, a las que se les conoce la presencia de los sistemas, teniendo la certeza de que los productos identificados de las cepas estudiadas correspondan a la amplificación de los sistemas PKS y NRPS. La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se llevó a cabo en un termociclador utilizando Taq ADN Polimerase in Storage Buffer B (Promega® M1661).

Las condiciones que se usaron en el ciclo térmico para la amplificación del sistema PKS fueron: un ciclo de desnaturalización inicial de 5 minutos a una temperatura de 95°C, 35 ciclos de 30 segundos a 95°C, 2 minutos de extensión a una temperatura de 55°C para los primers:

K1f: 5'-TSAAGTCSAACATCGGBCA-3'  
M6r: 5'-CGCAGGTTSCSGTACCAGTA-3'

Las condiciones para la amplificación del sistema NRPS fueron: un ciclo de desnaturalización inicial de 5 minutos a una temperatura de 95°C, 35 ciclos de 30 segundos a 95°C, 2 minutos de extensión a una temperatura de 58°C para los primers:

A3f: 5'-GCSTACSYSATSTACACSTCSGG-3'  
A7r: 5'-SASGTCVCCSGTSCGGTAS-3'

Se realizó la PCR multiplex para amplificar el sistema PKS y el sistema NRPS se utilizaron las siguientes condiciones: 4 minutos de elongación a una temperatura de 72°C, el paso de

extensión final que se llevará a cabo en 10 minutos a una temperatura de 72°C, para los primers:

K1f: 5'-TSAAGTCSAACATCGGBCA-3'

M6r: 5'-CGCAGGTTSCSGTACCAGTA-3'

A3f: 5'-GCSTACSYSATSTACACSTCSGG-3'

A7r: 5'-SASGTCVCCSGTSCGGTAS-3'

Los productos de PCR se observaron mediante una electroforesis en el gel de agarosa al 1%.

### ***Secuenciación y análisis de los sistemas PKS y NRPS en cepas de actinobacterias.***

Se seleccionaron algunas cepas de cada especie identificada con la presencia de los sistemas PKS y NRPS para realizar un análisis predictivo de síntesis de biomoléculas. Las secuencias enviadas al servicio de secuenciación MacroGen Maryland USA fueron corregidas y ensambladas usando el programa ChromasPro versión 1.5. (Technelysium Pty. Ltd, <http://www.technelysium.com.au>). La traducción de las secuencias consenso de nucleótidos a aminoácidos se realizó utilizando la herramienta del portal ExPASy (<https://www.expasy.org/>), para ambos sistemas. Se utilizó el algoritmo de BLASTP del NCBI para comparar las secuencias de aminoácidos de los sistemas PKS y NRPS con las depositadas en la base de datos del GenBank y así localizar géneros de actinobacterias que compartan semejanza con las cepas identificadas en este estudio al nivel de PKS y NRPS. Se realizó una consulta en el NCBI para localizar reportes relacionados a la síntesis de biomoléculas por los géneros que presentaron algún porcentaje de semejanza.

El análisis de predicción se realizó comparando las secuencias de aminoácidos de cada sistema con las bases de datos del Structure Based Sequence Analysis of Polyketide Synthases (SBSPKS) (96).

### ***Análisis filogenético de los sistemas PKS y NRPS***

Se construyó un árbol filogenético con las secuencias de aminoácidos obtenidas de la amplificación de los dominios ketosintasa (KS) y adenilación (A), mediante el programa MEGA versión 7.0.21 (97) se empleó el método de neighbor-joining (98), la topología del árbol filogenético fue evaluada por bootstrap de 1000 replicaciones, las distancias evolutivas se calcularon utilizando el método de corrección de Poisson (99), se utilizó como raíz del árbol para el sistema PKS (dominio ketosintasa KS) a *Mycobacterium abscessus* DSM 44196 y

*Amycolatopsis marina* NBRC 104263 como raíz del árbol para el sistema NRPS (dominio adenilación A).

### **6.3.6. Identificación genética**

#### ***Amplificación del gen 16S rRNA***

Se realizó la identificación de los microorganismos por medio de la amplificación y secuenciación del gen 16S rRNA. Se utilizaron las siguientes secuencias de nucleótidos, como primers universales:

27f: 5'- AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG-3'  
518f: 5'-CCA GCA GCC GCG GTA ATA CG-3'  
1492r: 5'- TAC GGY TAC CTT GTT ACG ACT T-3'  
800r: 5'-TAC CAG GGT ATC TAA TCC-3

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se llevó a cabo en un termociclador AXYGEN modelo: MAXYGENE II (No. de catalogo: THERM 1001), utilizando Taq ADN Polimerase in Storage Buffer B (Promega M1661). Las condiciones usadas en el ciclo térmico para la amplificación del gen fueron las siguientes: un ciclo de 5 minutos a una temperatura de 94°C, desnaturalización inicial; 45 segundos a una temperatura de 94°C desnaturalización; la temperatura de alineación depende de la T<sub>m</sub> (temperatura de fusión) del indicador, esta se llevó a cabo durante 1 minutos a 46°C, el tiempo de la extensión depende del tamaño del fragmento que se amplificará, a 72°C durante 50 segundos, por un total de 29 ciclos con una extensión final de 5 minutos a 72°C. Los fragmentos amplificados fueron observados mediante una electroforesis en el gel de agarosa al 1%.

#### ***Secuenciación***

Los productos amplificados se enviaron al servicio de secuenciación de Macro Gen U.S.A., para poder obtener las secuencias y así identificar por especie al microorganismo aislado.

#### ***Análisis filogenético***

Las secuencias obtenidas fueron ensambladas y alineadas utilizando el programa BioEdit y CromasPro (Technelysium Pty. Ltd, <http://www.technelysium.com.au>), una vez alineadas se compararon con las secuencias depositadas en las bases de datos: EzTaxon, Blast, RDP II y Le BIBI. Para el analisis filogenetico se alinearon las secuencias obtenidas con las de otras especies de los géneros identificados auxiliándose del programa de bioinformatica ARB

Project 6.0.2 (100) empleando la base de datos de 16SrRNA silva (101), así como el programa MEGA versión 7.0.21 (97).

Para la construcción del árbol filogenético, con las secuencias alineadas, se utilizaron tres métodos distintos: *neighbour-joining*, *maximun-likelihood* y *maximum-parsimony*, la estabilidad de cada una de las ramas se calculó mediante una estimación de los valores de bootstrap (buscando valores ideales de 100).

### **6.3.7. Ribotipificación**

#### ***Polimorfismo de Longitud del Fragmento de Restricción (RFLP)***

Este análisis se usó para la identificar diferencias entre las especies o cepas estudiadas, esta técnica permite conocer la variabilidad de las especies identificadas.

#### *Procedimiento*

- 
1. Se realizó la amplificación del gen 16 rRNA.
  2. Posteriormente se utilizaron las enzimas: Rsa I, Msp I, Hae III.
  3. Se colocaron 10ml del producto de amplificación y se adiciono la mezcla con la enzima.
  4. Se lleva la mezcla con el amplicon y la enzima a 37°C durante una hora, posteriormente se llevaron a 80 °C.
  5. Para observar los cortes enzimáticos se realiza un gel de agarosa al 1.5%.
-

#### **6.4. Implicaciones Bioéticas**

- 1) La investigación que se realizó con base en el artículo 79, del reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Investigación para la Salud, título IV Bioseguridad de las Investigaciones (102).
- 2) El Convenio de Río de Janeiro sobre la diversidad biológica el cual se llevo a cabo en la Río de Janeiro del 3 al 14 de junio de 1992, culminando con la firma del convenio con el número de registro 93/626/CEE el 25 de Octubre de 1993, en la que se definen los derechos y obligaciones de los estados en materia de medio ambiente y desarrollo para conseguir el equilibrio entre las necesidades económicas y sociales con la explotación, conservación y utilización sostenible de los recursos y la protección del Medio Ambiente. Entre los principios definidos en el documento destacan: el prever y atajar en su fuente las causas de reducción o pérdida significativa de la diversidad biológica, debido a su valor intrínseco y a los valores de sus componentes medioambientales, genéticos, sociales, económicos, científicos, educativos, culturales, recreativos y estéticos. El Convenio trata igualmente de promover la cooperación entre los estados miembros y las organizaciones intergubernamentales (103).
- 3) El protocolo de Cartagena Sobre Seguridad de la Biotecnología, con número de Decisión 2002/628/CE firmado el 25 de junio de 2002, el objetivo del protocolo de Cartagena sobre la bioseguridad es garantizar que la transferencia, la manipulación y la utilización de los organismos vivos modificados por medio de las técnicas de la biotecnología moderna no tienen efectos negativos sobre la biodiversidad o la salud humana, haciendo especial hincapié en los movimientos transfronterizos (104).
- 4) Apegandonos al Protocolo de Nagoya sobre Acceso a los Recursos Genéticos y Participación Justa y Equitativa en los Beneficios que se Deriven de su Utilización al Convenio sobre la Diversidad Biológica, adoptado en Nagoya el 29 de Octubre de 2010, entrando en vigor en México el 12 de octubre de 2014. El objetivo de este protocolo es la participación justa y equitativa en los beneficios que se deriven de la utilización de los recursos genéticos, teniendo en cuenta todos los derechos sobre dichos recursos y tecnologías por medio de la financiación apropiada, contribuyendo por ende a la conservación de la diversidad biológica y la utilización sostenible de sus componentes (105).

## **7. RESULTADOS**

### **7.1. Draft genome sequence of *Saccharomonospora* sp. LRS4.154, a moderately halophilic actinobacteria with the biotechnologically relevant systems PKS and NRPS**

#### **7.1.1 Página frontal del artículo publicado**

#### **Draft genome sequence of *Saccharomonospora* sp. LRS4.154, a moderately halophilic actinobacteria with the biotechnologically relevant systems PKS and NRPS**




**Scarlett Alonso-Carmona,<sup>a</sup> Blanca Vera-Gargallo,<sup>b</sup> Rafael R. de la Haba,<sup>b</sup> Antonio Ventosa,<sup>b</sup> Horacio Sandoval-Trujillo,<sup>c</sup> Ninfa Ramirez-Duran,<sup>a#</sup>**



Faculty of Medicine, Autonomous University of the State of México, Toluca, Mexico<sup>a</sup>;  
Departament of Microbiology and Parasitology, Faculty of Pharmacy, University of Sevilla, Sevilla, Spain<sup>b</sup>; Departament of Biological Systems, Autonomous University Metropolitana-Xochimilco, México, DF, Mexico<sup>c</sup>

Running Head: Draft genome of *Saccharomonospora* sp. LRS4.154

#Address correspondence to Ninfa Ramirez-Duran, [ninfard@hotmail.com](mailto:ninfard@hotmail.com)

## 7.1.2. Carta de Aceptación

 **asm@msubmit.net** 29 mar. ☆  

 para mí 

Dear Dr. Alonso-Carmona,

On March 29, 2017, we received the manuscript "Draft genome sequence of *Saccharomonospora* sp. LRS4.154, a moderately halophilic actinobacteria with the biotechnologically relevant systems PKS and NRPS." by Scarlett Alonso-Carmona, Blanca Vera-Gargallo, Rafael R. de la Haba, Antonio Ventosa, Horacio Sandoval-Trujillo, and Ninfa Ramírez-Durán. The submission form indicates that this paper should be processed as a(n) **Genome Announcement** intended for publication in the section Prokaryotes.

The manuscript has been assigned the control number genomeA00392-17. Take note of this number, and refer to it in any correspondence with the Journals Department or with the editor.

You can check the status of this manuscript by clicking on the link below and selecting Check Status:

<https://genomea.msubmit.net/cgi-bin/main.plex?el=A2IG4BCeY4A3DHuy7F4A98dcWfImVsSfUfZhAxMnrCKQZ>

All authors must disclose any commercial affiliations as well as consultancies, stock or equity interests, and patent-licensing arrangements that could be considered to pose a conflict of interest regarding the submitted manuscript. All funding sources for the project, institutional and corporate, and any potentially conflicting interests, such as relationships that might detract from an author's objectivity in presentation of study results, must be acknowledged, both in the Acknowledgments section and on this form. The corresponding author must review this policy with all coauthors.

The author submitting the manuscript must state in the submission form whether or not any of the authors has a conflict of interest. Here is how Dr. Ramírez-Durán responded:

Conflict of Interest: No conflict of interest.

If you have a conflict of interest that is not disclosed here, please notify the journal staff immediately at [aesplin@asmusa.org](mailto:aesplin@asmusa.org).

In submitting your manuscript to genomeA, the author(s) guarantees that a manuscript with substantially the same content has not been submitted or published elsewhere and that all of the authors are aware of and agree to the submission.

By publishing in the journal, the authors agree that any DNAs, viruses, microbial strains, mutant animal strains, cell lines, antibodies, and similar materials newly described in the article are available from a national collection or will be made available in a timely fashion, at reasonable cost, and in limited quantities to members of the scientific community for noncommercial purposes. The authors guarantee that they have the authority to comply with this policy either directly or by means of material transfer agreements through the owner.

Similarly, the authors agree to make available computer programs, originating in the authors' laboratory, that are the only means of confirming the conclusions reported in the article but that are not available commercially. The program(s) and suitable documentation regarding its (their) use may be provided by any of the following means: (i) as a program transmitted via the Internet, (ii) as an Internet server-based tool, or (iii) as a compiled or assembled form on a suitable medium (e.g., magnetic or optical). It is expected that the material will be provided in a timely fashion and at reasonable cost to members of the scientific community for noncommercial purposes. The authors guarantee that they have the authority to comply with this policy either directly or by means of material transfer agreements through the owner.

ASM charges a flat fee for **Genome Announcements**. The fee (subject to change without notice) is \$370 for a corresponding author who is an active ASM member at the Contributing or Premium level or \$560 for a nonmember or Supporting member corresponding author. A corresponding author who is not a Contributing or Premium member may join ASM to obtain the member rate. Please note that waivers of publication charges are not considered for **Genome Announcements**.

Thank you for submitting your work to **Genome Announcements**.

Regards,  
genomeA staff

### 7.1.3. ABSTRACT

The draft genome sequence of *Saccharomonospora* sp. LRS4.154, a moderately halophilic actinobacteria, has been determined. The genome has 4,860,108 bp, G+C content of 71.0 mol% and 4,525 ORFs. The clusters of *PKS* and *NRPS* genes, responsible for the biosynthesis of a large number of biomolecules, were identified in the genome.

### 7.1.4. Apartados del artículo

Actinobacteria represents a group of microorganisms prolific in producing secondary metabolites (1). However, the biotechnological potential of its halophilic representatives remains unexplored (2). The ability of synthesizing secondary metabolites is closely associated to the identification of the polyketide synthase (PKS) and nonribosomal peptide synthetase (NRPS) gene clusters in an actinobacterial genome sequence. These genes are responsible for the synthesis of antibiotics, biosurfactants, siderophores, immunosuppressants, antitumoral and antiviral agents, and biomolecules with important medical and biotechnological applications (3, 4).

The strain LRS4.154 is a moderately halophilic actinobacteria, isolated from a soil sample of Laguna del Rosario in Oaxaca, México. Based on 16S rRNA gene sequence comparisons, the strain LRS4.154 could be affiliated to the genus *Saccharomonospora*, being *Saccharomonospora azurea* and *Saccharomonospora xinjiangensis* the most closely relatives sharing 98.4% 16S rRNA gene sequence similarities, respectively. The aim for this work is know the potential to this strain to futures applications in the biomedical areas.

The draft genome sequence of *Saccharomonospora* sp. LRS4.154 was accomplished using a whole-genome shotgun strategy (5) on an Illumina HiSeq 2500 platform (2 x 100 bp paired-ends) (STAB VIDA, Portugal), yielding 12,366,802 reads and 846.63 Mbp. The genome



assembly was performed using the software Velvet v. 1.2.10 (6) and, resulted in 13 contigs ( $\geq$  1000 bp) with an N50 value of 731,563. The NCBI Prokaryotic Genome Annotation Pipeline (7) was used to identify ORFs and provide a functional annotation of protein-coding genes, as well as other functional genome units.

The draft genome is estimated to contain 4,860,108 bp, with a G+C content of 71.0 mol %. The reported coding density is 90.3% with 0.916 genes per Kbp. A total of 4,525 putative ORFs were predicted with an average size of 985 bp, as well as 2 ncRNA, 4 rRNA (1 16S rRNA, 1 23S and 5S rRNA) and 47 tRNA genes.

Analysis of the genome confirms the presence of six PKS and two NRPS gene clusters. These bioinformatic data suggest the potential of the halophilic actinobacterial strain LSR4.154 to produce secondary metabolites or unknown metabolites of PKS and NRPS origin.

**Accession number(s).** This Whole Genome Shotgun project has been deposited in DDBJ/ENA/GenBank under the accession no. MWIH00000000. The version described in this paper is the first version, MWIH01000000.

## **ACKNOWLEDGMENTS**

This work was funded by Red Hispano-Mexicana for the search and exploitation of extremophile microorganisms with environmental and biomedical applications #4035/2016RED, and the Spanish Ministry of Science and Innovation (grant number CGL2013-46941-P), with FEDER funds. B. V.-G. was recipient of a postgraduate fellowship from the Spanish Ministry of Education, Culture and Sports.

## REFERENCES

1. **Raja A, Prabakaran P.** 2011. Actinomycetes and drug-an overview. *Am J Drug Discov Dev* **1**:75–84. doi 10.3923/ajdd.2011.75.84.
2. **Hamedi J, Mohammadipanah F, Ventosa A.** 2013. Systematic and biotechnological aspects of halophilic and halotolerant actinomycetes. *Extremophiles* **17**:1-13.
3. **Roongsawang N, Lim SP, Washio K, Takano K, Kanaya S, Morikawa M.** 2005. Phylogenetic analysis of condensation domains in the nonribosomal peptide synthetases. *FEMS Microbiol Lett* **252**:143–151. doi 10.1016/j.femsle.2005.08.041.
4. **Jenifer JS, Donio MB, Michaelbabu M, Vincent SG, Citarasu T.** 2015. Haloalkaliphilic *Streptomyces* spp. AJ8 isolated from solar salt works and its' pharmacological potential. *AMB Express* **5**:143. doi 10.1186/s13568-015-0143-2.
5. **Fleischmann RD, Adams MD, White O, Clayton RA, Kirkness EF, Kerlavage R, Bult CJ, Tomb JF, Dougherty BA, Merrick JM, McKenney K, Sutton GG, FitzHugh W, Fields CA, Gocayne JD, Scott JD, Shirley R, Liu LI, Glodek A, Kelley JM, Weidman JF, Phillips CA, Spriggs T, Hedblom E, Cotton MD, Utterback T, Hanna MC, Nguyen DT, Saudek DM, Brandon RC, Fine LD, Fritchman JL, Fuhrmann JL, Geoghagen NS, Gnehm CL, McDonald LA, Small KV, Fraser CM, Smith HO, Venter JC.** 1995. Whole-genome random sequencing and assembly of *Haemophilus influenzae* Rd. *Science* **269**:496–512. doi 10.1126/science.7542800.
6. **Zerbino DR, Briney E.** 2008. Velvet: algorithms for de novo short read assembly using de Brijin graphs. *Genome Res* **18**:821–829. doi 10.1101/gr.074492.107.
7. **Tatusova T, DiCuccio M, Badretdin A, Chetvernin V, Ciufu S, Li W.** 2013. Prokaryotic Genome Annotation Pipeline. *In* Beck J, Benson D, Coleman J, Hoepfner M, Johnson M,

Maglott D, Mizrachi I, Morris R, Ostell J, Pruitt K, Rubinstein W, Sayers E, Sirotkin K, Tatusova T (ed), The NCBI Handbook [Internet], 2nd ed. National Center for Biotechnology Information (US), Bethesda, MD.

**7.2. Artículo enviado: IDENTIFICATION OF HALOPHILIC AND HALOALKALOPHILIC  
ACTINOBACTERIA WITH PRESENCE OF POLYKETIDE SYNTHASE AND NONRIBOSOMAL  
PEPTIDE SYNTHETASE SYSTEMS.**

**<sup>1</sup>Scarlett Alonso-Carmona, <sup>2</sup>Leobardo M. Gómez-Oliván, <sup>3</sup>Horacio Sandoval-Trujillo, <sup>1\*</sup>Ninfa Ramírez-Durán.**

<sup>1</sup>Laboratorio de Microbiología Médica y Ambiental, Facultad de Medicina, Universidad Autónoma del Estado de México, Toluca, México.

<sup>2</sup>Laboratorio de Toxicología Ambiental, Facultad de Química, Universidad Autónoma del Estado de México, Toluca, México.

<sup>3</sup>Departamento de Sistemas Biológicos, Universidad Autónoma Metropolitana-Xochimilco, Ciudad de México, México.

\*Corresponding autor: Ninfa Ramírez-Durán e-mail: ninfard@hotmail.com

**ABBREVIATIONS:** A: adenylation; KS: ketosynthase; MH: agar culture medium for moderately halophilic bacteria; NRPS: nonribosomal peptide synthetase; PCR: polymerase chain reaction; PKS-I: type I polyketide synthase.

## 7.2.1. Carta de envío

Extremophiles

[Home](#)

[Author](#)

[Review](#)

---

# Submission Confirmation

[Print](#)

---

Thank you for your submission

---

**Submitted to**  
Extremophiles

**Manuscript ID**  
EXT-17-Aug-0154

**Title**  
IDENTIFICATION OF HALOPHILIC AND HALOALKALOPHILIC ACTINOBACTERIA WITH PRESENCE OF POLYKETIDE SYNTHASE AND NONRIBOSOMAL PEPTIDE SYNTHETASE SYSTEMS

**Authors**  
Alonso-Carmona, Scarlett  
Gómez-Oliván, Leobardo  
Sandoval-Trujillo, Horacio  
Ramírez-Durán, Ninfa

**Date Submitted**  
15-Aug-2017

---

[Author Dashboard](#)

---

© Thomson Reuters | © ScholarOne, Inc., 2017. All Rights Reserved.  
ScholarOne Manuscripts and ScholarOne are registered trademarks of ScholarOne, Inc.  
ScholarOne Manuscripts Patents #7,257,767 and #7,263,655.

[@ScholarOneNews](#) | [System Requirements](#) | [Privacy Statement](#) | [Terms of Use](#)

### **7.2.2. Abstract**

Type I polyketide synthase (PKS-I) and nonribosomal peptide synthetase (NRPS) modular systems are involved in the synthesis of natural products in microorganisms such as actinobacteria. The present study identified halophilic and haloalkalophilic actinobacteria with presence of PKS-I and NRPS systems in order to predict the synthesis of bioactive molecules. A total of 51 actinobacterial strains isolated from saline and saline-sodic environments in Mexico were identified. Phylogenetic analysis based on sequencing of gene 16S rRNA showed that the strains isolated belong to the genera *Saccharomonospora*, *Actinopolyspora* and *Nocardiopsis*. The PKS-I system was detected in five strains of *Saccharomonospora*. The NRPS system was detected in six strains of *Nocardiopsis* and *Saccharomonospora*. Presence of both PKS-I and NRPS systems was detected in 37 strains of these three genera. Three strains did not contain PKS-I or NRPS systems. Prediction of biomolecular synthesis showed similitude with sequences of the antibiotics caerulomycin, amphotericin A and B, calcium-dependent antibiotic and pristnamycin. The potential to synthesize biomolecules was established in moderately halophilic and haloalkalophilic actinobacteria from saline environments in Mexico.

#### **KEYWORDS**

Type I polyketide synthase, Nonribosomal peptide synthetase, halophilic actinobacteria, haloalkalophilic actinobacteria.

### 7.2.3. Introducción

#### INTRODUCTION

Type I polyketide synthase (PKS-I) and nonribosomal peptide synthetase (NRPS) systems are synthesized by groups of genes coding for a variable number of modules with multiple enzymatic activities in the biosynthesis of bioactive compounds. Each module consists of three catalytic domains which are necessary for a complete elongation cycle in the synthesis of each system (Amoutzias et al. 2008; Weissman et al. 2015; Donadio et al. 1991). The structure and organization of these systems make possible the prediction of biomolecular synthesis based on the amino acid sequence resulting from nucleotide sequence translation (Khayatt et al. 2013).

The biosynthetic systems PKS-I and NRPS are involved in the synthesis of biologically active compounds with applications in medicine, agriculture and biochemical research (Bhanot et al. 2011; Demain 2014; Giddings and Newman 2013) such as antibiotics (penicillin, virginiamycin, erythromycin), antifungal medications (nystatin, amphotericin B, nikkomycin), antitumoral agents (calicheamicin, bleomycin, geldanamycin), antihelminthics (ivermectin, milbemycin) and immunosuppressants (rapamycin, FK506, ascomycin) (Gailey and Stefaniak 1946; Namwat et al. 2002; Liu et al. 2013; Fjaervik and Zotchev 2005; Bormann et al. 1999; Ahlert et al. 2002; Sugiyama et al. 1994; Wu et al. 2012; Ikeda et al. 2001; Nonaka et al. 2000; Gregory et al. 2004; Chen et al. 2012; Reeves et al. 2002).

PKS-I and NRPS biosynthetic systems have been found in diverse microbial taxa including myxobacteria (Wenzel and Müller 2007), cyanobacteria (Welker and Von Döhren 2006) and actinobacteria (Bérdy 2012). The latter group is of greater interest in detection of PKS-I and NRPS systems to predict biomolecular synthesis since two thirds of natural antibiotics come from actinobacteria (Barka et al. 2016) which are consequently a significant source of biologically active metabolites (León et al. 2007), particularly actinobacteria isolated from extreme environments such as hypersaline and saline-sodic systems.

Ayuso-Sacido et al. (2005) designed two sets of specific primers to detect PKS-I and NRPS systems, and tested these primers on 210 reference strains from type culture collections, representing 33 genera of actinobacteria. The PKS-I system was detected in 119 of these strains and the NRPS system in 167.

Most saline areas in Mexico are located on the Pacific Ocean or Gulf of Mexico coasts. Alcocer and Hammer (1998) reported 78 saline areas on Mexican coasts, 46 on the Pacific and 12 on the Gulf. Ramírez et al. (2004,

2006) isolated *Saccharomonospora* and *Actinopolyspora* from diverse saline environments in coastal areas of northern and southern Mexico. On the other hand, there are 109 inland saline lakes in the country (Alcocer and Hammer 1998) such as the former Lake Texcoco in central Mexico, which is characterized by its saline-sodic soil with 10-24% NaCl and pH values of 8.5-10.5 (Beltrán-Hernández et al. 1999, Navarro-Noya et al. 2015).

At present there are no studies relating in detail the diversity of halophilic and haloalkalophilic actinobacteria isolated from Mexico that contain PKS-I or NRPS systems with the potential to produce bioactive compounds. The present study aimed to identify halophilic and haloalkalophilic actinobacteria with presence of PKS-I or NRPS systems and predict their capacity to synthesize bioactive molecules.

#### **7.2.4. MATERIALS AND METHODS**

##### **Sampling**

Saline soil samples were collected from three geographic points in Mexico. Two sampling points correspond to coastal saltflats in the states of Sonora and Oaxaca (north and south regions of the Pacific coast) and the third to the saline-sodic soil of the former Lake Texcoco in the State of Mexico (central region).

##### **Physicochemical characteristics of soil samples**

Salinity percentage and pH were determined in collected samples. To 1 g of dry soil in a test tube was added 9 mL distilled water. Test tube contents were shaken in a Vortex for 10 min and filtered through Whatman No. 2 paper all night. Salinity percentage was determined in the filtrate using a refractometer (HI 931100), and pH with a potentiometer (HI 98128, Hanna Instruments).

##### **Isolation of actinobacterial strains**

###### *Culture medium and isolation*

Agar culture medium for moderately halophilic bacteria (MH) (Ventosa et al. 1982) was used: (10g/L yeast extract, 5g/L proteose peptone, 1g/L glucose, 18g/L agar) supplemented with 10% NaCl solution. The pH was adjusted to 7.4 to inoculate samples from Sonora and Oaxaca, and to 8.5 for samples from the former Lake Texcoco.

To inoculate samples, to 1 g of saline soil was added 9 mL of 10% NaCl. The sample was shaken in a Vortex for 3 min, and 200  $\mu$ L of this suspension were inoculated in triplicate in Petri dishes containing MH medium,



spreading the sample over the agar until dry. The plates were incubated at 37 °C for four weeks and periodical observation was made every three days.

#### *Isolation of actinobacteria*

Actinobacterial strains were selected in accordance with the morphologic characteristics in *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* (Whithman W. et al. 2012) by size, color, shape, texture, presence of vegetative or aerial mycelium and diffusible pigment in the agar. The strains selected were purified in the MH culture medium.

To confirm the purity of the strains isolated, Gram staining was done prior to observation through an optical microscope (Olympus BX43). Strains with gram-positive branched filamentous cells were selected.

#### **Physiological characterization of actinobacteria**

Optimum growth of the actinobacterial isolates was determined at different NaCl concentrations as well as pH and temperature values.

The strains were inoculated in MH medium at 37 °C at the following NaCl concentrations: 0, 0.5, 3, 5, 10, 15, 20, 25 and 30% at pH 7.4, and at these same NaCl concentrations at pH 8.5. The pH was evaluated in MH with 10% NaCl for the following values: 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 and 12, at 37 °C. The temperature was determined by incubating in MH with 10% NaCl at pH values 7.4 and 8.5, and at 21, 26, 37, 42, 45 and 50 °C. In all cases, daily observation was performed for 15 days. Optimum growth with respect to each parameter was determined by the value at which growth was most abundant. Based on these values, strains were classed as either halophilic or haloalkalophilic (Kushner 1978; Soliman and Trueper 1982).

#### **Genetic identification**

##### *Biomass recovery and DNA extraction*

Halophilic strains were cultivated in MH broth with 10% NaCl at pH 7.4 while haloalkalophilic strains were inoculated in this same medium at pH 8.5. Both were incubated at 37 °C and 150 rpm for one week. Biomass was recovered by centrifuging at 10,000 rpm for 10 min.

Extraction of DNA from halophilic and haloalkalophilic actinobacteria was made according to the protocol of the Wizard<sup>®</sup> Genomic DNA Purification Kit (A1120, Promega).

### *Amplification of gene 16S rRNA*

The genetic identification of halophilic and haloalkalophilic actinobacteria was done by comparative analysis of the 16S rRNA sequence, using the universal primers:

27F5'- AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG-3'

518F: 5'-CCA GCA GCC GCG GTA ATA CG-3'

1492R: 5'- TAC GGY TAC CTT GTT ACG ACT T-3'

800R: 5'-TAC CAG GGT ATC TAA TCC-3'

Polymerase chain reaction (PCR) was performed using Taq DNA Polymerase in Storage Buffer B (Bioline BIO21105). Thermal cycling conditions were as follows: pre-denaturation for 5 min at 94 °C; followed by 34 cycles of denaturation for 30 s at 94°C, annealing for 20 s at 52 °C and extension for 1:30 min at 72 °C; and final post-extension for 7 min at 72 °C. Amplified fragments were visualized on 1% agarose gel stained with ethidium bromide (SIGMA 46065). Amplification products were purified using an Amicon Ultra Centrifugal Filter unit (Millipore UFC901008) and sent to the Macrogen sequencing service in Maryland (US).

### *Phylogenetic analysis*

The 16S rRNA sequences obtained were corrected and assembled using ChromasPro v1.5 (Technelysium, <http://www.technelysium.com.au>) and BioEdit v7.1.9 (Hall 1999). Consensus sequences were compared with validated sequences in the GenBank database, using the program nucleotide Basic Local Alignment Search Tool (BLASTN) of the National Center for Biotechnology Information (NCBI) (Altschul et al. 1997). The phylogenetic tree was constructed by the maximum parsimony method (Fitch and Toward 1971), with MEGA v7.0.21 (Kumar et al. 2016). Tree topology was evaluated by 1000 bootstrap replicates, using Felsenstein's (1985) method.

### **Detection of PKS-I and NRPS systems**

Detection of the PKS-I and NRPS systems of halophilic and haloalkalophilic actinobacteria was performed by amplification of genomic DNA obtained from the strains. The primers used were:

For the PKS-I system, primers K1F/M6R:

K1f: 5'-TSAAGTCSAACATCGGBCA-3'

M6r: 5'-CGCAGGTTSCSGTACCAGTA-3'

For the NRPS system, primers A7R/A3F:

A3f: 5'-GCSTACSYSATSTACACSTCSGG-3'

A7r: 5'-SASGTCVCCSGTSCGGTAS-3'

PCR was run using Taq DNA Polymerase in Storage Buffer B. The reaction was carried out in a final volume of 25µL and thermal cycling conditions were as follows: pre-denaturation for 5 min at 95 °C; followed by 35 cycles of denaturation for 30 s at 95 °C, annealing for 2 min at 58 °C, and extension for 4 min at 72 °C; with final post-extension for 10 min at 72 °C. Amplified fragment visualization and PCR product purification were conducted as described above for 16S rRNA amplification; purified products were sent to the Macrogen sequencing service in Maryland (US).

### **Prediction of biomolecular synthesis based on PKS-I and NRPS sequences**

Several strains were selected from each species identified with the presence of PKS-I or NRPS system or both, to conduct prediction of biomolecular synthesis. The PKS-I and NRPS sequences obtained were corrected and assembled using ChromasPro v1.5. Translation of nucleotide consensus sequences to amino acids was done using the tool in the ExpASy portal (<https://www.expasy.org/>). The NCBI algorithm BLASTP was used to compare PKS-I and NRPS amino acid sequences with sequences deposited in the GenBank database and thus find actinobacterial genera which share similitude with the strains identified in the present study, at the PKS-I or NRPS level.

Prediction was performed by comparing the amino acid sequences of each system with the database Structure Based Sequence Analysis of Polyketide Synthases (SBSPKS) (Anand et al. 2010). In the case of strains in which potential for biomolecular synthesis was not detected with SBSPKS, a search was made in the NCBI portal for reports of biomolecular synthesis in genera with which they showed similitude.

### **Phylogenetic analysis of PKS-I and NRPS systems**

Amino acid sequences obtained by amplification of the ketosynthase (KS) and adenylation (A) domains were used to construct a phylogenetic tree by neighbor-joining (Saitou and Nei 1987), with MEGA v7.0.21 (Kumar et al. 2016). Tree topology was evaluated by 1000 bootstrap replicates. Evolutionary distance was calculated using the Poisson correction method (Zuckerandl and Pauling 1965). *Mycobacterium abscessus* DSM 44196 was

used as the tree root for the PKS-I system (KS domain), and *Amycolatopsis marina* NBRC 104263 as the root for the NRPS system (A domain).

## 7.2.5. RESULTS

### Physicochemical characteristics of soil samples

Soil samples collected from coastal lagoons in Sonora and Oaxaca had 18-22% salinity and pH values of 7.4-8.9. In soil samples from the former Lake Texcoco, salinity ranged from 14 to 24% and pH from 7.2 to 10.

### Actinobacterial isolates

A total of 51 actinobacterial strains were isolated; of these, seven strains isolated from coastal saltflats in Sonora were assigned the identification codes Y3A. and COSE.; 27 strains isolated from coastal saltflats in Oaxaca were assigned the codes LRS. and JA.; while 17 strains isolated from saline-sodic soil of the former Lake Texcoco (State of Mexico) were assigned the code TX.

The strains isolated appeared as small or medium-sized yellow, white or black colonies; some had sporulated aerial mycelia, vegetative mycelia or diffusible pigmentation in agar. When seen through the microscope, all strains had gram-positive branched filamentous cells and in some isolates, groups of spores or single terminal spores were observed.

### Physiological characteristics of actinobacteria

Optimum growth in strains from Sonora and Oaxaca was found at 10% NaCl, pH 7.4 and 37 °C. These strains were classed as moderately halophilic. In strains from the State of Mexico, optimum growth occurred at 10% NaCl, pH 8.5 and 37 °C; these strains were therefore classed as moderately haloalkalophilic.

### Genetic identification of moderately halophilic and moderately haloalkalophilic actinobacteria

Comparative analysis of the 16S rRNA sequence helped identify three genera and seven species: *Saccharomonospora halophila* (8 strains), *S. xinjiangensis* (21), *S. azurea* (2), *Actinopolyspora mortivallis* (3), *Nocardiopsis exhalans* (2), *N. salina* (14) and *N. nikkonensis* (1). Table 1 shows the similitude percentages obtained through BLASTN for each of the species identified and the accession number of the sequences deposited in GenBank.

**Table 1** Characteristics of the isolated actinobacteria as well as the identification of the PKS-I and NRPS systems, using specific primers

Isolate ID	Identification of actinobacteria by BLASTN	GenBank accession number	PKS System	NRPS System
JA6.001	<i>Saccharomonospora halophila</i> 99.78%	KY704956	+	-
LRS2.006	<i>Saccharomonospora halophila</i> 99.71%	KY704957	-	-
LRS4.058	<i>Saccharomonospora halophila</i> 99.64%	KY704958	-	+
LRS4.074	<i>Saccharomonospora xinjiangensis</i> 99.92%	KY704950	+	+
LRS4.080	<i>Saccharomonospora xinjiangensis</i> 99.54%	KY704960	+	+
LRS4.085	<i>Saccharomonospora xinjiangensis</i> 99.14%	KY704961	+	-
LRS4.096	<i>Saccharomonospora xinjiangensis</i> 100%	KY704962	+	+
LRS4.097	<i>Saccharomonospora xinjiangensis</i> 99.86%	KY704963	+	+
LRS4.099	<i>Saccharomonospora xinjiangensis</i> 99.71%	KY704964	+	+
LRS4.120	<i>Saccharomonospora xinjiangensis</i> 100%	KY704965	+	+
LRS4.125	<i>Saccharomonospora xinjiangensis</i> 100%	KY704966	+	-
LRS4.146	<i>Saccharomonospora xinjiangensis</i> 100%	KY704967	+	+
LRS4.152	<i>Saccharomonospora azurea</i> 98.1%	KY704968	+	+
LRS4.154	<i>Saccharomonospora azurea</i> 98.3%	KY704969	+	+
LRS4.160	<i>Saccharomonospora xinjiangensis</i> 99.50%	KY704970	+	+
LRS4.166	<i>Saccharomonospora xinjiangensis</i> 99.93%	KY704971	+	+
LRS4.169	<i>Saccharomonospora xinjiangensis</i> 99.39%	KY704972	+	+
LRS4.171	<i>Saccharomonospora xinjiangensis</i> 99.93%	KY704973	+	-
LRS4.180	<i>Saccharomonospora xinjiangensis</i> 100%	KY704974	+	+
LRS4.183	<i>Saccharomonospora xinjiangensis</i> 100%	KY704975	+	+
LRS4.195	<i>Saccharomonospora xinjiangensis</i> 99.56%	KY704976	+	-
LRS4.201	<i>Saccharomonospora xinjiangensis</i> 100%	KY704977	+	+
LRS4.202	<i>Saccharomonospora xinjiangensis</i> 99.70%	KY704978	+	+
LRS4.205	<i>Saccharomonospora xinjiangensis</i> 99.78%	KY704979	+	+
LRS4.210	<i>Saccharomonospora xinjiangensis</i> 99.41%	KY704980	+	+
LRS4.243	<i>Saccharomonospora xinjiangensis</i> 99.93%	KY704981	-	-
LRSE2.002	<i>Saccharomonospora halophila</i> 99.63%	KY704982	+	+
COSE.1a	<i>Actinopolyspora mortivallis</i> 99.71%	KY704983	+	+
COSE.1b	<i>Actinopolyspora mortivallis</i> 99.93%	KY704984	+	+
COSE.1c	<i>Actinopolyspora mortivallis</i> 99.25%	KY704985	+	+
Y3A1	<i>Saccharomonospora halophila</i> 99.78%	KY704986	-	+
Y3A2	<i>Saccharomonospora halophila</i> 99.85%	KY704987	-	+
Y3A3	<i>Saccharomonospora halophila</i> 99.63%	KY704988	+	+
Y3A4	<i>Saccharomonospora halophila</i> 99.70%	KY704989	+	+
TX5SEC.5SG2	<i>Nocardiopsis exhalans</i> 99.22%	KY704990	-	+
TX5SEC.3MHG6	<i>Nocardiopsis salina</i> 98.57%	KY704991	+	+
TX5SEC.4MHG6	<i>Nocardiopsis salina</i> 98.5%	KY704992	+	+
TX5SEC.8SG2	<i>Nocardiopsis exhalans</i> 98.93%	KY704993	-	+
TXV8.5MHG2	<i>Nocardiopsis salina</i> 98.93%	KY704994	-	+
TXV8.1MHG2	<i>Nocardiopsis salina</i> 98.56%	KY704995	+	+
TXV3.7SG3	<i>Nocardiopsis salina</i> 98.5%	KY704996	+	+
TXV14.2MHG3	<i>Nocardiopsis salina</i> 98.21%	KY704997	+	+
TXV8.20SG3	<i>Nocardiopsis nikkonesis</i> 99.44%	KY704998	+	+
TX5SEB.4MHG6	<i>Nocardiopsis salina</i> 99.44%	KY704999	+	+
TXV6.14SG3	<i>Nocardiopsis salina</i> 98.56%	KY705000	+	+

TXV11.6SG4	<i>Nocardiopsis salina</i> 99.51%	KY705001	+	+
TXV5.4SG2	<i>Nocardiopsis salina</i> 98.57%	KY705002	-	-
TXI3.1SG3	<i>Nocardiopsis salina</i> 98.36%	KY705003	+	+
TXV13.7MHG3	<i>Nocardiopsis salina</i> 98.57%	KY705004	+	+
TXV10.4SG1	<i>Nocardiopsis salina</i> 98.43%	KY705005	+	+
TXV11.13SG3	<i>Nocardiopsis salina</i> 98.57%	KY705006	+	+

### Phylogenetic analysis

Three phylogenetic trees were constructed based on the sequences of gene 16S rRNA of the strains isolated and sequences obtained from GenBank for each genus. Figure 1 shows the phylogenetic tree corresponding to the genus *Saccharomonospora*, in which southern Mexico strains can be seen forming three groups: the first and most abundant one corresponds to strains identified as *S. xinjiangensis*; the second consists of two strains identified as *S. azurea* (these isolates are distantly positioned from species of this genus reported to date); the third is formed by strains of *S. halophila* for which a close evolutionary relationship with *S. paurometabolica* can be observed.

**Fig. 1** Maximum parsimony tree based on 16S rRNA sequences, which shows the phylogenetic relationships the species of the genus *Saccharomonospora*. Bootstrap value of 1000 replicates is used. GenBank accession numbers of 16S rRNA sequences are given in parentheses. Scale bar corresponds to 20 substitutions per nucleotide positions

The phylogenetic tree corresponding to the genus *Actinopolyspora* (Fig. 2) shows all three northern Mexico strains clustered together at the same evolutionary distance from the species *A. mortivallis*. Figure 3 shows the phylogenetic tree for the genus *Nocardiopsis*, which displays the evolutionary relationships of strains from central Mexico. These cluster into three groups: the first group corresponds to strains identified as *N. salina*; the second includes a single strain identified as *N. nikkonensis*; and the third group has two strains clustering together which were identified as *N. exhalans*.

**Fig. 2** Maximum parsimony tree based on 16S rRNA sequences, which shows the phylogenetic relationships the species of the genus *Actinopolyspora*. Bootstrap value of 1000 replicates is used. GenBank accession numbers of 16S rRNA sequences are given in parentheses. Scale bar corresponds to 20 substitutions per nucleotide positions

**Fig. 3** Maximum parsimony tree based on 16S rRNA sequences, which shows the phylogenetic relationships the species of the genus *Nocardiopsis*. Bootstrap value of 1000 replicates is used. GenBank accession numbers of 16S rRNA sequences are given in parentheses. Scale bar corresponds to 20 substitutions per nucleotide positions

#### **Detection of PKS-I, NRPS and PKS-I-NRPS systems**

The strains in which only the PKS-I system was detected were as follows: *S. halophila* (1 strain: JA6.001) and *S. xinjiangensis* (4 strains: LRS4.085, LRS4.125, LRS4.171, LRS4.195). In no strain from the former Lake Texcoco was there amplification of the PKS-I system alone.

The strains in which the NRPS system was detected were: *S. halophila* (3 strains: LRS4.058, Y3A1, Y3A2), *N. exhalans* (2 strains: TX5SEC.5SG2, TX5SEC.8SG2) and *N. salina* (1 strain: TXV8.5MHG2).

The strains in which presence of both PKS-I and NRPS systems was detected were as follows: *S. halophila* (3 strains: LRSE2.002, Y3A3, Y3A4), *S. xinjiangensis* (16 strains: LRS4.074, LRS4.080, LRS4.096, LRS4.097, LRS4.099, LRS4.120, LRS4.146, LRS4.160, LRS4.166, LRS4.169, LRS4.180, LRS4.183, LRS4.201, LRS2.202, LRS4.205, LRS4.210), *S. azurea* (2 strains: LRS4.152, LRS4.154), *A. mortivallis* (3 strains: COSE.1a, COSE.1b, COSE.1c), *N. salina* (12 strains: TX5SEC.3MHG6, TX5SEC.4MHG6, TXV8.1MHG2, TXV3.7SG3, TXV14.2MHG3, TX5SEB.4MHG6, TXV6.14SG3, TXV11.6SG4, TXI3.SG3, TXV13.7MHG3, TXV10.4SG1, TXV11.13SG3) and *N. nikkonensis* (1 strain: TXV8.20SG3).

Both systems were found to be absent in three strains: *S. halophila* (LRS2.006), *S. xinjiangensis* (LRS4.243) and *N. salina* (TXV5-4SG2). Table 1 lists the results of PKS-I and NRPS system detection in the 51 moderately halophilic and moderately haloalkalophilic actinobacterial strains.

#### **Prediction of biomolecular synthesis in halophilic actinobacteria**

The analysis to predict biomolecular synthesis was conducted on a selection of 11 actinobacterial strains: six halophilic (JA6.001, LRS4.180, LRS4.154, COSE-1c, Y3A1, LRS4.205) and five haloalkalophilic (TX5SEC-8SG2, TXV8-20SG3, TX5SEC-4MHG6, TX5SEC-5SG2, TXI3-1SG3). Each of the species identified was represented by at least one strain.

*Prediction of biomolecular synthesis based on PKS-I amino acid sequences*

BLASTP comparison of the PKS-I amino acid sequences of strains JA6.001, LRS4.180, LRS4.154, COSE.1c, TX5SEC.8SG2, TX5SEC.4MHG6 and TXV8.20SG3 with PKS-I sequences deposited in GenBank confirmed the identification of two actinobacterial genera made by sequencing of 16S rRNA (*Actinopolyspora* 91% and *Nocardiopsis* 80% and 56%). This comparison also helped identify a genus that is phylogenetically close to *Saccharomonospora*, namely *Streptomyces* (Barka et al. 2016), identified as having 44 and 91% similitude. Table 2 lists the similitude percentages of each strain.

**Table 2** Similarity of amino acid sequences of the PKS I system identified in sequences of microorganisms, using the BLASTP algorithm

Isolate ID	Nucleotide sequence	Aminoacid sequence	Closest cultivated species BLASTP	Similarity value
JA6.001 <i>S. halophila</i> 99.48%	1107bp	2194 aa	PKS-I <i>Saccharomonospora</i> <i>sp.</i> CNQ490	51%
LRS4.180 <i>S. xinjiangensis</i> 100%	1100bp	1583aa	PKS-I <i>Saccharomonospora</i> <i>sp.</i> CNQ490	51%
LRS4.154 <i>Saccharomonospora sp.</i> 98.3%	1105bp	1506aa	PKS-I <i>Streptomyces nodosus</i>	44%
COSE-1c <i>A. mortivallis</i> 99.25%	1224bp	2382aa	PKS-I <i>Actinopolyspora</i> <i>mortivallis</i>	91%
TX5SEC-8SG2 <i>N. exhalans</i> 99%	1234bp	2441aa	PKS-I <i>Nocardiopsis</i> <i>xinjiangensis</i>	56%
TXV8-20SG3 <i>N. nikonensis</i> 98%	1205bp	2385aa	PKS-I de <i>Nocardiopsis</i> <i>kunsanensis</i>	56%
TX5SEC-4MHG6 <i>N. salina</i> 98%	1237bp	2484aa	PKS-I <i>Nocardiopsis</i> <i>kunsanensis</i>	80%

*PKS-I amino acid sequences did not show similitude with any biomolecular sequence in the SBSPKS database.*

The search in the NCBI portal for reports of biomolecular synthesis helped detect that *Streptomyces caeruleus* DSM 40113 (formerly *Actinoalloteichus cyanogriseus* DSM 43889, Tamura et al. 2008), which shares 44 and 51% similitude with the strains JA6.001 and LRS4.180 respectively, synthesizes the antibiotic caerulomycin and these strains may therefore have the capacity to synthesize this molecule. The species *S. nodosus*, which shares



44% similitude with the strain LRS4.154 is capable of synthesizing amphotericin A and B, so that the latter strain may also be able to synthesize this compound. In all other genera detected through comparison of PKS-I sequences there is no evidence of biomolecular synthesis.

*Prediction of biomolecular synthesis based on NRPS amino acid sequences*

Comparison through BLASTP of the NRPS amino acid sequences of the strains Y3A1, LRS4.205, LRS4.154, COSE.1c, TX5SEC.5SG2, TXV8.20SG3 and TXI3.1SG3 with sequences of this same system in the GenBank database confirmed the identification of three genera of actinobacteria identified by sequencing of 16S rRNA (*Saccharomonospora* 43%, *Actinopolyspora* 43%, *Nocardioopsis* 67%) and also helped identify *Streptomyces* with 43% similitude.

The SBSPKS database helped detect probability of biomolecular synthesis in the strains Y3A1 and LRS4.205, which had 40 and 47% similitude respectively with the A domain of calcium-dependent antibiotic. The NRPS sequence of strain TXI3.1SG3 showed 47% similitude with the antibiotic pristinamycin.

The sequence of strain COSE.1c had 58% similitude with the A domain of the bacterial toxin syringomycin, while the sequence of strain TX5SEC-5SG2 shared 63% similitude with the hepatotoxin microcystin.

The sequences of strains LRS4.154 and TXV8.20SG3 showed no similitude with any product in the SBSPKS database. The results of this comparison are described in Table 3.

**Table 3** Similarity of amino acid sequences with the NRPS system identified in sequences of microorganisms, using the BLASTP algorithm as well as the similarity of the structure of the biomolecules deposited in SBSPKS database

Isolate ID	Nucleotide sequence	Aminoacid sequence	Closest cultivated species BLASTP	Similarity value	SBSPKS	Similarity value
Y3A1 <i>S. xijiangensis</i> 99.30%	707bp	1402aa	NRPS en <i>Streptomyces griseoflavus</i> Tu4000	42%	Adenylation Domain of Calcium Dependent Antibiotic	40%

LRS4.205 <i>S. xijiangensis</i> 99.98%	686bp	1354aa	NRPS en <i>Saccharomonospora</i> <i>sp. CNQ490</i>	43%	Adenylation Domain of Calcium Dependent Antibiotic	37%
LRS4.154 <i>S. azurea</i> 98.3%	694bp	1371aa	-	-	-	-
COSE-1c <i>A. mortivallis</i> 99.25%	697bp	1385aa	Hypothetical Protein on <i>A. mortivallis</i>	81%	Syringomicin	58%
TX5SEC-5SG2 <i>N. exhalans NBRC</i> <i>100346</i> 99%	651bp	1276aa	NRPS en <i>Streptomyces</i> <i>virginiae</i>	47%	Mycrocystin	63%
TXV8-20SG3 <i>N. nikkonensis</i> YU1183-22 98%	633bp	1198aa	-	-	-	-

#### Phylogenetic analysis of PKS-I and NRPS systems

Figure 4 shows the phylogenetic relationships between amino acid sequences of the KS domain of the strains isolated and PKS-I sequences detected in reference actinobacterial strains. The amino acid sequence of the KS domain of *M. abscessus* DSM 44196 was used as the tree root. Figure 5 shows the phylogenetic relationships between the A domain of the strains isolated and NRPS sequences detected in the reference strains with which they showed greater similitude. The amino acid sequence of the A domain of *Amycolatopsis marina* NBRC 104263 was used as the tree root.

**Fig. 4** Phylogenetic tree constructed by the amino acid sequences of the KS domain (ketosynase) of the PKS-I system, of the actinobacteria isolated from halophilic and haloalkylophilic environments, as well as reference strains with the highest percentage of similarity obtained from the Gen Bank database. The bootstrap value was 1000 replicates. The scale bar represents 0.20 AA substitutions per site

**Fig. 5** Phylogenetic tree constructed by amino acid sequences of domain A (adenylation) of the NRPS system, of the actinobacteria isolated from halophilic and haloalcalófil environments with the reference strains that presented greater percentage of similarity in the database of GenBank. The bootstrap value was 1000 replicates. The scale bar represents 0.20 AA substitutions per site

## 7.2.6. DISCUSSION

Studies dealing with the isolation of actinobacteria from marine ecological niches and extreme environments in Mexico describe these microorganisms as major producers of secondary metabolites. However, no studies have been conducted to date on biomolecular production in actinobacterial isolates from Mexico (Quintana et al. 2013, Becerril-Espinosa et al. 2013).

*Saccharomonospora halophila*, *S. xinjiangensis* and *S. azurea* were isolated from the southern Pacific coast of Mexico. *Actinopolyspora mortivallis* and *S. halophila* were isolated from the northern Pacific coast. *N. salina*, *N. exhalans* and *N. nikkonensis* were isolated in the central region of Mexico. The genus *Saccharomonospora* had previously been reported in isolates from marine sediments in the Gulf of Mexico and calcium sulphate crystals in the “Cave of Crystals” (Chihuahua, Mexico) (Maldonado et al. 2009, Quintana et al. 2013). The genus *Actinopolyspora* was identified in Mexican territory in isolates from saline soil (Ramírez et al. 2006). Our study confirms the presence of the latter genus and reports the identification of the species *A. mortivallis* in Mexican territory. Studies on microorganismal diversity in the former Lake Texcoco have described strains of the genera *Actinomadura*, *Cellulomonas*, *Glycomyces*, *Kocuria*, *Micrococcus*, *Nesterenkonia*, *Streptomyces* and *Nocardiopsis* (Valenzuela-Encinas et al. 2009, Soto-Padilla et al. 2013). The three *Nocardiopsis* species described in our study, however, establish for the first time the presence of this genus in saline environments from inland areas of Mexico.

The primers used to identify PKS-I and NRPS systems enabled the successful detection of fragments of this set of genes. Of the 51 strains of moderately halophilic and moderately haloalkalophilic actinobacteria included in the present study, the PKS-I system was detected in five (9.8%), the NRPS system in six (11.79%), and both systems in 37 (72.5%). This indicates that moderately halophilic and moderately haloalkalophilic actinobacterial strains have a substantial potential to synthesize biomolecules produced by the PKS-I or NRPS system.

Presence of PKS-I and NRPS systems and prediction of biomolecular synthesis have been reported previously in actinobacteria. Li et al. (2014) isolated halotolerant actinobacteria from marine sponges, identifying them as *Micromonospora* sp., with the potential to synthesize anthracycline, as well as *Streptomyces* strains capable of synthesizing anthracycline, tetracycline angucycline, tetracenomycin and naphthoquinones. On the other hand, Ronoh et al. (2013) isolated halophilic actinobacteria from saline sediment in Kenya, identified as *Dietzia maris* and *Rhodococcus erythropolis* and capable of synthesizing the metalloproteinases adamalysine (M10A) and

matrixin (M12B) respectively, as well as a strain of *Nocardia cerradoensis* with the potential to synthesize the enzyme dihydropteroate synthetase.

Two strains of the genus *Saccharomonospora* JA6.001 (*S. halophila*) and LRS4.180 (*S. xinjiangensis*) may be candidates for synthesis of caerulomycin, since they share 44 and 51% similitude respectively with the PKS-I system of *Streptomyces caeruleus*. Caerulomycin has antibiotic activity; the A type of this molecule has mild antifungal and antimicrobial action (Mongin et al. 2002). The strain LRS4.154 (*Saccharomonospora azurea*) may be able to synthesize amphotericin A and B, since it shares 44% similitude with *Streptomyces nodosus* which synthesizes this molecule. Amphotericin A has no clinical applications, while amphotericin B is an active lipophilic polyene antibiotic and an effective antifungal medication in candidiasis, aspergillosis, histoplasmosis, and others (Miyaoaka et al. 2014). The strains LRS4.205 (*Saccharomonospora xinjiangensis*) and YA31 (*S. halophila*) shared 47 and 40% similitude respectively with the A domain of ionophore calcium-dependent antibiotic, which is of therapeutic value against a wide range of gram-positive pathogens (Liu et al. 2013). The strain TXI3.1SG3 (*Nocardiopsis salina*) shared 47% similitude with pristinamycin, a synergistin antibiotic with antibacterial activity (De Crécy-Lagard et al. 1997).

Although the main pursuit of the present study was detection of bioactive molecules, it is worth noting that the strain COSE.1c shared 58% similitude with the A domain of syringomycin, a bacterial toxin produced by *Pseudomonas syringae* that affects many plant species (Sinden et al. 1971). The strain TX5SEC.5SG2 shared 63% similitude with microcystin, a hepatotoxin produced by several genera of cyanobacteria, e.g. *Microcystis* this cyanotoxina which is involved in human and animal hepatotoxicity (Shuai et al. 2017).

A larger number of species of the genus *Saccharomonospora* proved to be related to species which synthesize metabolites, as compared to species identified as belonging to the genus *Nocardiopsis*.

Using GenBank and SBSPKS databases to compare PKS-I and NRPS amino acid sequences through BLASTP was more effective in the case of SBSPKS since similitude percentages thus obtained are directly related to amino acid sequences of biomolecules synthesized by other microorganisms, as compared to GenBank which yields only similitude percentages with microorganisms containing PKS-I or NRPS systems.

Similitude percentages of PKS-I and NRPS amino acid sequences compared in the GenBank database by means of BLASTP ranged from 43 to 91%. Such variation is due to the fact that the primers used amplify a specific region of this multimodular system, limiting the coverage with complete PKS-I amino acid sequences deposited in the database. Comparison of the NRPS amino acid sequences in the SBSPKS database yielded similitude percentages with biomolecules of 40 to 63%, since the region amplified by the primers was not of sufficient size to carry out a complete comparison with amino acid sequences of biomolecules synthesized by the NRPS system and included in this database.

The use of molecular biology techniques has made it possible to attain significant advances in the search for microorganisms in their capacity as producers of metabolites. The case of actinobacteria is widely recognized since these organisms produce the largest number of secondary metabolites (Baltz and Hosted 1996). As a result of this search, new molecules are now available that act as antimicrobial agents. However, there is still a need for products that help counteract problems in the medical, agricultural and food areas, among others. In the present study, detection of PKS-I and NRPS systems and prediction of biomolecular synthesis allowed us to establish the existence of strains of moderately halophilic and moderately haloalkalophilic actinobacteria that can be proposed as microorganisms capable of synthesizing biomolecules with applications in biomedicine.

### **7.2.7. Acknowledgments**

The authors would like acknowledge the financial assistance from the PRODEP 2015 “Red-Hispano-Mexicana para la búsqueda y aprovechamiento de microorganismos extremófilos con aplicaciones ambientales y biomédicas” and the network “Microbiología y química en las ciencias de la salud” 1039/2014RIF. This work is based on the PhD thesis of G. Scarlett Alonso-Carmona, student in the Health Sciences PhD program of the Autonomous University of the State of Mexico, registered in the PNP-Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología.

### **Conflict of Interest**

The authors declare no conflict of financial, academic, commercial, political or personal interests.

### **7.2.8. REFERENCES**

- Ahlert J, Shepard E, Lomovskaya N et al (2002) The calicheamicin gene cluster and its iterative type I enediyne PKS. *Science* 297:1173-1176
- Alcocer J, Hammer UT (1998) Saline lake ecosystems of Mexico. *Aquat Ecosyst Health Manag* 1:291-315

- Altschul SF, Madden TL, Schäffer AA et al (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* 25:3389-3402
- Amoutzias GD, Van de Peer Y, Mossialos D (2008) Evolution and taxonomic distribution of nonribosomal peptide and polyketide synthases. *Future Microbiol* 3:361-370
- Anand S, Prasad MVR, Yadav G et al (2010) SBSPKS: Structure based sequence analysis of polyketide synthases. *Nucleic Acids Res* 38:W487-496
- Ayuso-Sacido A, Genilloud O (2005) New PCR primers for the screening of NRPS and PKS-I systems in actinomycetes: detection and distribution of these biosynthetic gene sequences in major taxonomic groups. *Microb Ecol* 49:10-24
- Baltz RH, Hosted TJ (1996) Molecular genetic methods for improving secondary-metabolite production in actinomycetes. *Trends Biotechnol* 7:245-50
- Barka EA, Vatsa P, Sanchez L et al (2016) Taxonomy, physiology, and natural products of Actinobacteria. *Microbiol Mol Biol Rev* 80:1-43. doi:10.1128/MMBR.00019-15
- Becerril-Espinosa A, Freel KC, Jensen PR et al (2013) Marine Actinobacteria from the Gulf of California: diversity, abundance and secondary metabolite biosynthetic potential. *A van Leeuw J Microb* 103:809-819. doi:10.1007/s10482-012-9863-3
- Beltrán-Hernández RI, Coss-Muñoz E, Luna-Guido ML et al (1999) Carbon and nitrogen dynamics in alkaline saline oil of the former Lake Texcoco (Mexico) as affected by application of sewage sludge. *Eur J Soil Sci* 50:601-608
- Bérdy J (2012) Thoughts and facts about antibiotics: where we are now and where we are heading. *J Antibiot* 65:385-395
- Bhanot A, Sharma R, Noolvi MN (2011) Natural sources as potential anti-cancer agents: a review. *Int J Phytomed* 3:9-26
- Bormann C, Lauer B, Kálmánzhelyi A et al (1999) Novel nikkomycins Lx and Lz produced by genetically engineered *Streptomyces tendae* Tü901. *J Antibiot* 52:582-585
- Chen D, Zhang Q, Zhang Q, Cen P et al (2012) Improvement of FK506 production in *Streptomyces tsukubaensis* by genetic enhancement of the supply of unusual polyketide extender units via utilization of two distinct site-specific recombination systems. *Appl Environ Microbiol* 78:5093-5103. doi:10.1128/AEM.00450-12
- De Crécy-Lagard V, Blanc V, Gil P et al (1997) Pristinamycin I biosynthesis in *Streptomyces pristinaespiralis*: molecular characterization of the first two structural peptide synthetase genes. *J Bacteriol* 179:705-713

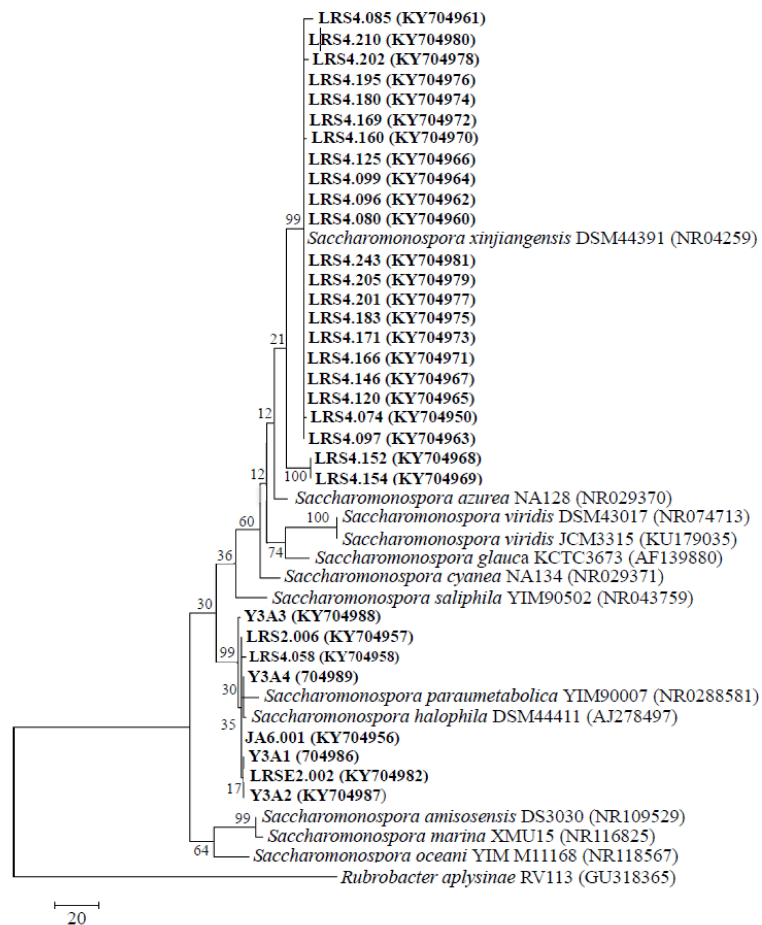
- Demain AL (2014) Importance of microbial natural products and the need to revitalize their discovery. *J Ind Microbiol Biotechnol* 41:185-201
- Donadio S, Staver MJ, McAlpine JB et al (1991) Modular organization of genes required for complex polyketide biosynthesis. *Science* 252:675-679
- Felsenstein J (1985) Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* 39:783-791
- Fitch WM (1971) Toward defining the course of evolution: minimum change for a specific tree topology. *Syst Zool* 20:406-416
- Fjaervik E, Zotchev SB (2005) Biosynthesis of the polyene macrolide antibiotic nystatin in *Streptomyces noursei*. *Appl Microbiol Biotechnol* 67:436-443
- Gailey FB, Stefaniak JJ et al (1946) A comparison of penicillin-producing strains of *Penicillium notatum-chrysogenum*. *J Bacteriol* 52:129-140
- Giddings LA, Newman DJH (2013) Microbial natural products: molecular blueprints for antitumor drugs. *J Ind Microbiol Biotechnol* 40:1181-1210
- Gregory MA, Gaisser S, Lill RE et al (2004) Isolation and characterization of pre-rapamycin, the first macrocyclic intermediate in the biosynthesis of the immunosuppressant rapamycin by *S. hygroscopicus*. *Angew Chem-Int Ed Engl* 43:2551-2553
- Hall TA (1999) BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp Ser* 41:95-98
- Ikeda H, Nonomiya T, Omura S (2001) Organization of biosynthetic gene cluster for avermectin in *Streptomyces avermitilis*: analysis of enzymatic domains in four polyketide synthases. *J Ind Microbiol Biotechnol* 27:170-176
- Khayatt BI, Overmars L, Siezen RJ et al (2013) Classification of the adenylation and acyl-transferase activity of NRPS and PKS systems using ensembles of substrate specific hidden Markov models. *PLoS ONE* 8:e62136. doi:10.1371/journal.pone.0062136
- Kumar S, Stecher G, Tamura K (2016) MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. *Mol Biol Evol* 33:1870-1874
- Kushner DJ (1978) Life in high salt and solute concentrations. In: Kushner DJ (ed) *Microbial life in extreme environments*. Academic Press, London, pp 317-368
- León J, Liza L, Soto I et al (2007) Bioactives actinomycetes of marine sediment from the central coast of Peru. *Rev Peru Biol* 14:259-270
- Li J, Dong J, Yang J. et al (2014) Detection of polyketide synthase and nonribosomal peptide synthetase

- biosynthetic genes from antimicrobial coral-associated actinomycetes. *A van Leeuw J Microb* 106:623-635. doi:10.1007/s10482-014-0233-1
- Liu G, Chater KF, Chandra G et al (2013). Molecular regulation of antibiotic biosynthesis in *Streptomyces*. *Microbiol Mol Biol Rev* 77:112-143. <http://doi.org/10.1128/MMBR.00054-12>
- Liu W-B, Yu W-B, Gao S-H et al (2013) Genome sequence of *Saccharopolyspora erythraea* D, a hyperproducer of erythromycin. *Genome Announc* 1:e00718-00713. doi:10.1128/genomeA.00718-13
- Ludwig W, Euzeby J, Schumann P et al (2012) Road map of the phylum Actinobacteria. In: Goodfellow M, Kämpfer P, Busse H-J et al (eds) *Bergey's manual of systematic*, vol 5. Springer, New York, pp 1-28
- Maldonado LA, Fragoso-Yáñez D, Pérez-García A (2009) Actinobacterial diversity from marine sediments collected in Mexico. *A van Leeuw J Microb* 95:111. doi:10.1007/s10482-008-9294-3
- Miyaoka R, Hosokawa M, Ando M et al (2014) *In situ* detection of antibiotic amphotericin B produced in *Streptomyces nodosus* using Raman microspectroscopy. *Mar Drugs* 12:2827-2839. <http://doi.org/10.3390/md12052827>
- Mongin F, Trécourt F, Gervais B et al (2002) First synthesis of caerulomycin B. A new synthesis of caerulomycin C. *J Org Chem* 67:3272-3276. doi: 10.1021/jo010913r
- Namwat W, Kamioka Y, Kinoshita H et al (2002) Characterization of virginiamycin S biosynthetic genes from *Streptomyces virginiae*. *Gene* 286:283-290
- Navarro-Noya YE, Valenzuela-Encinas C, Sandoval-Yuriar A et al (2015) Archaeal communities in a heterogeneous hypersaline-alkaline soil. *Archaea* 2015. doi:10.1155/2015/646820
- Nonaka K, Tsukiyama T, Okamoto Y et al (2000) New milbemycins from *Streptomyces hygrosopicus* subsp. *aureolacrimosus*: fermentation, isolation and structure elucidation. *J Antibiot* 53:694-704
- Quintana ET, Badillo RF, Maldonado LA (2013) Characterisation of the first actinobacterial group isolated from a Mexican extremophile environment. *A van Leeuw J Microb* 104:63-70. doi: 10.1007/s10482-013-9926-0
- Ramirez N, Sandoval H, Serrano A (2004) Las bacterias halófilas y sus aplicaciones biotecnológicas. *Rev Soc Ven Microbiol* 24:12-33
- Ramirez N, Serrano J, Sandoval H (2006) Micoorganismos extremofilos halófilos. Actinomicetos en México. *Rev Mex Cienc Farm* 3:756-771
- Reeves CD, Chung LM, Liu Y et al (2002) A new substrate specificity for acyl transferase domains of the ascomycin polyketide synthase in *Streptomyces hygrosopicus*. *J Biol Chem* 277:9155-9159

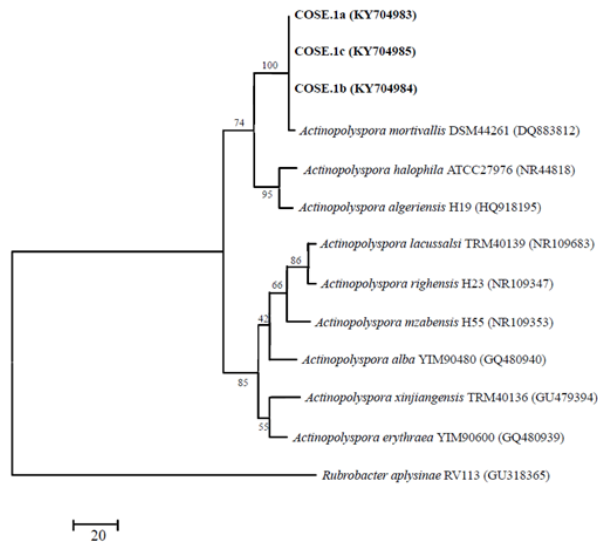


- Ronoh R, Budambula N, Mwirichia R et al (2013) Isolation and characterization of actinobacteria from Lake Magadi, Kenya. *Afr J Microbiol Res* 7:4200-4206
- Saitou N, Nei M (1987) The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol* 4:406-425
- Shuai Y, Lou D, Yin J et al (2017) Characterization of microcystin-induced dualistic toxic effects on primary rat hepatocytes. *J Environ Pathol Toxicol Oncol* 36:15-27. doi: 10.1615/JEnvironPatholToxicolOncol.2016017340
- Sinden S, DeVay J, Backman P (1971) Properties of syringomycin, a wide spectrum antibiotic and phytotoxin produced by *Pseudomonas syringae*, and its role in the bacterial canker disease of peach trees. *Physiol Plant Pathol* 1:199-213
- Soliman GSH, Trueper HG (1982) *Halobacterium pharaonis* sp. nov., a new, extremely haloalkaliphilic archaeobacterium with low magnesium requirement. *Zbl Bakt Mik Hyg I C* 3:318-329
- Soto-Padilla MY, Valenzuela-Encinas C, Dendooven L et al (2013) Isolation and phylogenic identification of soil haloalkaliphilic strains in the former Texcoco Lake. *Int J Environ Health Res* 24:82-90. doi:10.1080/09603123.2013.800957
- Sugiyama M, Thompson CJ, Kumagai T et al (1994) Characterisation by molecular cloning of two genes from *Streptomyces verticillus* encoding resistance to bleomycin. *Gene* 151:11-16
- Tamura T, Ishida Y, Ootoguro M et al (2008) Reclassification of *Streptomyces flavidofuscus* as a synonym of *Nocardiopsis dassonvillei* subsp. *dassonvillei*. *Int J Syst Evol Microbiol* 58:2321-2323
- Valenzuela-Encinas C, Neria-González I, Alcántara-Hernández RJ et al (2009) Changes in the bacterial populations of the highly alkaline saline soil of the former lake Texcoco (Mexico) following flooding. *Extremophiles* 13:609-621. doi:10.1007/s00792-009-0244-4
- Ventosa A, Quezada E, Rodriguez-Valera F et al (1982) Numerical taxonomy of moderately halophilic Gram-negative rods. *J Gen Microbiol* 128:1959-1968
- Weissman KJ (2015) The structural biology of biosynthetic megaenzymes. *Nat Chem Biol* 11:660-670. doi: 10.1038/nchembio.1883
- Welker M, von Döhren H (2006) Cyanobacterial peptides – nature's own combinatorial biosynthesis. *FEMS Microbiol Rev* 30:530-563
- Wenzel SC, Müller R (2007) Myxobacterial natural product assembly lines: fascinating examples of curious biochemistry. *Nat Prod Rep* 24:1211-1224
- Wu CZ, Jang JH, Ahn JS et al (2012) New geldanamycin analogs from *Streptomyces hygrosopicus*. *J Microbiol*

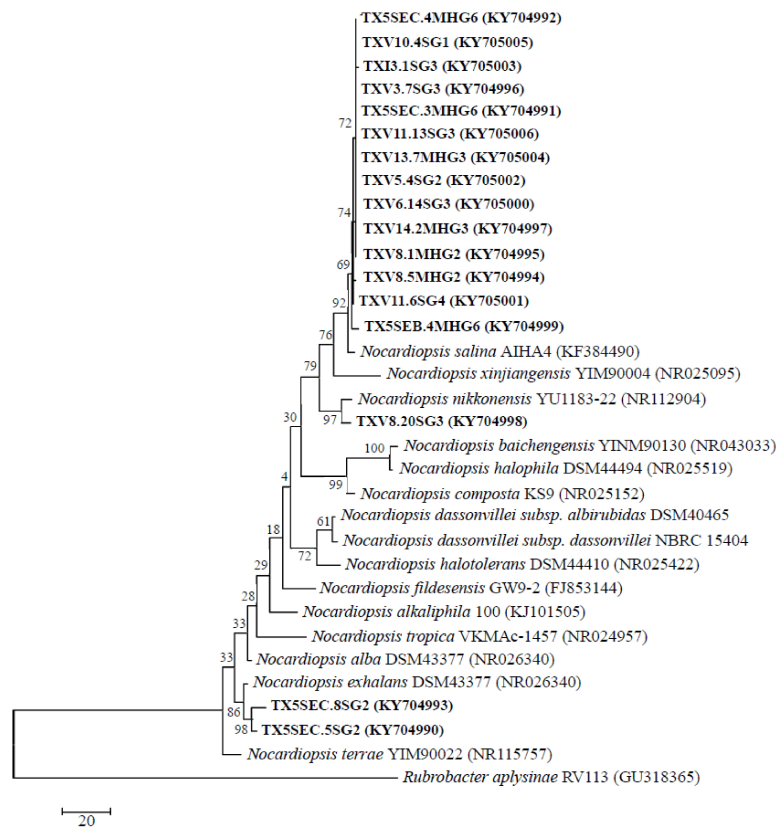
Zuckerkanndl E, Pauling L (1965) Evolutionary divergence and convergence in proteins. In: Bryson V, Vogel HJ (eds) Evolving genes and proteins. Academic Press, New York, pp 97-166



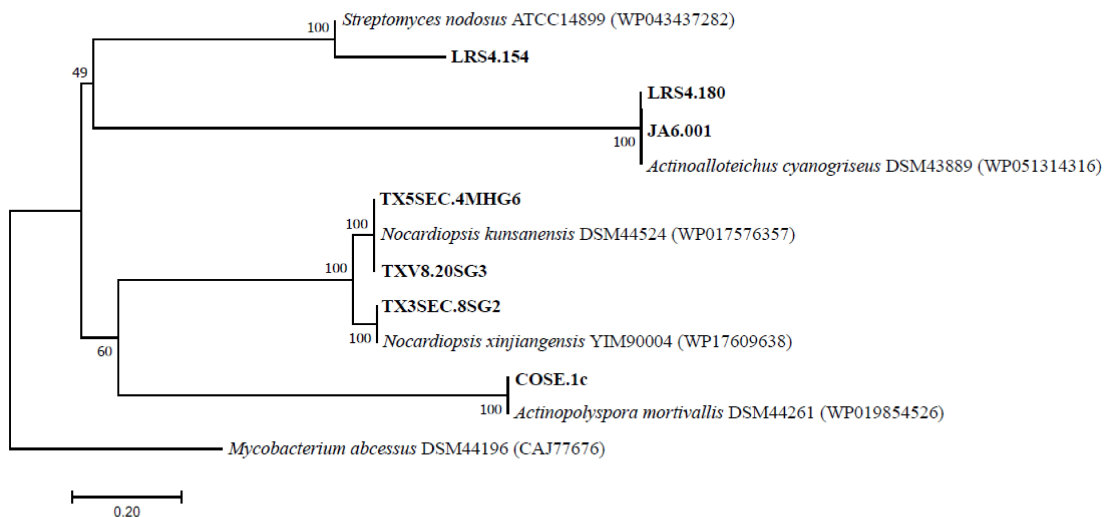
**Fig. 1** Maximum parsimony tree based on 16S rRNA sequences, which shows the phylogenetic relationships the species of the genus *Saccharomonospora*. Bootstrap value of 1000 replicates is used. GenBank accession numbers of 16S rRNA sequences are given in parentheses. Scale bar corresponds to 20 substitutions per nucleotide positions



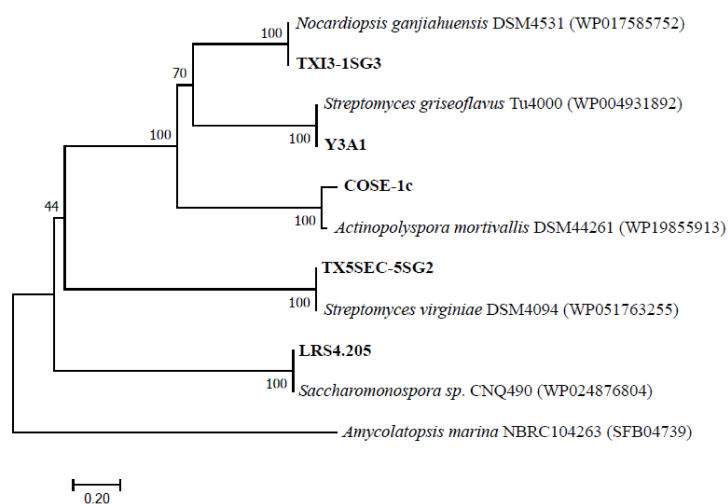
**Fig. 2** Maximum parsimony tree based on 16S rRNA sequences, which shows the phylogenetic relationships the species of the genus *Actinopolyspora*. Bootstrap value of 1000 replicates is used. GenBank accession numbers of 16S rRNA sequences are given in parentheses. Scale bar corresponds to 20 substitutions per nucleotide positions



**Fig. 3** Maximum parsimony tree based on 16S rRNA sequences, which shows the phylogenetic relationships the species of the genus *Nocardioopsis*. Bootstrap value of 1000 replicates is used. GenBank accession numbers of 16S rRNA sequences are given in parentheses. Scale bar corresponds to 20 substitutions per nucleotide positions



**Fig. 4** Phylogenetic tree constructed by the amino acid sequences of the KS domain (ketosynase) of the PKS-I system, of the actinobacteria isolated from halophilic and haloalkylophilic environments, as well as reference strains with the highest percentage of similarity obtained from the Gen Bank database. The bootstrap value was 1000 replicates. The scale bar represents 0.20 AA substitutions per site

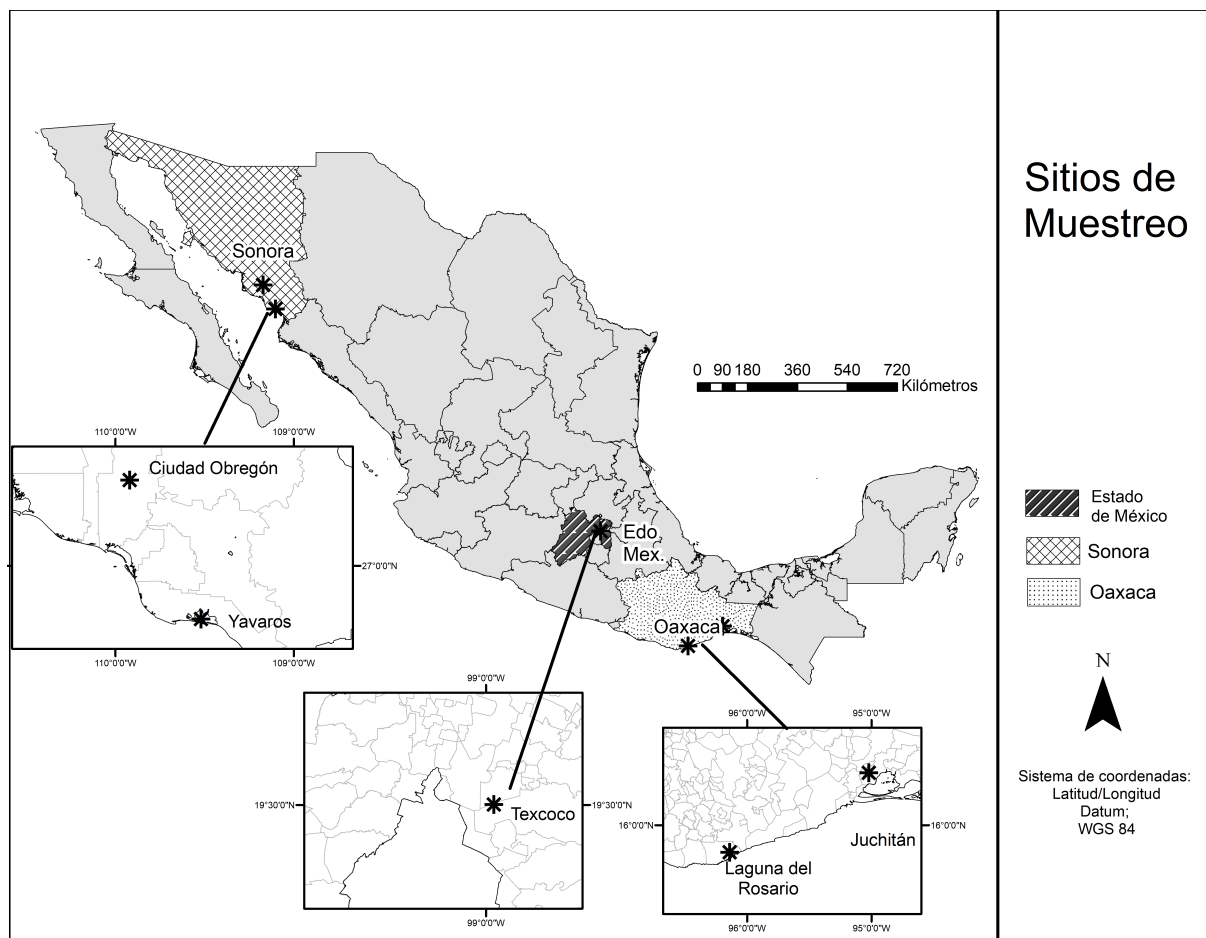


**Fig. 5** Phylogenetic tree constructed by amino acid sequences of domain A (adenylation) of the NRPS system, of the actinobacteria isolated from halophilic and haloalkalófil environments with the reference strains that presented greater percentage of similarity in the database of GenBank. The bootstrap value was 1000 replicates. The scale bar represents 0.20 AA substitutions per site

### 7.3. RESULTADOS ADICIONALES

Se realizó la reactivación de 2 distintas colecciones de cepas pertenecientes al Laboratorio de Microbiología Médica y Ambiental de la Facultad de Medicina de la UAEMex, la **Colección I** integrada por actinobacterias halófilas aisladas de salinas y lagunas saladas de los estados de Sonora y Oaxaca. La **Colección II** esta conformada por actinobacterias halófilas aisladas del suelo salino sódico del ex- Lago de Texcoco.

**Figura 3. Mapa de la República Mexicana donde se muestran los sitios de muestreo**



#### **Colección I**

##### **Características morfológicas**

Las 34 cepas de esta colección se observaron como colonias pequeñas y medianas, de color amarillo, negro, algunas cepas con presencia de micelio aéreo esporulado, presencia de micelio vegetativo y pigmentación difusible en el agar. En todas las cepas se observaron

celulas gram positivas ramificadas con la presencia de grupos de esporas y esporas terminales unicas.

### **Características fisiológicas**

El crecimiento óptimo de las cepas fue en medio de cultivo MH al 10% de NaCl a un pH de 7.4, a una temperatura de 37°C, se comenzó a observar los primeros crecimientos a los 3 días posterior a su incubación, estas características permitieron clasificarlas como actinobacterias halófilas moderadas, las cuales se caracterizan por crecer óptimamente a concentraciones de NaCl entre el 3 y 15%.

### **Identificación genética y detección de los sistemas PKS y NRPS en cepas de Actinobacterias Halófilas**

El análisis comparativo de las secuencias del gen 16S rRNA con las depositadas en las bases de datos: BLAST y EzTaxon, permitió identificar 2 géneros y 4 especies: *Saccharomonospora halophila* (8 cepas), *S. xinjiangensis* (21 cepas), *S. azurea* (2 cepas), *Actinopolyspora mortivallis* (3 cepas).

Las 5 cepas en las que se detectó únicamente el sistema PKS fueron: 1 cepa JA6.001 (*S. halophila*;) y 4 cepas: LRS4.085, LRS4.125, LRS4.171 y LRS4.195 (*S. xinjiangensis*).

Las cepas en las que se detectó el sistema NRPS fueron: 3 cepas: LRS4.058, Y3A1 y Y3A2 (*S. halophila*).

Las 24 cepas en las que se detectó la presencia de ambos sistemas PKS y NRPS fueron: (3 cepas: LRSE2.002, Y3A3 y Y3A4 (*S. halophila*), 16 cepas: LRS4.074, LRS4.080, LRS4.096, LRS4.097, LRS4.099, LRS4. 120, LRS4.146, LRS4.160, LRS4.166, LRS4.169, LRS4.180, LRS4.183, LRS4.201, LRS2.202, LRS4.205 y LRS4.210 (*S. xinjiangensis*), 2 cepas: LRS4.152 y LRS4.154 (*S. azurea*), 3 cepas: COSE.1a, COSE.1b y COSE.1c (*A. mortivallis*).

No se detectó la presencia de los sistemas en 2 cepas: LRS2.006 (*S. halophila*) y LRS4.243 (*S. xinjiangensis*). Los resultados de la detección de los sistemas PKS y NRPS se muestran en la Tabla 4.

### **Análisis filogenético**

En la Figura 5 se muestra el árbol filogenético de las secuencias del gen 16S rRNA de las

cepas aisladas de salinas en los estados de Sonora y Oaxaca, este árbol se construyó con el programa bioinformático ARB y por las secuencias de cepas tipo de algunas especies de los géneros identificados extraídas de la base de datos SILVA, el método de construcción fue el de máxima parsimonia, la topología del árbol filogenético fue evaluada por bootstrap de 1000 repeticiones con el método de Felstein.

### Ribotipificación

Los resultados de los cortes enzimáticos permitieron observar que las cepas identificadas con las especies *S. halophila*, *S. azurea*, *S. xinjiangensis* y *A. mortivallis* tienden a agruparse de acuerdo al número de bandas identificadas, por lo cual se clasificaron en 4 grupos distintos.

El resultado de la identificación genética y el obtenido por la técnica de RFLP permitió identificar a la cepa LRS4.154 como candidata para realizarle más pruebas y poder determinar la descripción de una nueva especie.

**Tabla 3. Detección de los sistemas PKS, NRPS y PKS/NRPS, en actinobacterias halófilas**

No.	Clave de cepa	Identificación de la actinobacterias BLASTN	Clasificación	Numero de acceso en GenBank	Sistema PKS	Sistema NRPS
1	JA6.001	1350pb <i>Saccharomonospora halophila</i> 99.78%	Halófila moderada	KY704956	+	-
2	LRS2.006	1398pb <i>Saccharomonospora halophila</i> 99.71%	Halófila moderada	KY704957	-	-
3	LRS4.058	1393pb <i>Saccharomonospora halophila</i> 99.64%	Halófila moderada	KY704958	-	+
4	LRS4.074	1312pb <i>Saccharomonospora xinjiangensis</i> 99.92%	Halófila moderada	KY704950	+	+
5	LRS4.080	1306pb <i>Saccharomonospora xinjiangensis</i> 99.54%	Halófila moderada	KY704960	+	+
6	LRS4.085	1280pb <i>Saccharomonospora xinjiangensis</i> 99.14%	Halófila moderada	KY704961	+	-
7	LRS4.096	1371pb <i>Saccharomonospora xinjiangensis</i> 100%	Halófila moderada	KY704962	+	+
8	LRS4.097	1396pb <i>Saccharomonospora xijiagesis</i> 99.86%	Halófila moderada	KY704963	+	+
9	LRS4.099	1397pb <i>Saccharomonospora xinxiangensis</i> 99.71%	Halófila moderada	KY704964	+	+
10	LRS4.120	1357pb <i>Saccharomonospora xinjiangensis</i> 100%	Halófila moderada	KY704965	+	+
11	LRS4.125	1365pb <i>Saccharomonospora xinjiangensis</i> 98%	Halófila moderada	KY704966	+	-
12	LRS4.146	1396pb <i>Saccharomonospora xinjiangensis</i> 100%	Halófila moderada	KY704967	+	+
13	LRS4.152	1413pb <i>Saccharomonospora azurea</i> 98.10%	Halófila moderada	KY704968	+	+
14	LRS4.154	1422pb <i>Saccharomonospora azurea</i> 98.30%	Halófila moderada	KY704969	+	+
15	LRS4.160	1400pb <i>Saccharomonospora xijiagesis</i> 99.50%	Halófila moderada	KY704970	+	+
16	LRS4.166	1386pb <i>Saccharomonospora xinjiangensis</i> 99.93%	Halófila moderada	KY704971	+	+
17	LRS4.169	1364pb <i>Saccharomonospora xijiagesis</i> 99%	Halófila moderada	KY704972	+	+

18	LRS4.171	1400pb <i>Saccharomonospora xijiagensis</i> 99.93%	Halófila moderada	KY704973	+	-
19	LRS4.180	1382pb <i>Saccharomonospora xinjiangensis</i> 100%	Halófila moderada	KY704974	+	+
20	LRS4.183	1365pb <i>Saccharomonospora xijiagensis</i> 100%	Halófila moderada	KY704975	+	+
21	LRS4.195	1349pb <i>Saccharomonospora xinjiangensis</i> 99.56%	Halófila moderada	KY704976	+	-
22	LRS4.201	1400pb <i>Saccharomonospora xijiagensis</i> 100%	Halófila moderada	KY704977	+	+
23	LRS4.202	1345pb <i>Saccharomonospora xijiagensis</i> 99.70%	Halófila moderada	KY704978	+	+
24	LRS4.205	1356pb <i>Saccharomonospora xijiagensis</i> 99.78%	Halófila moderada	KY704979	+	+
25	LRS4.210	1348pb <i>Saccharomonospora xinjiangensis</i> 99.41%	Halófila moderada	KY704980	+	+
26	LRS4.243	1372pb <i>Saccharomonospora xijiagensis</i> 99.93%	Halófila moderada	KY704981	-	-
27	LRSE2.002	1367pb <i>Actinopolispora mortivallis</i> 99.71%	Halófila moderada	KY704982	+	+
28	COSE-1a	1376pb <i>Actinopolispora mortivallis</i> 99.93%	Halófila moderada	KY704983	+	+
29	COSE-1b	1366pb <i>Actinopolispora mortivallis</i> 99%	Halófila moderada	KY704984	+	+
30	COSE-1c	1356pb <i>Saccharomonospora halophila</i> 99.63%	Halófila moderada	KY704985	+	+
31	Y3A1	1391pb <i>Saccharomonospora halophila</i> 99%	Halófila moderada	KY704986	-	+
32	Y3A2	1305 pb <i>Saccharomonospora halophila</i> 99%	Halófila moderada	KY704987	-	+
33	Y3A3	1316pb <i>Saccharomonospora halophila</i> 99.63%	Halófila moderada	KY704988	+	+
34	Y3A4	1323pb <i>Saccharomonospora halophila</i> 99%	Halófila moderada	KY704989	+	+

**Tabla 4. Resultados de la Ribotipificación**

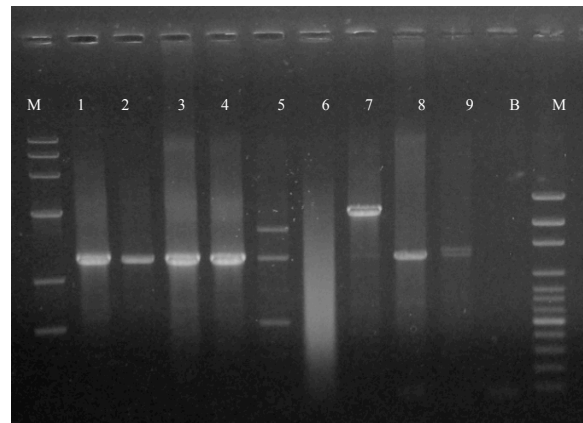
No.	Clave de cepa	Identificación 16S	Caracterización		
			RFLP-PCR		
			Rsa I	Msp II	Hae III
1	JA6.001	1350pb <i>Saccharomonospora halophila</i> 99.78%	1	1	1
2	LRS2.006	1398pb <i>Saccharomonospora halophila</i> 99.71%	1	1	1
3	LRS4.058	1393bp <i>Saccharomonospora halophila</i> 99.64%	1	1	1
4	LRS4.074	1312pb <i>Saccharomonospora xijiagensis</i> 99.92%	2	2	2
5	LRS4.080	1306pb <i>Saccharomonospora xijiagensis</i> 99.54%	2	2	2
6	LRS4.085	1280pb <i>Saccharomonospora xinjiangensis</i> 99.14%	2	2	2
7	LRS4.096	1371pb <i>Saccharomonospora xijiagensis</i> 100%	2	2	2
8	LRS4.097	1396pb <i>Saccharomonospora xijiagensis</i> 99.86%	2	2	2
9	LRS4.099	1397pb <i>Saccharomonospora xinxiangensis</i> 99.71%	2	2	2
10	LRS4.120	1357pb <i>Saccharomonospora xijiagensis</i> 100%	2	2	2
11	LRS4.125	1365pb <i>Saccharomonospora xijiagensis</i> 98%	2	2	2
12	LRS4.146	1396pb <i>Saccharomonospora xijiagensis</i> 100%	2	2	2
13	LRS4.152	1413pb <i>Saccharomonospora azurea</i> 98.10%	2	3	3



14	LRS4.154	1422pb <i>Saccharomonospora azurea</i> 98.30%	2	3	3
15	LRS4.160	1400pb <i>Saccharomonospora xijiagensis</i> 99.50%	2	2	2
16	LRS4.166	1386pb <i>Saccharomonospora xinjiangensis</i> 99.93%	2	2	2
17	LRS4.169	1364pb <i>Saccharomonospora xijiagensis</i> 99%	ND	ND	ND
18	LRS4.171	1400pb <i>Saccharomonospora xijiagensis</i> 99.93%	ND	ND	ND
19	LRS4.180	1382pb <i>Saccharomonospora xinjiangensis</i> 100%	3	2	2
20	LRS4.183	1365pb <i>Saccharomonospora xinjiangensis</i> 100%	3	2	2
21	LRS4.195	1349pb <i>Saccharomonospora xinjiangensis</i> 99.56%	3	2	3
22	LRS4.201	1400pb <i>Saccharomonospora xinjiangensis</i> 100%	3	3	3
23	LRS4.202	1345pb <i>Saccharomonospora xinjiangensis</i> 99.70%	3	3	3
24	LRS4.205	1356pb <i>Saccharomonospora xinjiangensis</i> 99.78%	3	2	3
25	LRS4.210	1348pb <i>Saccharomonospora xinjiangensis</i> 99.41%	ND	ND	ND
26	LRS4.243	1372pb <i>Saccharomonospora xinjiangensis</i> 99.93%	ND	ND	ND
27	COSE-1a	1367pb <i>Actinopolispora mortivallis</i> 99.71%	ND	ND	ND
28	COSE-1b	1376pb <i>Actinopolispora mortivallis</i> 99.93%	ND	ND	ND
29	COSE-1c	1366pb <i>Actinopolispora mortivallis</i> 99%	4	3	3
30	LRSE2.002	1356pb <i>Saccharomonospora halophila</i> 99.63%	–	–	–
31	Y3A1	1391pb <i>Saccharomonospora halophila</i> 99%	ND	ND	ND
32	Y3A2	1305 pb <i>Saccharomonospora halophila</i> 99%	ND	ND	ND
33	Y3A3	1316pb <i>Saccharomonospora halophila</i> 99.63%	ND	ND	ND
34	Y3A4	1323pb <i>Saccharomonospora halophila</i> 99%	ND	ND	ND

ND: no determinado

**Figura 4 . Amplificación de los sistemas PKS y NRPS de las colección I**



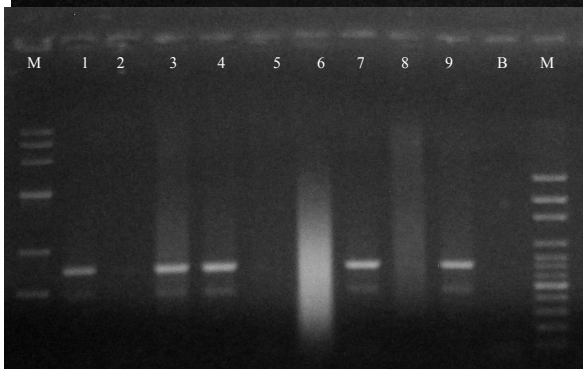
**a)**

**a) y b)**

- 1. LRS4.080
- 2. LRS4.125
- 3. LRS4.202
- 4. LRS.205
- 5. HS4-1b
- 6. COSE-1C
- 7. Y3A1
- 8. LRSE2.002
- 9. CAD96508-1

B. Blanco

M. Marcador de peso molecular 100-3000pb



**b)**

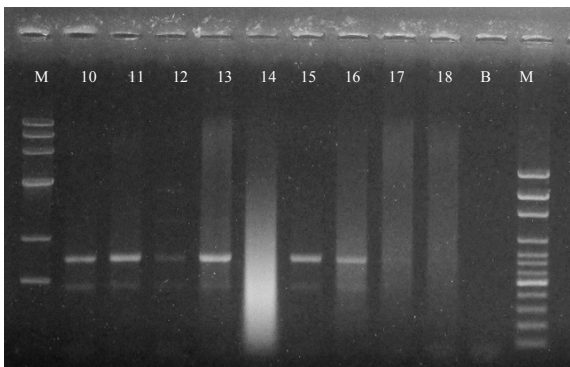
**c)**

**c) y d)**

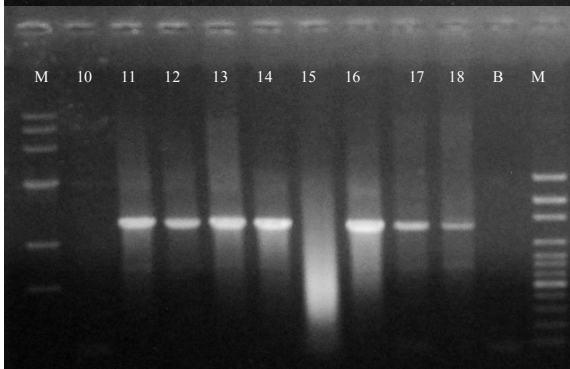
- 10. LRS4.058
- 11. LRS4.074
- 12. LRS4.099
- 13. LRS4.152
- 14. LRS4.160
- 15. COSE-1C
- 16. LRS4.169
- 17. LRSE2.002
- 18. LRSE.195

B. Blanco

M. Marcador de peso molecular 100-3000pb

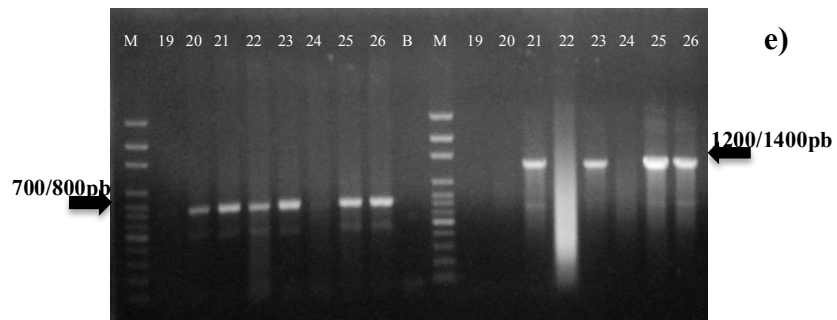


700/800pb



1200/1400pb

**d)**



e)

e)

- 19. JA6.001
- 20. CAD96S08-2
- 21. LRS4.154
- 22. CAD96S14-2<sup>a</sup>
- 23. LRS4.097
- 24. HS4-1b
- 25. LRS4.183
- 26. LRS4.210
- B. Blanco
- M. Marcador de peso