



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA  
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES OCEANOLÓGICAS  
FACULTAD DE CIENCIAS MARINAS  
POSGRADO EN OCEANOGRAFÍA COSTERA

T E S I S

**COMPARACIÓN METABÓLICA DE ACTINOBACTERIAS AISLADAS DE  
SEDIMENTO MARINO DE LA LAGUNA OJO DE LIEBRE**

PRESENTADA POR  
**ANDREA YAZMÍN ZAMORA QUINTERO**

COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE  
**MAESTRA EN CIENCIAS EN OCEANOGRAFÍA COSTERA**

**Directora de tesis**

Dra. Natalie Millán Aguiñaga

**Co-Directora de tesis**

Dra. Mónica Torres Beltrán

**Sinodal**

Dra. Dulce Guillén Matus

Noviembre 2022, Ensenada, Baja California

FACULTAD DE CIENCIAS MARINAS  
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES OCEANOLÓGICAS  
POSGRADO EN OCEANOGRAFIA COSTERA

COMPARACIÓN METABÓLICA DE ACTINOBACTERIAS AISLADAS DE SEDIMENTO  
MARINO DE LA LAGUNA OJO DE LIEBRE

T E S I S

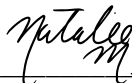
QUE PARA CUBRIR PARCIALMENTE LOS REQUISITOS NECESARIOS PARA  
OBTENER EL GRADO DE

MAESTRA EN CIENCIAS EN OCEANOGRAFÍA COSTERA

PRESENTA

ANDREA YAZMÍN ZAMORA QUINTERO

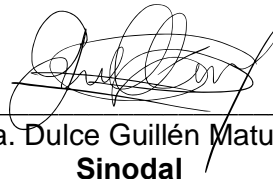
Aprobada por:



Dra. Natalie Millán Aguiñaga  
**Directora de tesis**



Dra. Mónica Torres Beltrán  
**Co-Directora**



Dra. Dulce Guillén Matus  
**Sinodal**

## AGRADECIMIENTOS

A mi familia, por apoyarme en mis estudios, por creer en mí, por ser una motivación en mi vida, por formarme y guiarme en el camino.

A mi directora de tesis, Dra. Natalie Millán Aguiñaga, a mi co-directora de tesis, Dra. Mónica Torres Beltrán y a mi sinodal, Dra. Dulce Guillén Matus, por su dedicación, por su apoyo incondicional, por su paciencia y, sobre todo, por sus consejos a nivel académico y personal. Por ser pacientes a lo largo de estos dos años y medio que me tomó terminar la maestría. Por estar al pendiente de cada duda que tuve, por tomarse el tiempo de leer el presente trabajo, y por sus recomendaciones para el enriquecimiento del mismo.

A mis queridos amigos, gracias por tenerme paciencia, por ser parte de la conclusión de este siguiente capítulo en mi camino y por haber estado interesados en mi tema y soportar enseñarles las fotos de las bacterias con las que trabajé.

A la Universidad Autónoma de Baja California y al personal de la Facultad de Ciencias Marinas que labora en ella por su calidez y profesionalismo.

A CONACyT por el otorgamiento de la Beca Nacional de 2 años de estudio.

Se agradece el apoyo de la “Beca para mujeres en la ciencia L’Oréal-UNESCO-Academia Mexicana de Ciencias otorgada a mi directora de tesis Dra. Natalie Millán-Aguiñaga en 2021; ya que dicha beca permitió obtener los datos genómicos de las bacterias trabajadas en esta tesis.

Y a todas aquellas personas, que de alguna u otra forma prestaron su colaboración y ayudaron para llevar esta investigación adelante y que compartieron conmigo esta increíble experiencia.

## RESUMEN

Las actinobacterias son reconocidas y estudiadas por su versatilidad metabólica que les permite sobrevivir en distintas condiciones ambientales y producir metabolitos secundarios con aplicación biotecnológica y/o farmacológica. Debido a la actual necesidad de encontrar nuevos fármacos, la exploración de los genomas de actinobacterias surge como una herramienta para conocer las potenciales rutas metabólicas responsables de la producción de metabolitos secundarios. Por sus características ambientales, la Laguna Ojo de Liebre, representa un lugar de gran interés para el estudio de géneros de actinobacterias poco estudiados con respecto a su potencial metabólico. Estudios previos de diversidad de bacterias en la laguna identificaron géneros de actinobacterias poco estudiados como *Actinomadura* sp. y *Micromonospora* sp. Además, los extractos químicos mostraron actividad biológica contra diversas líneas celulares de cáncer. El objetivo de este trabajo fue comparar el metabolismo primario de cuatro cepas de actinobacterias (2 cepas de *Actinomadura* sp. y 2 cepas de *Micromonospora* sp.), diseñando dos medios de cultivo específicos por género para estimular el crecimiento de las cepas. Del análisis del metabolismo primario de los 4 genomas, se detectaron un total de 62 rutas metabólicas, de las cuales 9 son rutas metabólicas compartidas. En específico, para el género *Actinomadura* se detectó una ruta metabólica relacionada con la degradación del aminoácido taurina que no se encontró en el género *Micromonospora*; así como una ruta de degradación de quitina que fue específica para el género *Micromonospora*. Curvas de crecimiento con taurina y quitina mostraron un aumento en la constante de crecimiento respecto al medio control, al menos cuando se reemplazaba un 50% de la fuente de nitrógeno y carbono respecto al medio control. Análisis de metabolismo secundario, utilizando el programa AntiSMASH, identificó en los genomas del género *Actinomadura* la presencia del BGC ectoína y en los genomas del género *Micromonospora* la presencia del BGC desferrioxamine E. Cabe mencionar que solo el 10% de los BGC identificados presentan un 50% de similitud con rutas conocidas en las bases de datos. Esto revela el gran potencial de rutas metabólicas que presentan ambos géneros para la producción de nuevos compuestos con actividad antibiótica y/o anticancerígena.

**Palabras clave:** *Actinomadura*, *Micromonospora*, metabolismo primario, metabolismo secundario, curvas de crecimiento, quitina, taurina.

## CONTENIDO

1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. ANTECEDENTES.....	7
3. HIPÓTESIS.....	10
4. OBJETIVOS.....	10
4.1 OBJETIVO GENERAL.....	10
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	10
5. METODOLOGÍA.....	11
5.1 DESCRIPCIÓN DE GENOMAS.....	11
5.2 ANÁLISIS GENÓMICO DEL METABOLISMO PRIMARIO.....	11
5.3 ANÁLISIS DE METABOLISMO SECUNDARIO.....	13
5.4 MEDIOS DE CULTIVO.....	13
5.5 CURVAS DE CRECIMIENTO.....	14
6. RESULTADOS.....	16
6.1 RUTAS METABÓLICAS PRIMARIAS.....	16
6.2 CURVAS DE CRECIMIENTO.....	29
6.3 ANÁLISIS METABOLISMO SECUNDARIO.....	36
7. DISCUSIÓN.....	42
8. CONCLUSIÓN.....	52
9. REFERENCIAS.....	55

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Número de rutas metabólicas primarias observadas en los genomas de <i>Actinomadura</i> sp. Y <i>Micromonospora</i> sp.....	20
<b>Figura 2.</b> Rutas metabólicas primarias entre genomas <i>Actinomadura</i> sp. (LOL-011; LOL-016), <i>Micromonospora</i> sp. (LOL-025; LOL-027) y cepas tipo <i>A. rifamycinii</i> , <i>A. crema</i> , <i>M. pattaloongensis</i> y <i>M. echinofusca</i> .....	25
<b>Figura 3.</b> Diversidad y abundancia de categorías de rutas metabólicas primarias presentes en cada genoma ( <i>Actinomadura</i> sp. y <i>Micromonospora</i> sp.).....	27
<b>Figura 4.</b> Diagrama de puntos de las categorías de degradación de las rutas metabólicas primarias de los genomas <i>Actinomadura</i> y <i>Micromonospora</i> . El tamaño de los puntos indica la cantidad de rutas que se observaron por genoma. ....	28
<b>Figura 5.</b> Curvas de crecimiento en el medio control A1.....	30
<b>Figura 6.</b> Curvas de crecimiento para las cepas pertenecientes al género <i>Micromonospora</i> .....	32
<b>Figura 7.</b> Curvas de crecimiento para las cepas pertenecientes al género <i>Actinomadura</i> en medio control A1, 50% taurina y 100% taurina.....	35
<b>Figura 8.</b> Grupos de genes biosintéticos encontrados en los genomas de <i>Actinomadura</i> sp. (LOL-011; LOL-016), <i>A. crema</i> , <i>A. rifamycinii</i> , <i>Micromonospora</i> sp. (LOL-025; LOL-027), <i>M. echinofusca</i> , <i>M. pattaloongensis</i> utilizando antiSMASH 6.....	38
<b>Figura 9.</b> Grupos de genes biosintéticos encontrados en los genomas de <i>Actinomadura</i> sp. (LOL-011; LOL-016), <i>A. crema</i> , <i>A. rifamycinii</i> .....	39
<b>Figura 10.</b> Grupos de genes biosintéticos encontrados en los genomas de <i>Micromonospora</i> sp. (LOL-025; LOL-027), <i>M. echinofusca</i> , <i>M. pattaloongensis</i> utilizando antiSMASH 6.....	39

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla I.</b> Características generales de los genomas de estudio.....	16
<b>Tabla II.</b> Rutas metabólicas primarias presentes en los genomas de <i>Actinomadura</i> sp. (LOL-011; LOL-016) y <i>Micromonospora</i> sp. (LOL-025- LOL-027).....	17
<b>Tabla III.</b> Rutas metabólicas primarias presentes en los genomas de <i>Actinomadura</i> sp. (LOL-011; LOL-016), <i>Actinomadura cremea</i> y <i>Actinomadura rifamycini</i> .....	22
<b>Tabla IV.</b> Rutas metabólicas primarias presentes en los genomas de <i>Micromonospora</i> sp. (LOL-025; LOL-027), <i>Micromonospora crechinofusca</i> y <i>Micromonospora pattaloongensis</i> .....	23
<b>Tabla V.</b> Valores de constante de crecimiento para las cepas <i>Actinomadura</i> sp. (LOL-011; LOL-016) y <i>Micromonospora</i> sp (LOL-025; LOL-027) calculadas a partir de la fase exponencial.....	30
<b>Tabla VI.</b> Valores de constante de crecimiento para las cepas <i>Micromonospora</i> sp. (LOL-025; LOL-027).....	33
<b>Tabla VII.</b> Constantes de crecimiento para las cepas <i>Actinomadura</i> sp. (LOL-011; LOL-016).....	36
<b>Tabla VIII.</b> Productos de los BGC encontrados en cada cepa de <i>Actinomadura</i> sp. (LOL-011; LOL-016), <i>A. cremea</i> , <i>A. rifamycini</i> , <i>Micromonospora</i> sp. (LOL-025; LOL-027), <i>M. echinofusca</i> , <i>M. pattaloongensis</i> .....	41

## 1. INTRODUCCIÓN

El filo Actinomicetota (Oren y Garrity, 2021), previamente referido como Actinobacteria se divide en 6 clases principales de bacterias Gram positivas: *Actinomycetia*, *Nitriliruptoria*, *Acidimicrobiia*, *Coriobacteriia*, *Thermoleophilia* y *Rubrobacteria*. Dentro de la clase *Actinomycetia* se encuentran géneros muy estudiados por su gran capacidad de producción de metabolitos secundarios con actividad antibiótica, como son los géneros *Streptomyces*, *Micromonospora*, *Nocardia* y *Actinomadura* (Raja y Prabakarana, 2011).

En general la clase *Actinomycetia* presenta una amplia variedad de morfologías, desde cocoides (*Micrococcus* y *Mycobacterium*) o bastoncillos (*Arthrobacter*) hasta formas fragmentadas de hifas (*Nocardia* spp.) o micelio ramificado permanente y altamente diferenciado (*Streptomyces* spp.) (Atlas, 1997; Whitman *et al.*, 2012). Algunos géneros de esta clase (*Streptomyces* spp, *Salinispora* spp, *Micromonospora* spp., *Actinomadura* spp.) tiene la capacidad de producción de diferentes tipos de esporas que les sirven como agentes de dispersión y supervivencia (Whitman *et al.*, 2012; Barka *et al.*, 2016). En general presentan una distribución global ya que se encuentran habitando sedimentos terrestres, ambientes marinos, y agua dulce. Como simbioses de una gran diversidad de organismos incluyendo plantas, hongos, insectos y en nuestra propia microbiota (van der Meij *et al.*, 2017).



La mayoría de las interacciones que tienen estas bacterias con su huésped son beneficiosas, ya que producen productos naturales que permiten que su huésped se proteja contra patógenos o plagas, o enzimas para degradar polímeros naturales resistentes como la lignocelulosa (van der Meiji *et al.*, 2017). En una interrelación más estrecha, colonizan los tejidos internos de la planta como patógenos (Barka *et al.*, 2016), como es el caso de *Streptomyces scabies*, *S. acidiscabies*, y *S. turgidiscabies*; o bien con un balance favorable para ambos como sucede en la simbiosis de *Frankia* con plantas actinorrhizas (Fernández, 2005). Dentro de sus principales funciones en la naturaleza, estos microorganismos participan en el reciclaje de la materia orgánica, desintegrando aquellos compuestos resistentes que las bacterias comunes y los hongos filamentosos no pueden descomponer, de esta forma se encuentran participando activamente en la mineralización del material orgánico o formación de humus (Quiñones *et al.*, 2016). De esta forma, se ha demostrado que algunas especies de la clase *Actinomycetia* que están presentes en la rizosfera de diversas plantas, son efectivos antagonistas de hongos patógenos, así mismo, en regular la composición de las comunidades microbianas del suelo a través de mecanismos basados en el antagonismo microbiano (Crawford *et al.*, 1993; El-Tarabily, 1997; El-Tarabily y Soliman, 2000; Evangelista, 2014; Barka *et al.*, 2016).

Como se mencionó anteriormente, la producción de productos naturales con actividad antibiótica ha sido una de las principales razones de estudio de la clase *Actinomycetia*. Ejemplos comunes de estas actinobacterias y sus antibióticos producidos son *Streptomyces hygroscopicus* (rapamicina, como inmunosupresor),

*Amycolatopsis mediterranei* (rifamicina, como agente antimicrobiano), *Saccharopolyspora erythraea* (eritromicina, como antibiótico de amplio espectro), *Amycolatopsis orientalis* (vancomicina, como antibiótico) (Frasch *et al.*, 2015; Xu, *et al.*, 2014). En particular, el género *Streptomyces* es el más estudiado debido a la gran cantidad de compuestos que se han desarrollado en antibióticos de uso común, con más de 8000 compuestos activos reportados (Raja y Prabakarana, 2011). El género *Micromonospora* ocupa el segundo lugar con más de 740 compuestos, como es la producción de los aminoglucósidos como la gentamicina (Weinstein *et al.*, 1963), sisomicina (Weinstein *et al.*, 1970) y verdamicina (Weinstein *et al.*, 1975). Otros metabolitos secundarios que son producidos por este género, son los antibióticos de enedina y antraquinona, producidos por *M. echinospora* NRRL 15839 (Lee *et al.*, 1989) y *M. lupini* (Igarashi *et al.*, 2011). Además, se ha observado que las cepas del género *Micromonospora* son una fuente potencial de agentes de biocontrol, biocombustibles, productos para el crecimiento de plantas y probióticos para plantas (Das *et al.*, 2008; Hirsch y Valdés, 2010; Trujillo *et al.*, 2015; Talukdar *et al.*, 2016). El género *Actinomadura* se ha convertido en uno de los géneros más prometedores del filo Actinomycetota, ya que se ha demostrado que una gran cantidad de sus especies producen diversos metabolitos bioactivos como actinomadurol (Shin *et al.*, 2016), bendigol (Simmons *et al.*, 2011), chandranamicina (Maskey *et al.*, 2003), madurastatina (Mazzei *et al.*, 2012), natalenamida (Lee *et al.*, 2018), nonthmicina (Komaki *et al.*, 2020), sagamilactam (Kimura *et al.*, 2016) y semduramicina (Wieme *et al.*, 2019).

Los métodos de secuenciación de genomas bacterianos han impulsado la búsqueda de las rutas metabólicas responsables de la producción de dichos compuestos bioactivos, de ahí la gran importancia y avance de la minería genómica. Los proyectos de secuenciación del genoma han revelado que los géneros con mayor producción de antibióticos, como *Streptomyces*, tienen un tamaño de genoma de alrededor de 8-10 Mb (Nett, Ikeda y Moore 2009) y *Micromonospora* alrededor de 7 Mb (Carro *et al.*, 2018). Del total del genoma de *Salinispora* (~5 Mb), se ha observado que alrededor de un 10% está dedicado a grupos de genes biosintéticos (BGC, por sus siglas en inglés) relacionados con las rutas metabólicas de producción de metabolitos secundarios (Udwary *et al.*, 2007).

Debido a la gran cantidad de genomas que se fueron generando, fue de suma importancia el desarrollo de metodologías computacionales para asociar las diferentes clases de metabolitos secundarios conocidos con su respectivo BGC. En 2011, Medema y colaboradores presentaron la herramienta antiSMASH (**ant**ibiotics & **S**ecundary **M**etabolite **A**nalysis **S**hell) que revolucionó la manera de analizar las rutas metabólicas asociadas al metabolismo secundario de genomas bacterianos. Entre las clases de metabolismo secundario que se predicen están los policétidos, péptidos, terpenos, lantibióticos, bacteriocinas, sideróforos, entre otros. Diez años después de la primera publicación, se sigue actualizando y mejorando esta herramienta. Actualmente, se tiene antiSMASH 6.0 que ha aumentado la cantidad de tipos de BGC que predice y mejorado sus algoritmos de comparación para detectar diferentes BGC (Blin *et al.*, 2021).

Aún con los avances de tecnologías de secuenciación y análisis bioinformáticos, queda mucho por explorar respecto a el potencial metabólico de las actinobacterias y sus productos naturales. La razón aparente de la baja tasa de descubrimiento para nuevos antibióticos, probablemente se deba a la falta de conocimiento sobre el mecanismo regulador que se necesita para activar la expresión de los BGC responsables de la síntesis de antibióticos en actinobacterias en condiciones de laboratorio. Por ejemplo, a pesar de la gran diversidad y cantidad de BGC que se predicen de los genomas de actinobacterias, no se conocen todos los productos asociados. Letzel *et al.*, 2017, muestran que para el género *Salinispora* solo se han podido relacionar 24 productos de los 176 diferentes BGC que se predijeron del análisis de 119 genomas. Por lo tanto, existe una oportunidad considerable para el descubrimiento de nuevos fármacos (Watve, 2001; Baral *et al.*, 2018). Es por ello, que se han desarrollado diferentes enfoques para expresar los productos de los diferentes BGC que contienen, entre ellos la expresión heteróloga, ingeniería ribosomal, así como el uso de distintos elicitores (Baral *et al.*, 2018).

Algunos estudios han demostrado que la manipulación de rutas metabólicas primarias es una herramienta para la expresión de la producción de metabolitos secundarios como los antibióticos (Lee *et al.*, 2009). El metabolismo primario se define como el conjunto de reacciones anabólicas y catabólicas cuyo fin es el mantenimiento de los procesos vitales y el incremento de la biomasa total (Perez, 2011). El desarrollo de programas computacionales con el fin de analizar el metabolismo primario también ha permitido conocer el potencial metabólico de las

cepas de estudio. En particular, el programa MetaPathways predice marcos de lecturas asociados a los genes funcionales presentes en los genomas y realiza su anotación con base en la comparación de las secuencias con bases de datos disponibles i.e. MetaCyc, RefSeq, Uniprot. (Konwar *et al.*, 2013).

## 2. ANTECEDENTES

Debido al aumento de patógenos resistentes a antibióticos comunes, la búsqueda de actinobacterias aisladas de ambientes inexplorados, únicos y extremos, ofrecen la posibilidad de encontrar cepas silvestres no descritas que produzcan nuevos metabolitos secundarios con potencial bioactivo (Jian y Xu, 1996; Bull *et al.*, 2005; Ward y Bora, 2006). Las familias de actinobacterias marinas en las que se han encontrado nuevos compuestos bioactivos con interés farmacológico han sido principalmente de *Streptomycetaceae* y *Micromonosporaceae* (Kelecom, 2002; Jensen *et al.*, 2005; Fiedler *et al.*, 2005). Este grupo de bacterias se caracterizan por la producción de enzimas extracelulares; destacan por constituir la mayor fuente de productos naturales bioactivos como alcaloides, péptidos, terpenos y policétidos las que podrían innovar en el ámbito médico e industrial (Li *et al.*, 2014; Bull y Stach, 2005; Subramani y Aalbersberg, 2012); y compuestos con actividad biológica, así como por su versatilidad metabólica (Nawani *et al.*, 2013; Fenical y Jensen, 2006; Augustine *et al.*, 2013).

En México son pocos los estudios sobre actinobacterias marinas, de los cuales en el sedimento del Golfo de California se han aislado varios géneros, entre ellos, *Streptomyces*, *Salinispora*, *Actinomadura* y *Micromonospora* (Becerril-Espinosa 2011; Torres-Beltrán *et al.*, 2012; Cardoso-Martinez *et al.*, 2015). Becerril y colaboradores (2011), encontraron que cepas de *Salinispora arenicola* presentaban actividad antibiótica contra *Proteus vulgaris* y *Pseudomonas aeruginosa* y actividad

anticancerígena contra células de carcinoma colorrectal HCT-116, cervical HeLa y pulmonar H460. Dicha actividad antibiótica pudo deberse a la presencia de rifamicina de los extractos crudos de la cepa de *Salinispora arenicola*, derivados de los análisis de espectroscopía de masas. En dichos análisis de masas, se observaron señales donde las longitudes de onda y iones moleculares no coincidieron con los compuestos que han sido reportados en bases de datos, sugiriendo el potencial de producción de nuevos compuestos con actividad anticancerígena.

A su vez, Torres-Beltrán y colaboradores (2012), aislaron cepas de actinobacterias de sedimentos marinos de Bahía Concepción y Bahía de Los Ángeles pertenecientes al género *Streptomyces*, *Micromonospora* y *Salinispora*. Extracciones químicas con acetato de etilo revelaron actividad citotóxica contra las líneas celulares de cáncer de mama (MCF7) y cérvix (HeLa). Además, se detectaron compuestos con actividad biológica que han sido documentados para distintas especies de *Micromonospora*, como los antibióticos fortamicina AP, KE y AM, micinamicina (m/z 505.687 M+), gentamina (m/z 290.353 M+) y el inhibidor celular macquarimicina (m/z 370.496 M+). Por su parte, Cardoso-Martinez y colaboradores (2015) aislaron cepas de *Micromonospora* y *Salinispora* de muestras de sedimento de Bahía de Loreto, que mostraron actividad contra *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus vulgaris* y *Staphylococcus aureus* resistente a metilicina. MRSA. Además, Castro 2014, estudió el potencial bioactivo de los metabolitos secundarios producidos por actinobacterias aisladas de sedimentos marinos de Puerto Vallarta y Veracruz en México, donde evaluó su efecto anticancerígeno y antibiótico. En dicho estudio se aislaron diferentes

géneros además de *Streptomyces* y *Micromonospora* que incluye *Actinoalloteichus*, *Nocardiopsis*, y *Saccharomonospora*.

Zamora-Quintero y colaboradores (2022) aislaron actinobacterias de sedimentos de la Laguna Ojo de Liebre encontrando una mayor diversidad de géneros, incluyendo *Streptomyces*, *Micromonospora*, *Actinomadura*, *Nocardiopsis* y *Plantactinospora*. Extractos químicos con acetato de etilo de cepas de *Actinomadura* y *Micromonospora* revelaron actividad citotóxica contra 6 diferentes líneas celulares de cáncer: pulmón (H1299), cérvico-uterino (HeLa, SiHa y CaSki), colon (Caco-2), e hígado (Hep G2). Análisis de espectroscopía de masas y redes moleculares de dichos extractos revelaron que la mayoría de los nodos no fueron clasificados utilizando la base de datos de GNPS ni del Atlas de Productos Naturales, lo cual sugiere que la gran mayoría de los metabolitos producidos por estas cepas son desconocidos y tienen una estructura química novedosa.

En general, estos estudios de diversidad de actinobacterias de muestras de sedimento marino de diferentes lugares de México demuestran el gran potencial de metabolitos activos contra diferentes células de cáncer, así como antibióticos. Pero en ningún estudio se ha realizado un análisis genómico de las cepas aisladas para conocer su potencial de metabolismo primario y secundario. Por lo que los resultados que se obtengan en este estudio serán de utilidad para el conocimiento de las distintas rutas metabólicas primarias y secundarias involucradas en dos cepas de *Actinomadura sp.* y dos de *Micromonospora sp.*, aisladas de la Laguna Ojo de Liebre.



### 3. HIPÓTESIS

Los genomas de las cepas de actinobacterias presentarán diferencias en su metabolismo primario como secundario. Dichas diferencias permitirán elaborar medios de cultivo con nutrientes específicos a cada género, con lo que aumentará la constante de crecimiento.

### 4. OBJETIVOS

#### 4.1 OBJETIVO GENERAL

Analizar y comparar el metabolismo primario y secundario de cuatro genomas de actinobacterias (*Actinomadura* y *Micromonospora*).

#### 4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Analizar y comparar el metabolismo primario de cuatro genomas de actinobacterias.
2. Determinar los nutrientes específicos para la preparación de los medios de cultivo para el crecimiento de las cuatro cepas.
3. Determinar y comparar las fases de crecimiento de las cuatro cepas de actinobacterias en medio control y medio específico.
4. Analizar y comparar el metabolismo secundario de cuatro genomas de actinobacterias.

## 5. METODOLOGÍA

### 5.1 DESCRIPCIÓN DE GENOMAS

Se utilizaron los genomas secuenciados de cuatro cepas de actinobacterias aisladas e identificadas previamente por Zamora-Quintero y colaboradores (2022) para analizar su metabolismo primario y secundario. Las cepas se eligieron con base en su actividad anticancerígena y fueron clasificadas dentro del género *Actinomadura* (LOL-011 y LOL-016) y del género *Micromonospora* (LOL-025 y LOL-027).

### 5.2 ANÁLISIS GENÓMICO DEL METABOLISMO PRIMARIO

Para predecir las rutas metabólicas primarias se analizaron las secuencias de los marcos de lectura identificados en los 4 genomas de actinobacterias (archivos .gbk o .fasta) utilizando módulo de PathwayTools en el programa MetaPathways (versión 2.5.1) (Konwar *et al.*, 2013). Para cada genoma se obtuvo una matriz de las rutas metabólicas identificadas, cada matriz numérica fue transformada a una de ausencia y presencia. Las matrices se analizaron en el programa Excel (versión 18.0) para identificar las diferencias y similitudes de rutas metabólicas entre genomas del mismo género y entre géneros. Los resultados de las comparaciones se visualizaron utilizando gráficas de barras apiladas, diagramas de Venn y mapas de calor, generadas con la paquetería ggplot (Wickham, 2006) del programa R (versión 3.6.3) (Wickham, 2006).

Para determinar las cepas tipo más cercanas a nuestros genomas se utilizó el programa KmerFinder 3.2 que predice las especies bacterianas utilizando un algoritmo rápido K-mer con datos de genomas (Hasman *et al.*, 2014; Larsen *et al.*, 2014; Clausen *et al.*, 2018). Los genomas de las cepas tipo más cercanas también fueron analizadas con Metapathways de la manera antes descrita para hacer la comparación de todas las rutas de metabolismo primario en *A. cremea*, *A. rifamycini*, *M. pattaloongensis* y *M. echinofusca*.

Posterior al análisis inicial de metabolismo primario se identificaron dos rutas metabólicas únicas para cada género de actinobacteria, degradación de taurina para el género *Actinomadura* y degradación de quitina para el género *Micromonospora*. Para conocer la distribución de este tipo de metabolismo en estos géneros, se analizaron en MetaPathways los genomas de distintas cepas tipo. Para identificar la presencia o ausencia de la ruta de “taurina IV” en otros genomas de *Actinomadura*, se decidió utilizar el programa Metapathways en 10 genomas de cepas tipo: *A. latina*, *A. latina*, *A. meyerae*, *A. macra*, *A. algeriensis*, *A. madurae*, *A. geliboluensis*, *Spirillospora albida*, *A. cremea*, *A. rifamycini*. Para la identificación de presencia o ausencia de la ruta de “quitina II”, se decidió analizar 10 genomas de cepas tipo de *Micromonospora*: *M. pattaloongensis*, *M. echinofusca*, *M. pisi*, *M. polyrhachis*, *M. sediminimaris*, *M. phaseoli*, *M. echinaurantiaca*, *M. deserti*, *M. citrea* y *M. peucetia*.

### 5.3 ANÁLISIS DE METABOLISMO SECUNDARIO

Para la identificación de grupos de genes biosintéticos de metabolitos secundarios de cada genoma incluyendo los genomas de las cepas tipo, se subieron los archivos .gbk, a la plataforma de antiSMASH (versión 6.0). Se utilizó la versión en línea del programa (<https://antismash.secondarymetabolites.org>) y se seleccionó la detección relajada dentro de los parámetros, y se seleccionaron todas las características extras que se ofrecen para analizar genomas. Con los resultados obtenidos de los grupos de genes biosintéticos (BGC) presentes en cada región del genoma y el porcentaje de similitud, se utilizó el programa Excel (versión 18.0) para analizar las diferencias y similitudes entre genomas del mismo género y entre géneros. Los resultados de las comparaciones se visualizan en tabla con el porcentaje de similitud con las bases de datos y en una gráfica de barras acumuladas para observar la abundancia y diversidad de cada tipo de BGC.

### 5.4 MEDIOS DE CULTIVO

A partir de los resultados obtenidos del análisis del metabolismo primario utilizando Metapathways, se prepararon diferentes medios de cultivo por cepa. Se utilizó como medio de cultivo control, el medio A1 (sal 22 g l<sup>-1</sup>; almidón 10 g l<sup>-1</sup>; levadura 4 g l<sup>-1</sup>; peptona 2 g l<sup>-1</sup>). Para las dos cepas de *Actinomadura* se utilizó el medio Taurina 100% (sal 22 g l<sup>-1</sup>; almidón 10 g l<sup>-1</sup>; levadura 4 g l<sup>-1</sup>; taurina 2 g l<sup>-1</sup>) y el medio de Taurina 50% (sal 22 g l<sup>-1</sup>; almidón 10 g l<sup>-1</sup>; levadura 4 g l<sup>-1</sup>; peptona 1 g l<sup>-1</sup>; taurina 1 g l<sup>-1</sup>). Para las dos cepas pertenecientes a *Micromonospora*, se utilizó el medio Quitina 100% (sal 22 g l<sup>-1</sup>; quitina 10 g l<sup>-1</sup>; levadura 4 g l<sup>-1</sup>; peptona 2 g l<sup>-1</sup>) y el

medio de Quitina 50% (sal 22 g l<sup>-1</sup>; almidón 5 g l<sup>-1</sup>; quitina 5 g l<sup>-1</sup>; levadura 4 g l<sup>-1</sup>; peptona 2 g l<sup>-1</sup>).

## 5.5 CURVAS DE CRECIMIENTO

Se utilizó el método de volumen empacado para determinar las fases de crecimiento de las cepas utilizando los diferentes medios de cultivo y el medio control. Como fase inicial se inoculó el criopreservado de cada cepa en 25 ml de medio líquido control A1 (sal 22 g l<sup>-1</sup>; almidón 10 g l<sup>-1</sup>; levadura 4 g l<sup>-1</sup>; peptona 2 g l<sup>-1</sup>; agar 14 g l<sup>-1</sup>) y se dejó en agitación por 4 semanas, a una temperatura de 30°C. Para poder tener una mayor cantidad de células de cada cepa, se pasó una alícuota de 1 ml a 100 ml de medio líquido A1 y se dejaron crecer por 15 días en agitación, a una temperatura de 30°C.

Para el inicio de las curvas de crecimiento y para poder iniciar con un inóculo de 2 ml de pellet bacteriano por cepa, se realizó el volumen empacado. Para ello, en un tubo Falcon de 15 ml se centrifugó cada cepa a 7830 rpm por 10 minutos (se repitió el paso hasta alcanzar el volumen necesario). Posteriormente, se pasó cada pellet de 2 ml a 100 ml de cada medio de cultivo, con 40 esferas de borosilicato (4 mm de diámetro) y se dejaron en agitación por 21 días a una temperatura de 30°C. Cada segundo día se tomó una alícuota de 1 ml para tomar una medición de volumen empacado en un tubo de centrífuga de 2 ml (graduados cada 0.01 ml), la alícuota se centrifugó por 10 minutos a 6000 rpm. Con los datos de las mediciones,

se generaron curvas de crecimiento con el programa Excel (versión 18.0) y se identificaron las fases de crecimiento. Identificando la fase exponencial de cada curva de crecimiento, se calcularon las constantes de crecimiento (1) y las tasas de duplicación (2) para cada cepa en los distintos medios de cultivo, de acuerdo a la siguientes fórmulas:

$$k = \frac{n}{t} \quad [1]$$

Donde:

k: constante de crecimiento

t: tiempo

n: número de generaciones

$$T = \frac{\ln 2}{k} \quad [2]$$

Donde:

k: constante de crecimiento

T: tiempo de duplicación

## 6. RESULTADOS

Los genomas utilizados en este estudio tienen un tamaño de genoma promedio de 9.19 Mb para las 2 cepas de *Actinomadura* sp. (LOL-011 y LOL-016) y de 6.7 Mb para las 2 cepas de *Micromonospora* sp. (LOL-025 y LOL-027). La cantidad de genes detectados para los genomas varió de 6050 genes en promedio para los genomas de *Micromonospora* sp. y 8630 genes en promedio para los genomas de *Actinomadura* sp. El contenido más bajo de G+C fue observado para el genoma de *Actinomadura* sp. LOL-011 con un 64% y el valor más alto de 72% para el genoma de *Micromonospora* sp. LOL-025 (Tabla I).

**Tabla I.** Características generales de los genomas de estudio.

Género	Cepa	Contigs	% GC	Genes	Bases
<i>Actinomadura</i> sp.	LOL-011	445	64	8638	9190506
	LOL-016	229	70	8621	9203882
<i>Micromonospora</i> sp.	LOL-025	169	72	6370	7225527
	LOL-027	164	69	5730	6177860

### 6.1 RUTAS METABÓLICAS PRIMARIAS

Entre los 4 genomas analizados, se identificaron un total de 62 rutas metabólicas primarias (Tabla II), de las cuales, 14 rutas son compartidas entre los genomas. Entre las rutas compartidas se observaron: degradación de metilsalicilato, degradación de L-glutamina I y degradación del glutatión (Fig. 1-A). A su vez, se obtuvo una sola ruta metabólica primaria compartida entre el genoma de *Actinomadura* sp. (LOL-016) y el genoma de *Micromonospora* sp. (LOL-025) que corresponde a la ruta de elongación de ácidos grasos – saturado (Fig. 1-A). Para los

genomas *Micromonospora* sp. (LOL-025; LOL-027) se observaron 33 rutas metabólicas primarias únicas (Tabla II), mientras que para los genomas *Actinomadura* sp. (LOL-011; LOL-016) se observaron 15 rutas metabólicas primarias únicas (Fig. 1-A) (Tabla II).

**Tabla II.** Rutas metabólicas primarias presentes en los genomas de *Actinomadura* sp. (LOL-011; LOL-016) y *Micromonospora* sp. (LOL-025- LOL-027). El color amarillo indica las rutas metabólicas primarias que comparten los géneros de *Micromonospora* y *Actinomadura*. El color azul indica las rutas metabólicas que son únicas para los genomas de *Actinomadura*. El color verde indica las rutas metabólicas únicas para los genomas de *Micromonospora*.

Rutas metabólicas primarias	Genoma
Biosíntesis de sirohema	<i>Actinomadura</i> sp. (LOL-011; LOL-016) y <i>Micromonospora</i> sp. (LOL-025; LOL-027)
Degradación de salicilato de metilo	
Metabolismo ppGpp	
Interconversión de metil indol-3-acetato	
Biosíntesis de UDP-alfa-D-glucuronato (a partir de UDP-glucosa)	
Recuperación de difosfato de tiamina III	
Poliglutamilación de folato	
Degradación de L-glutamina I	
Biosíntesis de tetrahidrofolato	
Biosíntesis de glutaminil-tRNA <sup>Gln</sup> mediante transamidación	
Degradación del glutatión (vía DUG - levadura)	<i>Actinomadura</i> sp. (LOL-011; LOL-016) y <i>Micromonospora</i> sp. (LOL-027)
Biosíntesis de 4-aminobenzoato	
Biosíntesis de oftalmato	<i>Actinomadura</i> sp. (LOL-016) y <i>Micromonospora</i> sp. (LOL-025)
Alargamiento de ácidos grasos saturados	
Conversión de acetato a acetyl-CoA	<i>Actinomadura</i> sp. (LOL-011; LOL-016)
Recuperación de adenosilcobinamida-PIB de cobinamida I	
Descarboxilación de 2-oxoglutarato a succinil-CoA	
Biosíntesis de L-alanina III	
Desoxirribonucleótidos de pirimidina biosíntesis de novo III	
Alcanosulfonato monooxigenasa de dos componentes	
Biosíntesis de L-leucina	
[2Fe-2S] Biosíntesis de grupos de hierro-azufre	
Biosíntesis de 4-hidroxi-4-metil-L-glutamato	
Degradación de taurina IV	
Biosíntesis de inosina-5-fosfato II	
Biosíntesis de aerobactina	
Biosíntesis de L-cisteína II (dependiente de ARNt)	
Biosíntesis de salicilato I	<i>Actinomadura</i> sp. (LOL-011)
Procesamiento de ARNt	

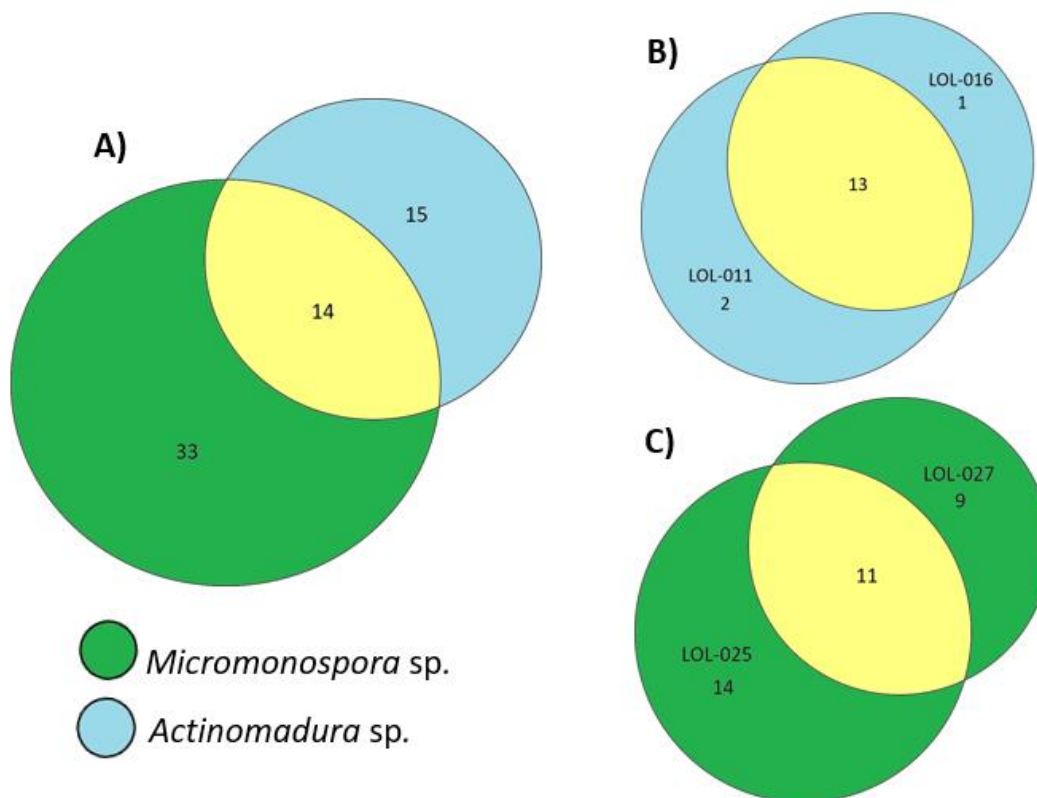


## Comparación metabólica de actinobacterias aisladas de sedimento marino de la Laguna Ojo de Liebre

Biosíntesis de L-tirosina I	
Degradación de quitina II (Vibrio)	
Biosíntesis de ubiquinol-8 (procariota)	
Ciclo de la urea	
Recuperación de hidroximetilpirimidina	
Degradación de beta-1,4-D-manosil-N-acetil-D-glucosamina	<i>Micromonospora</i> sp. (LOL-025; LOL-027)
Biosíntesis de L-arginina II (ciclo del acetilo)	
Degradación de D-manosa	
Degradación de la timina	
Biosíntesis de corismato a partir de 3-desidroquinato	
Degradación de uracilo I (reductivo)	
Biosíntesis de difosfato de tiamina III (Staphylococcus)	
Degradación de metilglicoxal I	
Degradación de etanol I	
Biosíntesis de L-cisteína I	
Beta-oxidación de oleato (dependiente de tioesterasa, levadura)	
Biosíntesis de difosfato de tiamina I (E. coli)	
Iniciación de la biosíntesis de ácidos grasos (mitocondrias)	<i>Micromonospora</i> sp. (LOL-025)
Biosíntesis de trans, trans-farnesil difosfato	
Biosíntesis de difosfato de tiamina II (Bacillus)	
Hidrólisis de acil-CoA	
Desfosforilación de UTP y CTP I	
Degradación de fucosa	
Biosíntesis de geranil difosfato	
Desacetilación de quitina	
Biosíntesis de UDP-alfa-D-galactosa	
Biosíntesis de L-treonina	
Degradación de alquilnitronatos	
Biosíntesis de L-asparagina I	<i>Micromonospora</i> sp. (LOL-027)
Biosíntesis del cofactor de guanil molibdeno	
Biosíntesis de flavina IV (mamíferos)	
Biosíntesis de L-asparagina II	
Degradación de carbazol	

Se realizó la comparación de rutas metabólicas primarias en cada género de actinobacterias. Para los genomas de *Actinomadura* sp. se obtuvieron un total de 16 rutas distintas, de las cuales se comparten 13 entre ambos genomas (Tabla II), por ejemplo: biosíntesis de L-alanina III, biosíntesis de L-leucina, biosíntesis de grupos de hierro y azufre, biosíntesis de 4-hidroxi-4-metil-L-glutamato, degradación de taurina IV y biosíntesis de aerobactina (Fig. 1-B). Además se observaron rutas metabólicas únicas para cada genoma, por ejemplo la ruta de elongación de ácidos grasos-saturado fue única en el genoma de *Actinomadura* sp. LOL-016, mientras que para el genoma de *Actinomadura* sp. LOL-011, sus rutas metabólicas primarias únicas fueron la biosíntesis de salicilato I y la ruta de procesamiento de ARNt (Fig. 1-B).

Con respecto a la comparación de las rutas metabólicas primarias de los genomas de *Micromonospora* sp., se obtuvieron 34 rutas metabólicas primarias distintas (Tabla II), de las cuales 11 se comparten entre genomas, por ejemplo: biosíntesis de L-tirosina I, degradación de quitina II, degradación de beta-1, biosíntesis de L-arginina II (ciclo del acetilo), degradación de D-manosa, degradación de la timina, degradación de uracilo I (reductivo) (Fig. 1-C). Además se observaron rutas metabólicas únicas para cada genoma, por ejemplo el genoma de *Micromonospora* sp. LOL-025 tuvo 14 rutas metabólicas primarias únicas, entre ellas: biosíntesis de difosfato de tiamina III, degradación de metilglioxal I, degradación de etanol I, biosíntesis de L-cisteína I, iniciación de la biosíntesis de ácidos grasos, degradación de fucosa y elongación de ácidos grasos – saturado (Fig. 1-C) (Tabla II). En comparación, el genoma de *Micromonospora* sp. LOL-027 tuvo 9 rutas metabólicas primarias únicas, entre ellas: la desacetilación de quitina, biosíntesis de L-treonina, biosíntesis de L-asparagina I, biosíntesis de flavina IV, biosíntesis de L-asparagina II, degradación de carbazol (Fig. 1-C) (Tabla II).



**Figura 1.** Número de rutas metabólicas primarias observadas en los genomas de *Actinomadura* sp. Y *Micromonospora* sp. **A)** Diagrama de Venn de la comparación del número de rutas metabólicas para los genomas *Actinomadura* sp. y *Micromonospora* sp. **B)** Diagrama de Venn de la comparación del número de rutas metabólicas de genomas de *Actinomadura* sp. **C)** Diagrama de Venn de la comparación del número de rutas metabólicas de genomas de *Micromonospora* sp.

Se realizó la comparación entre los genomas de las cepas tipo del género *Actinomadura* (*A. cremea* y *A. rifamycinii*) con las cepas *Actinomadura* sp. de la Laguna Ojo de Liebre (LOL-011; LOL-016). Se obtuvieron un total de 19 rutas metabólicas primarias distintas (Tabla III), de las cuales sólo se compartieron 6 entre

los distintos genomas, por ejemplo: la degradación del glutatión, biosíntesis de L-leucina, biosíntesis de L-cisteína II y degradación de salicilato de metilo (Fig. 2-A) (Tabla III). Para los genomas de las cepas tipo de *Actinomadura* se obtuvo sólo una ruta metabólica única que fue la degradación de nucleótidos de adenosina II. En comparación para los dos genomas de *Actinomadura* sp. (LOL-011; LOL-016) se observaron 12 rutas metabólicas primarias únicas, entre ellas la biosíntesis de salicilato I, biosíntesis de L-alanina III, biosíntesis de grupos de hierro-azufre, degradación de taurina IV y biosíntesis de inosina-5-fosfato II (Fig. 2-A) (Tabla III). Además, para conocer si la ruta de degradación de taurina se encontraba comúnmente en las cepas de *Actinomadura* sp., se hizo la comparación con 10 genomas tipo más cercanas del mismo género (*A. cremea*, *A. rifamycinii*, *A. latina*, *A. latina*, *A. meyeriae*, *A. macra*, *A. algeriensis*, *A. madurae*, *A. geliboluensis*, *Spirillospora albida*) y no se encontró presente la ruta de degradación de taurina IV (Tabla II).

**Tabla III.** Rutas metabólicas primarias presentes en los genomas de *Actinomadura* sp. (LOL-011; LOL-016), *Actinomadura cremea* y *Actinomadura rifamycini*. El color amarillo indica las rutas metabólicas primarias que comparten los genomas de *Actinomadura* (genomas de referencia y LOL-011, LOL-016). El color azul claro indica las rutas metabólicas que son únicas para los genomas de *Actinomadura* LOL-011 y LOL-016. El color azul oscuro indica las rutas metabólicas únicas para los genomas de referencia.

Rutas metabólicas primarias	Genoma
Degradación de salicilato de metilo	<i>Actinomadura</i> sp. (LOL-011; LOL-016) y <i>A. cremea</i>
Interconversión de metil indol-3-acetato	
Biosíntesis de L-leucina	
Degradación del glutatión (vía DUG - levadura)	<i>Actinomadura</i> sp. (LOL-011; LOL-016) y <i>A. rifamycini</i>
Recuperación de adenosilcobinamida-PIB de cobinamida I	
Biosíntesis de L-cisteína II (dependiente de ARNt)	
Biosíntesis de aerobactina	<i>Actinomadura</i> sp. (LOL-011; LOL-016)
Biosíntesis de 4-hidroxi-4-metil-L-glutamato	
Conversión de acetato a acetyl-CoA	
Descarboxilación de 2-oxoglutarato a succinil-CoA	
Biosíntesis de L-alanina III	
Desoxirribonucleótidos de pirimidina biosíntesis de novo III	
Alcanosulfonato monooxigenasa de dos componentes	
[2Fe-2S] biosíntesis de grupos de hierro-azufre	
Degradación de taurina IV	
Biosíntesis de inosina-5-fosfato II	
Biosíntesis de salicilato I	
Procesamiento de ARNt	
Degradación de nucleótidos de adenosina II	<i>Actinomadura cremea</i>

Respecto a la comparación de los genomas de las cepas tipo de *Micromonospora* (*M. echinofusca* y *M. pattaloongensis*) y los genomas de *Micromonospora* sp. de la Laguna Ojo de Liebre (LOL-025; LOL-027), se obtuvieron un total de 47 rutas metabólicas primarias distintas (Tabla IV). Los cuatro genomas compartieron 30 rutas, entre ellas la degradación de salicilato de metilo, biosíntesis de sirohema, degradación de L-glutamina I, biosíntesis de L-tirosina I, degradación de quitina II, biosíntesis de ubiquinol-8, ciclo de la urea, degradación de D-manosa,

degradación de uracilo I (reductivo), degradación de la timina, degradación de fucosa y desacetilación de quitina (Fig. 2-B) (Tabla IV). Los genomas de *Micromonospora* sp. (LOL-025; LOL-027) fueron las que presentaron más rutas metabólicas primarias únicas (12 rutas) en comparación con los genomas tipo (*M. echinofusca* y *M. pattaloongensis*) con 5 rutas metabólicas primarias únicas (Fig. 3-B).

**Tabla IV.** Rutas metabólicas primarias presentes en los genomas de *Micromonospora* sp. (LOL-025; LOL-027), *Micromonospora crechinofusca* y *Micromonospora pattaloongensis*. El color amarillo indica las rutas metabólicas primarias que comparten los genomas de *Micromonospora* (genomas de referencia y LOL-025, LOL-027). El color verde claro indica las rutas metabólicas que son únicas para los genomas de *Micromonospora* LOL-025 y LOL-027. El color verde oscuro indica las rutas metabólicas únicas para los genomas de referencia.

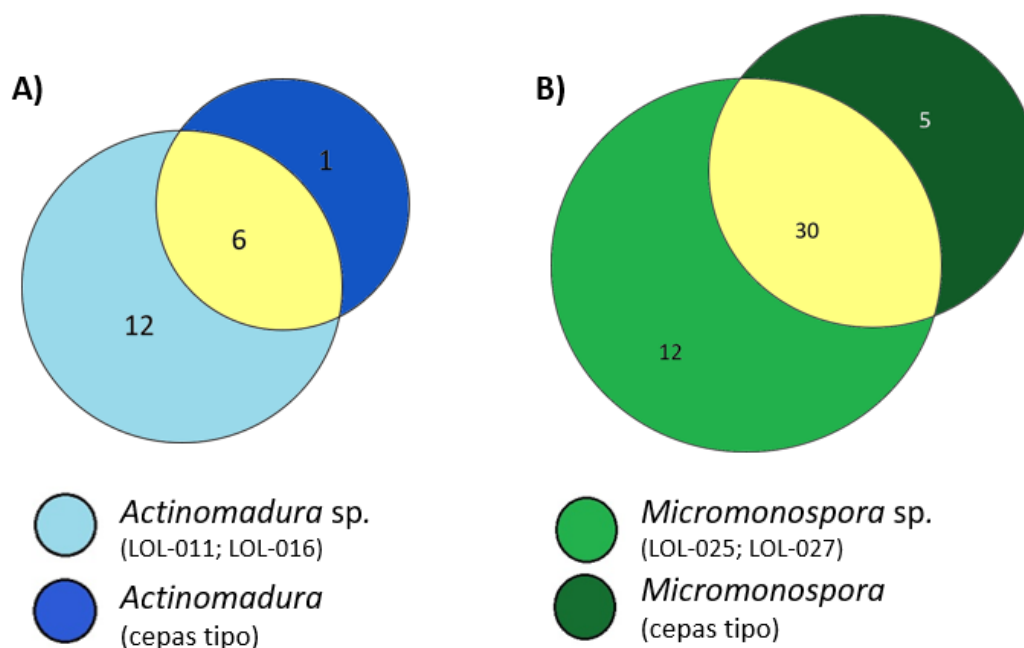
Rutas metabólicas primarias	Genoma
Degradación de salicilato de metilo	
Interconversión de metil indol-3-acetato	
Biosíntesis de sirohema	
Poliglutamilación de folato	
Degradación de L-glutamina I	
Biosíntesis de tetrahidrofolato	
Biosíntesis de L-tirosina I	
Degradación de quitina II ( <i>Vibrio</i> )	<i>Micromonospora</i> sp. (LOL-025; LOL-027), <i>M. echinofusca</i> y <i>M. pattaloongensis</i>
Biosíntesis de ubiquinol-8 (procariota)	
Ciclo de la urea	
Recuperación de hidroximetilpirimidina	
Degradación de beta-1,4-D-manosil-N-acetil-D-glucosamina	
Biosíntesis de L-arginina II (ciclo del acetilo)	
Degradación de D-manosa	
Biosíntesis de corismato a partir de 3-deshidroquinato	
Degradación de uracilo I (reductivo)	
Degradación de la timina	<i>Micromonospora</i> sp. (LOL-025; LOL-027) y <i>M. echinofusca</i>
Biosíntesis de UDP-alfa-D-glucuronato (a partir de UDP-glucosa)	
Biosíntesis de glutaminil-tRNA <sup>l</sup> n mediante transamidación	<i>Micromonospora</i> sp. (LOL-025), <i>M. echinofusca</i> y <i>M. pattaloongensis</i>
Biosíntesis del cofactor de guanilil molibdeno	<i>Micromonospora</i> sp. (LOL-027), <i>M. echinofusca</i> y <i>M. pattaloongensis</i>
Degradación de metilgloxal I	
Beta-oxidación de oleato (dependiente de tioesterasa, levadura)	
Hidrólisis de acil-CoA	<i>Micromonospora</i> sp. (LOL-025) y <i>M. echinofusca</i>
Desfosforilación de UTP y CTP I	
Degradación de fucosa	
Biosíntesis de difosfato de tiamina I ( <i>E. coli</i> )	<i>Micromonospora</i> sp. (LOL-025) y <i>M. pattaloongensis</i>
Biosíntesis de difosfato de tiamina II ( <i>Bacillus</i> )	
Degradación del glutatión (vía DUG - levadura)	
Desacetilación de quitina	<i>Micromonospora</i> sp. (LOL-027) y <i>M. pattaloongensis</i>
Biosíntesis de flavina IV (mamíferos)	

Degradación de etanol I	
Biosíntesis de L-cisteína I	
Iniciación de la biosíntesis de ácidos grasos (mitocondrias)	
Biosíntesis de trans, trans-farnesil difosfato	<i>Micromonospora</i> sp. (LOL-025)
Biosíntesis de difosfato de tiamina III ( <i>Staphylococcus</i> )	
Biosíntesis de geranil difosfato	
Biosíntesis de UDP-alfa-D-galactosa	
Biosíntesis de L-treonina	
Degradación de alquilnitronatos	<i>Micromonospora</i> sp. (LOL-027)
Biosíntesis de L-asparagina I	
Biosíntesis de L-asparagina II	
Degradación de carbazol	
Biosíntesis de aerobactina	
Biosíntesis de 4-hidroxi-4-metil-L-glutamato	<i>M. pattaloongensis</i>
Recuperación de adenosilcobalamina a partir de cobalamina	
Biosíntesis de histamina	<i>M. echinofusca</i>
Degradación de protocatechuato II (ruta de escisión orto)	<i>M. echinofusca</i> y <i>M. pattaloongensis</i>

Con el análisis de los genomas de estudio de *Micromonospora* sp. (LOL-025; LOL-027) se observaron un total de 12 rutas metabólicas primarias únicas, que incluyen el metabolismo ppGpp, biosíntesis de oftalmato, degradación de etanol I, biosíntesis de L-cisteína I, iniciación de la biosíntesis de ácidos grasos, biosíntesis de L-treonina, degradación de alquilnitronatos, biosíntesis de L-asparagina I, biosíntesis de L-asparagina II, degradación de carbazol, biosíntesis de difosfato de tiamina III, biosíntesis de geranil difosfato y alargamiento de ácidos grasos saturados, por mencionar algunas (Fig. 2-B) (Tabla IV). Los genomas de las cepas tipo *Micromonospora* solamente tuvieron 5 rutas metabólicas primarias únicas, entre ellas la degradación de protocatechuato II (ruta de escisión orto), biosíntesis de histamina, recuperación de adenosilcobalamina a partir de cobalamina, biosíntesis de aerobactina y biosíntesis de 4-hidroxi-4-metil-L-glutamato (Fig. 2-B) (Tabla IV).

Además, para conocer si la ruta de degradación de quitina se encontraba comúnmente en las cepas de *Micromonospora* sp., se realizó la comparación de 10 genomas tipo más cercanos (*M. pisi*, *M. polyrhachis*, *M. pattaloongensis*, *M.*

*sediminimaris*, *M. phaseoli*, *M. echinofusca*, *M. echinaurantiaca*, *M. deserti*, *M. citrea*, *M. peucetia*) a *Micromonospora* sp. (LOL-025; LOL-027). Sólo en los genomas de *M. echinofusca* y *M. pattaloongensis* se identificó la ruta de degradación de quitina II (*Vibrio*) (Tabla IV).

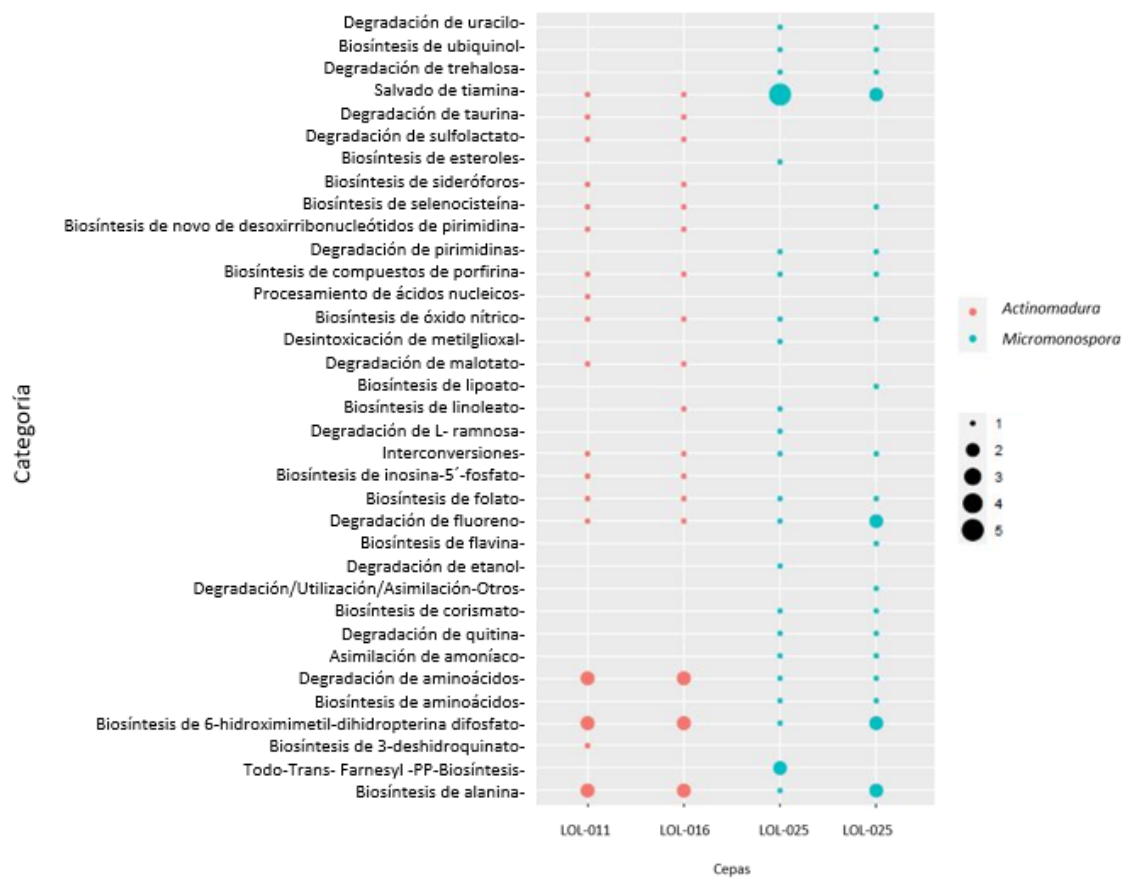


**Figura 2.** Rutas metabólicas primarias entre genomas *Actinomadura* sp. (LOL-011; LOL-016), *Micromonospora* sp. (LOL-025; LOL-027) y cepas tipo *A. rifamycini*, *A. crema*, *M. pattaloongensis* y *M. echinofusca*. **A)** *Actinomadura* tipo y *Actinomadura* sp. (LOL-011; LOL-016). **B)** *Micromonospora* tipo y *Micromonospora* sp. (LOL-025; LOL-027).

Las rutas metabólicas observadas en los genomas se agruparon de manera inicial en las categorías de síntesis y degradación, en total se observaron 35 rutas (56% del total de rutas identificadas) metabólicas dentro de esta clasificación síntesis



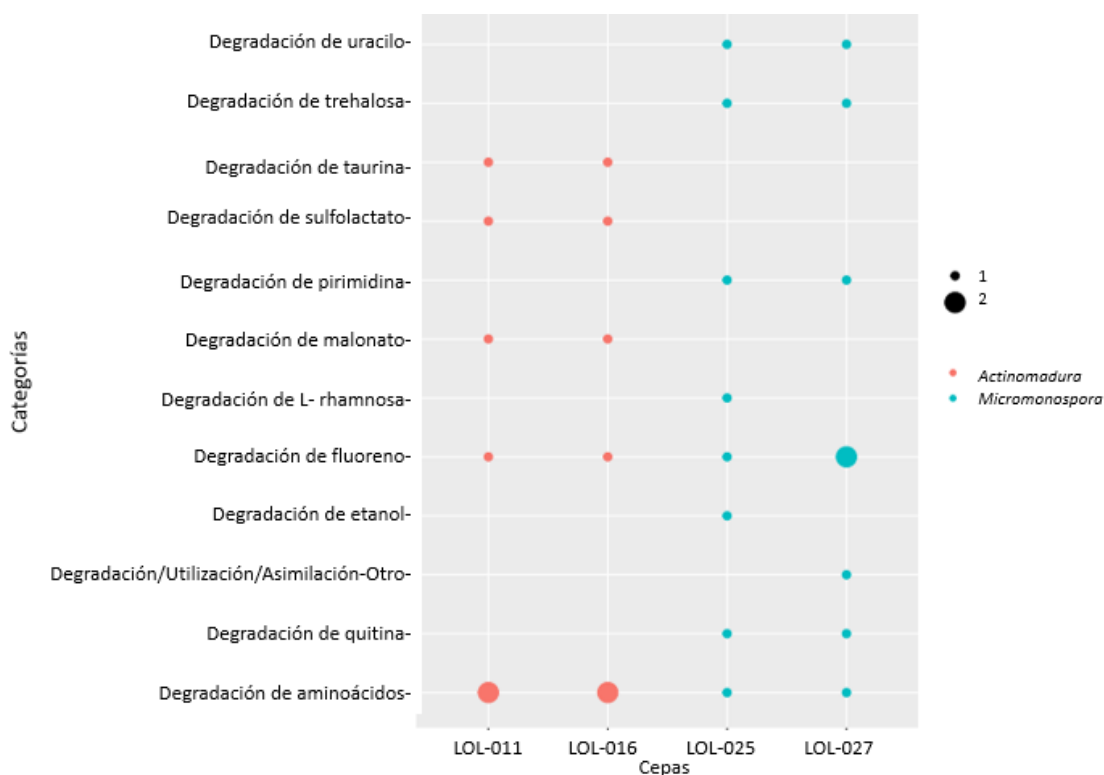
y degradación (Fig. 5). Para los genomas de *Micromonospora* sp., se encontraron 14 rutas únicas dentro de esta clasificación, entre ellas la degradación de uracilo, biosíntesis de ubiquinol, degradación de trehalosa, biosíntesis de sideróforos, degradación de pirimidinas, degradación de ramnosa, degradación de quitina, asimilación de amoníaco y degradación de aminoácidos (Fig. 3). Para los genomas de *Actinomadura* sp. obtuvieron 8 categorías únicas dentro de esta clasificación, entre ellas la biosíntesis de malotato, biosíntesis de folato y procesamiento de ácidos nucleicos (Fig. 3). Entre los genomas de *Actinomadura* sp. y los dos de *Micromonospora* sp. compartieron 9 rutas metabólicas dentro de la clasificación de biosíntesis y degradación (Fig. 3).



**Figura 3.** Diversidad y abundancia de categorías de rutas metabólicas primarias presentes en cada genoma (*Actinomadura* sp. y *Micromonospora* sp.).

Debido al interés de utilizar la información de metabolismo primario para la formulación de medios de cultivo que promovieran el crecimiento de las actinobacterias, se identificaron principalmente las rutas de degradación de fuentes alternativas de carbono y nitrógeno. Se observaron 12 rutas de degradación distintas, entre ellas la degradación de taurina, degradación de quitina, degradación de pirimidina, degradación de etanol y degradación de aminoácidos (Fig. 4). Los genomas de *Actinomadura* sp. (LOL-011; LOL-016) presentaron 3 rutas de

degradación únicas para su género y los genomas de *Micromonospora* sp (LOL-025; LOL-027) 7 rutas de degradación únicas para su género (Fig. 4). Entre los cuatro genomas se compartieron las rutas de degradación de fluoreno y degradación de aminoácidos. En particular, el genoma de *Micromonospora* LOL-027 presentó dos rutas asociadas a la degradación de fluoreno a diferencia de los demás genomas y los dos genomas de *Actinomadura* (LOL-011 y LOL-016) presentaron 2 rutas de degradación de aminoácidos a diferencia de los dos genomas de *Micromonospora* (LOL-025 y LOL-027).

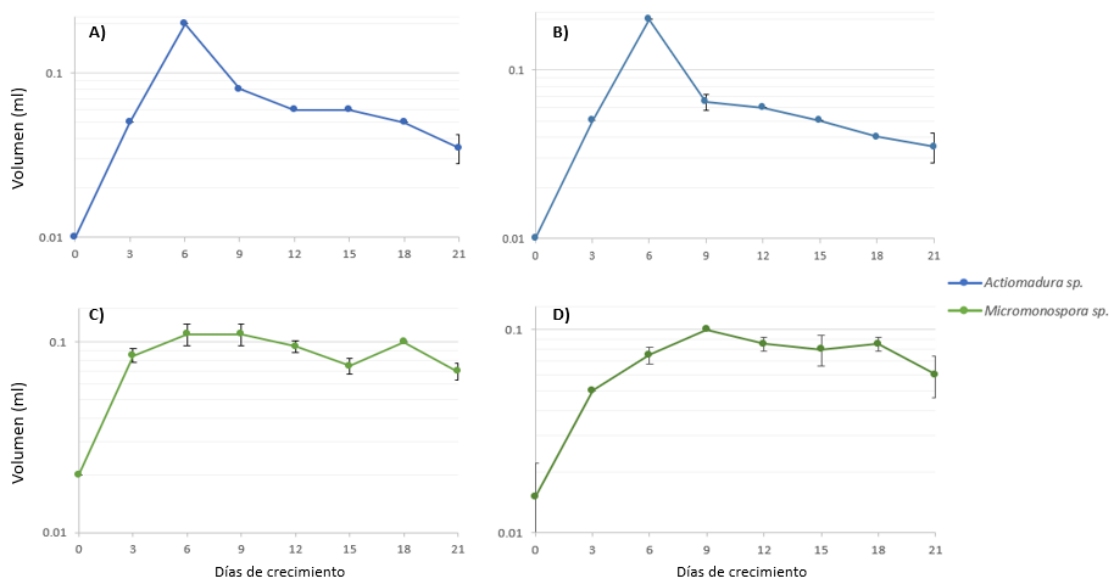


**Figura 4.** Diagrama de puntos de las categorías de degradación de las rutas metabólicas primarias de los genomas *Actinomadura* y *Micromonospora*. El tamaño de los puntos indica la cantidad de rutas que se observaron por genoma.

## 6.2 CURVAS DE CRECIMIENTO

Se realizaron curvas de crecimiento por 21 días en el medio control A1 para las cepas de *Actinomadura* sp. (LOL-011; LOL-016) y las cepas de *Micromonospora* sp. (LOL-025; LOL-027) (Fig. 5). Se observó el máximo de la fase exponencial en las cepas *Actinomadura* sp. (LOL-011; LOL-016) al sexto día, posterior al cual se observa la fase estacionaria, y la fase de muerte iniciando al doceavo día (Fig. 5-A, 5-B). Para la cepa *Micromonospora* sp. (LOL-025), su fase exponencial se observó desde inicio del periodo de incubación hasta el tercer día, su fase estacionaria inició el sexto día y la fase de muerte después del noveno día (Fig. 5-C). Para la cepa de *Micromonospora* sp. (LOL-027), su fase exponencial se observó desde el inicio de periodo de incubación hasta al tercer día, iniciando una fase estacionaria al noveno día y una fase de muerte después del día 18 de crecimiento. (Fig. 5-D). En dichas curvas de crecimiento no fue posible observar la fase lag, fue por ello se decidió tomar mediciones cada 2 días para los posteriores análisis de crecimiento con los demás medios de cultivo.

Tomando en consideración la fase exponencial de las cuatro cepas, fue posible calcular una constante de crecimiento, la cual fue en promedio de 0.4 (Tabla V). Ambas cepas de *Actinomadura* sp. tuvieron la misma constante de crecimiento (0.4993) y para las cepas de *Micromonospora* sp., la cepa LOL-027 obtuvo la menor constante de crecimiento (0.4013) (Tabla V).



**Figura 5.** Curvas de crecimiento en el medio control A1. **A)** *Actinomadura* sp. LOL-011. **B)** *Actinomadura* sp. LOL-016. **C)** *Micromonospora* sp. LOL-025. **D)** *Micromonospora* sp. LOL-027.

**Tabla V.** Valores de constante de crecimiento para las cepas *Actinomadura* sp. (LOL-011; LOL-016) y *Micromonospora* sp (LOL-025; LOL-027) calculadas a partir de la fase exponencial.

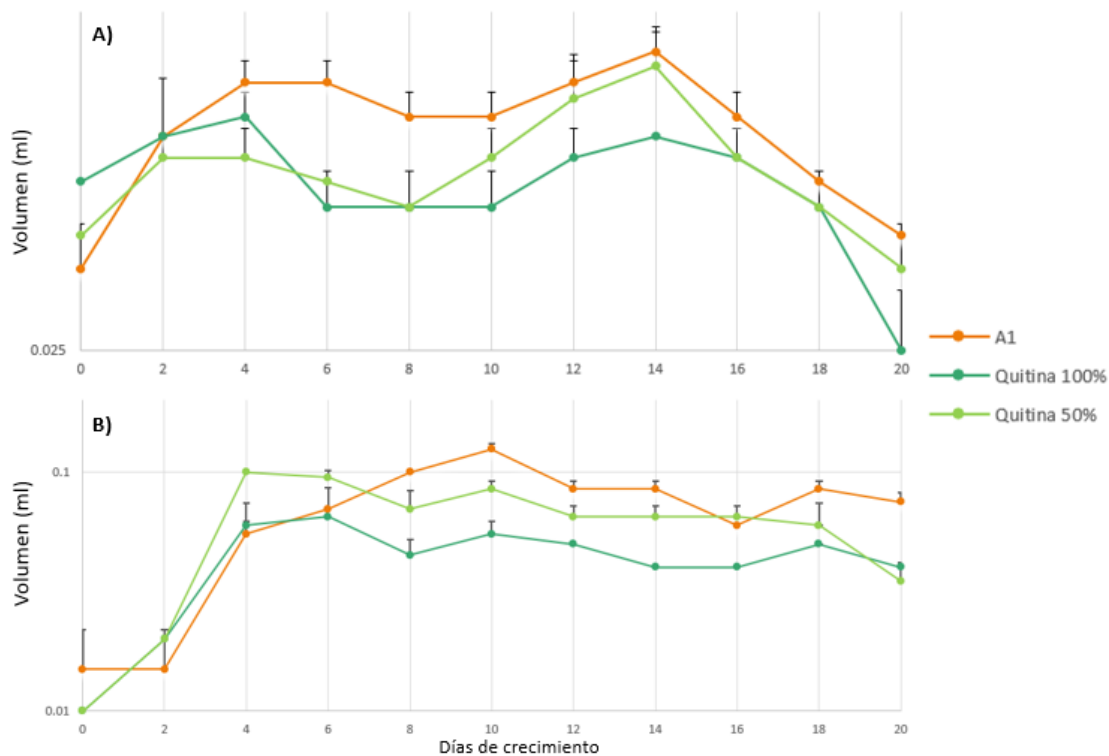
Medio	CEPAS	Constante de crecimiento (K)
A1	<i>Actinomadura</i> sp. LOL-011	0.4993
	<i>Actinomadura</i> sp. LOL-016	0.4993
	<i>Micromonospora</i> sp. LOL-025	0.4823
	<i>Micromonospora</i> sp. LOL-027	0.4013

Con base en las observaciones de metabolismo primario de las cepas de *Micromonospora* sp. (LOL-25 y LOL-27), se identificó la ruta de degradación de

quitina como una opción para reemplazar la fuente de carbono del medio control A1 (almidón). Ambas cepas de *Micromonospora* sp., se crecieron en tres medios de cultivo: medio control A1, quitina 100% y quitina 50% para comparar su crecimiento (Fig. 6). Para la cepa *Micromonospora* LOL-025 se observó una tendencia de crecimiento similar en los tres medios de cultivo. A pesar de no observar una fase exponencial muy marcada en los primeros días, se observa una tendencia a disminuir su crecimiento al cuarto día e iniciar de nuevo un ligero crecimiento al décimo día (Fig. 6-A). Posteriormente, se observa una fase de muerte a partir del día catorce. A pesar de no observar una fase exponencial marcada, se calculó la constante de crecimiento entre el día 0 y el día 2, en donde en el medio A1 se observó la mayor constante de crecimiento (0.2695), a diferencia de la cepa creciendo en el medio de 100% quitina (0.0912) (Tabla VI).

En comparación, en la curva de crecimiento de la cepa *Micromonospora* sp. LOL-027 sí se identificaron todas las fases de crecimiento. Iniciando con una fase de adaptación (lag) en los primeros dos días, para iniciar su fase exponencial con su máximo en el cuarto día. Después del cuarto día se observó una fase estacionaria larga en donde se llega a observar una fase de muerte después del día 18. (Fig. 6-B). Calculando los valores de constante de crecimiento, se puede observar que en la cepa *Micromonospora* sp. LOL-027, la mayor constante se observó en el medio de 50% quitina (0.8047) a diferencia de la menor constante a 100% quitina (0.5493) (Tabla VI). En relación a la cepa *Micromonospora* sp. LOL-025, en el medio control

A1, se obtuvo un valor mayor en la constante de crecimiento (0.2695) que en comparación de los medios con quitina (Tabla VI).



**Figura 6.** Curvas de crecimiento para las cepas pertenecientes al género *Micromonospora*. **A)** Ceba *Micromonospora* sp. LOL-025. **B)** Ceba *Micromonospora* sp. LOL-027.

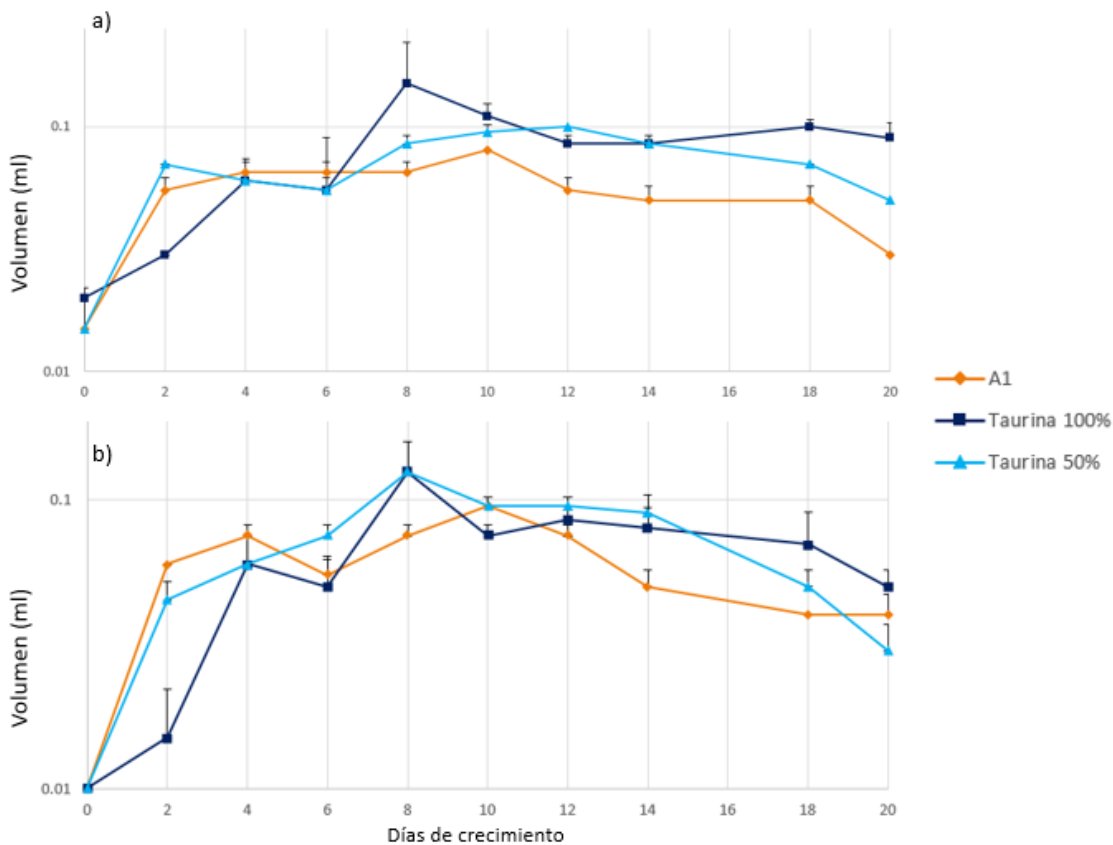
**Tabla VI.** Valores de constante de crecimiento para las cepas *Micromonospora* sp. (LOL-025; LOL-027).

CEPA	MEDIO	CONSTANTE DE CRECIMIENTO (K)
	A1	0.2695
<i>Micromonospora</i> sp. LOL-025	Quitina 100%	0.0912
	Quitina 50%	0.1592
	A1	0.6496
<i>Micromonospora</i> sp. LOL-027	Quitina 100%	0.5493
	Quitina 50%	0.8047

Con base en las observaciones de metabolismo primario de las cepas de *Actinomadura* sp. (LOL-11 y LOL-16), se identificó la ruta de degradación de taurina IV como una opción para reemplazar la fuente de nitrógeno del medio control A1 (peptona). Ambas cepas de *Actinomadura* sp., se crecieron en tres medios de cultivo: medio control A1, taurina 100% y taurina 50% para comparar su crecimiento (Fig. 7). Para la cepa *Actinomadura* sp. LOL-011 se observó una tendencia de crecimiento similar entre los medios A1 y taurina 50%, a diferencia del medio taurina 100% en el que se observó un mayor volumen celular al octavo día de crecimiento (Fig. 7-A). En el medio de taurina 100% se observó la fase exponencial en los primeros 2 días, en comparación con el medio taurina 50% donde al segundo día alcanzó el máximo de la fase exponencial (Fig. 7-A). Además, se observa que con los medios de taurina, las cepas inician un ligero crecimiento en el octavo día (Fig. 7-A). Posteriormente, se observó una fase de muerte a partir del día doce en los medios A1 y taurina 50%, a diferencia con el medio taurina 100%, donde se observó la fase de muerte hasta el día dieciocho. A pesar de observar las diferencias en las fases exponenciales en los distintos medios, se calculó la constante de crecimiento entre el día 0 y el día 2 para



los medios 50% taurina y A1, y para el medio 100% taurina del día 2 al día 4 (Tabla VII). Se obtuvo una mayor constante de crecimiento (*Actinomadura* sp. LOL-011 con 0.7702 y *Actinomadura* sp. LOL-016 con 0.7520) en el medio taurina 50%, a diferencia de la cepa creciendo en el medio taurina 100% (*Actinomadura* sp. LOL-011 con 0.3466 y *Actinomadura* sp. LOL-016 con 0.6931) (Tabla VIII). A diferencia de la cepa *Actinomadura* LOL-011, en la curva de crecimiento de la cepa *Actinomadura* LOL-016 se observó una tendencia de crecimiento similar en los tres medios de cultivo (Fig. 7-B). De la misma manera que la cepa *Actinomadura* LOL-011, la fase exponencial en las cepas creciendo en los medios A1 y taurina 50%, inició con su máximo en el segundo día, mientras que en el medio taurina 100% en el cuarto día. En los medios de taurina (50% y 100%) se observó un ligero crecimiento con un segundo máximo de volumen, a diferencia del medio A1 donde su segundo máximo se alcanzó al décimo día (Fig. 7-B). Después del día doce inicia su fase de muerte en los tres medios de cultivo (Fig. 7-B). Las constantes de crecimiento para cada medio se calcularon y el medio A1 obtuvo la mayor constante de crecimiento (0.6460), a diferencia de la cepa creciendo en el medio taurina 100% (0.3466) (Tabla VIII).



**Figura 7.** Curvas de crecimiento para las cepas pertenecientes al género *Actinomadura* en medio control A1, 50% taurina y 100% taurina. **A)** Curvas de crecimiento para la cepa *Actinomadura* sp. LOL-011. **B)** Curvas de crecimiento para la cepa *Actinomadura* sp. LOL-016.

**Tabla VII.** Constantes de crecimiento para las cepas *Actinomadura* sp. (LOL-011; LOL-016).

CEPA	MEDIO	CONSTANTE DE CRECIMIENTO (K)
<i>Actinomadudra</i> sp. LOL-011	A1	0.6460
	Taruina 100%	0.3466
	Taurina 50%	0.7702
<i>Actinomadudra</i> sp. LOL-016	A1	0.8959
	Taruina 100%	0.6931
	Taurina 50%	0.7520

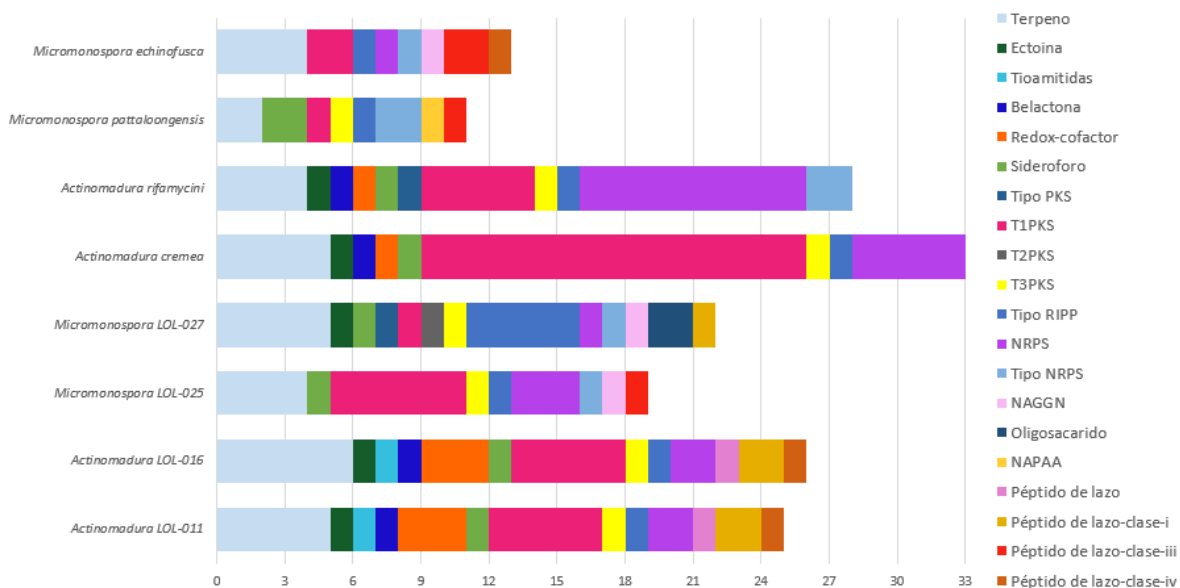
### 6.3 ANÁLISIS METABOLISMO SECUNDARIO

Un total de 223 grupos de genes biosintéticos (BGC) fueron identificados mediante el programa antiSMASH analizando los 4 genomas de estudio y los genomas de las cepas tipo más cercanas. Se analizó la abundancia y diversidad de BGCs asociados a las rutas de síntesis de metabolitos secundarios presentes en los genomas de *Actinomadura* sp. (LOL-011; LOL-016), *A. cremea*, *A. rifamycini*, *Micromonospora* sp. (LOL-025; LOL-027), *M. echinofusca*, *M. pattaloongensis* (Fig. 8). En general, para todos los genomas analizados se encontraron tres categorías de genes relacionados con terpenos, T1PKS y RIPP-like. En particular, para los genomas de *Actinomadura* sp. (LOL-011; LOL-016) se observaron 14 categorías de genes compartidas que representan 30 y 31 BGC, respectivamente. La única diferencia entre los BGCs de ambos genomas es que el genoma de *Actinomadura* LOL-016 contiene un BGC más en la categoría terpeno (Fig. 8). Comparando los genomas de *Actinomadura* con los genomas de las cepas tipo, se observó que éstos tienen una mayor cantidad de BGCs, con 32 BGCs para *A. rifamycini* y 38 BGCs para *A. cremea* (Fig. 9). En particular, el genoma de *A. cremea* contiene una mayor cantidad de BGC de la categoría de PKS tipo I y el genoma de *A. rifamycini* contiene

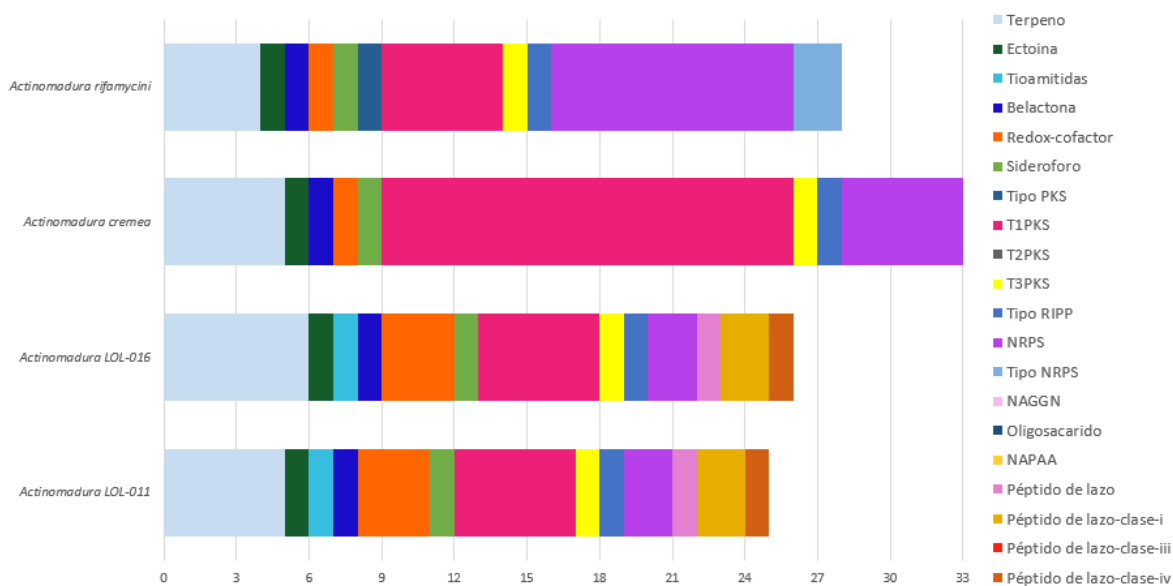
una mayor cantidad de BGC relacionados a NRPS comparados con los genomas de estudio. En comparación, los genomas de *Actinomadura* LOL-011 y LOL-016 presentan BGC relacionados a Thiamitides, Lassozeptides y Lantipeptides que no fueron observados en los genomas de las cepas tipo (Fig. 9).

Con respecto a los genomas de *Micromonospora* sp. LOL-025 y LOL-027 se observó una mayor cantidad de BGCs (30 y 27, respectivamente) asociados con al menos 10 categorías distintas en comparación con los genomas de las cepas tipo más cercanas (Fig. 8). En particular, el genoma de *Micromonospora* LOL-025 tuvo una mayor cantidad de BGC relacionados con PKS tipo 1, a diferencia de los demás genomas (Fig. 10). El genoma de *Micromonospora* LOL-027 presentó BGC relacionados con oligosacáridos que no se observaron en los demás genomas (Fig. 10). Cabe mencionar que el genoma de la cepa tipo de *Micromonospora pattaloengensis* presentó la menor cantidad de BGC con solo 11, representando 8 diferentes categorías (Fig. 10).

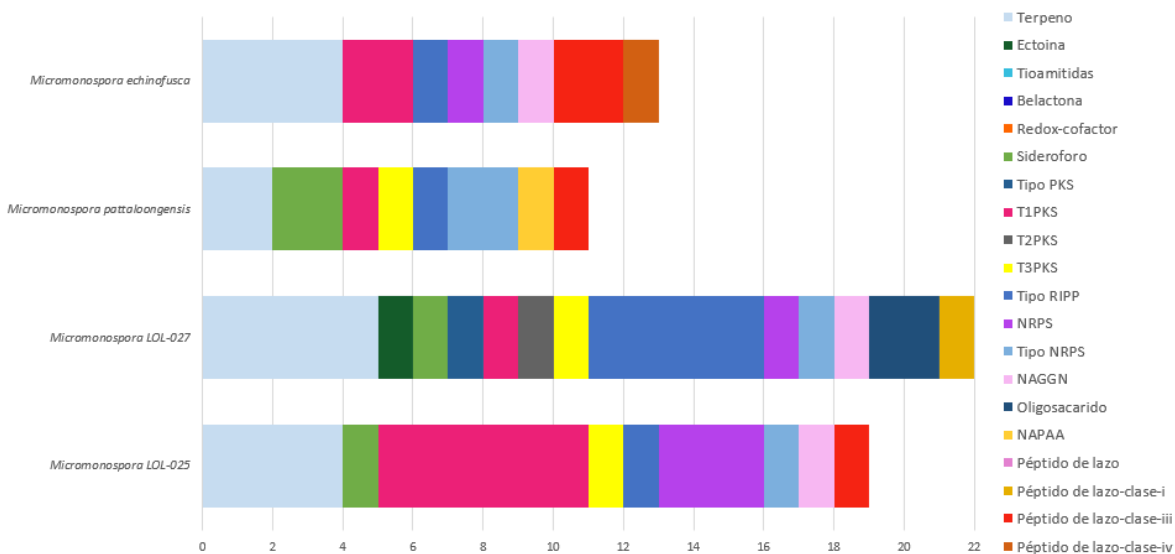
Comparación metabólica de actinobacterias aisladas de sedimento marino de la Laguna Ojo de Liebre



**Figura 8.** Grupos de genes biosintéticos encontrados en los genomas de *Actinomadura* sp. (LOL-011; LOL-016), *A. cremea*, *A. rifamycini*, *Micromonospora* sp. (LOL-025; LOL-027), *M. echinofusca*, *M. pattaloongensis* utilizando antiSMASH 6.



**Figura 9.** Grupos de genes biosintéticos encontrados en los genomas de *Actinomadura* sp. (LOL-011; LOL-016), *A. cremea*, *A. rifamycini*.



**Figura 10.** Grupos de genes biosintéticos encontrados en los genomas de *Micromonospora* sp. (LOL-025; LOL-027), *M. echinofusca*, *M. pattaloongensis* utilizando antiSMASH 6.

De acuerdo al análisis de similitud (> 50%) de los BGCs identificados en los genomas de estudio con reportados en las bases de datos, se observó que todos los genomas del género *Actinomadura* presentaron el BGC relacionado a la producción de Ectoína (100% similitud) y otro con la producción de Venezuelin (50% similitud) (Tabla VIII). De manera similar, los genomas de *Actinomadura* sp. (LOL-011; LOL-016) compartieron un 100% de similitud con el genoma de *A. cremea* para la producción de Maduropeptin. Para todos los genomas de *Micromonospora* se encontró un BGC con un 71% de similitud relacionado con la producción Alquil-O-dihidrogeranil-metoxihidroquinona, a diferencia del BGC Lantipéptido-clase-iii (SapB) (con 50% de similitud), sólo se observó en el genoma de *Micromonospora* LOL-025 junto con los genomas de referencia (Tabla VIII). Se observó que los genomas de estudio *Micromonospora* LOL-025 y LOL-025 comparten el BGC relacionado con Desferrioxamine E con un 100 y 75% de similitud, respectivamente. Además, se encontraron BGC únicos para el genoma de *Micromonospora* sp. LOL-027, uno relacionado con la producción de SGR PTMs (83% similitud) y otro con la producción de Macrotermycins (57% similitud). Para la cepa *Micromonospora* sp. LOL-025, solamente se encontró un BGC relacionado con la producción de Livipeptin con el 100% de similitud (Tabla VIII).

**Tabla VIII.** Productos de los BGC encontrados en cada cepa de *Actinomadura* sp. (LOL-011; LOL-016), *A. cremea*, *A. rifamycini*, *Micromonospora* sp. (LOL-025; LOL-027), *M. echinofusca*, *M. pattaloongensis*.

Cepa	Metabolito	% similitud
LOL-011		100
LOL-016		100
<i>A. cremea</i>	Ectoina	100
<i>A. rifamycini</i>		100
LOL-011		50
LOL-016		50
<i>A. cremea</i>	Venezuelin	50
<i>A. rifamycini</i>		50
LOL-011		100
LOL-016		100
<i>A. cremea</i>	Maduropeptin	100
LOL-025		71
LOL-027		71
<i>M. pattaloongensis</i>	alkyl-O-dihydrogeranyl-methoxyhydroquinones	71
<i>M. echinofusca</i>		71
LOL-025		50
<i>M. pattaloongensis</i>	SapB	100
<i>M. echinofusca</i>		100
LOL-025		100
LOL-027	Desferrioxamine E	75
LOL-025		100
LOL-027	Livipeptin	100
LOL-027	SGR PTMs	83
LOL-027	Macrotermycins	57



## 7. DISCUSIÓN

Análisis genómicos de cepas de actinobacterias han revelado una gran cantidad de rutas metabólicas asociadas a la producción de metabolitos secundarios (Ziemert *et al.*, 2014; Carro *et al.*, 2018; Lee *et al.*, 2020) y se ha reconocido que no todas las rutas son expresadas en condiciones convencionales de laboratorio (Abdelmohsen *et al.*, 2015). Por esta razón, en esta tesis se analizó y comparó el metabolismo primario y secundario de cuatro genomas de actinobacterias con la finalidad de modificar los medios de cultivo estándar, y que esto posteriormente pudiera resultar en la expresión de diferentes rutas metabólicas del metabolismo secundario.

Estudios previos han demostrado que añadir componentes celulares, en particular biopolímeros derivados de la pared celular, a medios de cultivo tienen un efecto en la producción de antibióticos de varias cepas de actinobacterias. Por ejemplo, se ha observado que *Streptomyces coelicolor* en condiciones bajas de nutrientes con la adición de monómeros de quitina (N-acetilglucosamine GlcNAc) produce el antibiótico actinorhodin (Rigali *et al.*, 2008). La quitina es un compuesto orgánico natural que está constituido por monómeros de N-acetil-D-glucosamina y que está presente en una gran cantidad de organismos como las conchas de moluscos, crustáceos, exoesqueletos de artrópodos y pared celular de hongos (Nett, *et al.*, 2009). Por lo que en el medio ambiente puede resultar en una fuente de carbono y nitrógeno para los microorganismos (Nielsen y Sorensen, 1999). Se ha

demostrado que algunas bacterias del ambiente marino tienen la capacidad de degradar quitina, entre ellas el género *Streptomyces* (Han *et al.*, 2009), *Alteromonas* (Tsujibo *et al.*, 1993; Orikoshi *et al.*, 2005), *Microbulbifer* (Howard *et al.*, 2003), *Moritella* (Stefanidi y Vorgias 2008), *Salinivibrio* (Aunpad y Panbangred 2003) y *Vibrio* (Suginta, 2007; Hirono *et al.*, 1998; Colwell, 1970; Li y Roseman 2004; Meibom *et al.*, 2004; Keyhani y Roseman 1999; Bassler *et al.*, 1991; Svitil *et al.*, 1997; Itoi *et al.*, 2007; Wortman *et al.*, 1986; Somerville y Colwell 1993). En particular, estudios han demostrado que actinobacterias como *Streptomyces rimosus* presentan enzimas quitinolíticas con actividad antifungal contra cepas fitopatógenas del género *Alternaria* sp. y *Fusarium* sp. (Brzezinska *et al.*, 2013).

Los análisis genómicos de metabolismo primario de las cepas de *Micromonospora* sp. LOL-025 y LOL-027 demostraron la presencia de genes de degradación de quitina (Fig. 4). En particular la cepa de *Micromonospora* sp. LOL-027 tuvo una constante de crecimiento mayor al agregar 50% de quitina al medio de cultivo a diferencia del medio control A1 que tenía 100% almidón (Tabla VI, Fig. 6). Cabe mencionar que una de las principales actividades de la Laguna Ojo de Liebre es la acuacultura de moluscos ([simec.conanp.gob.mx](http://simec.conanp.gob.mx)) y se ha estimado que las ballenas grises que llegan cada año consumen anfípodos presentes en el sedimento (Caraveo-Patiño y Soto, 2005) lo cual nos indica la presencia de gran cantidad de residuos de quitina disponible para los microorganismos que habitan el bentos. Cabe mencionar que el género de *Micromonospora* sp. fue aislado en todas las estaciones del muestreo de la Laguna Ojo de Liebre en 2017 y 2018, a diferencia del género

*Actinomadura* sp. que solo fue recuperado de dos estaciones en la parte más cercana a la boca (Zamora *et al.*, 2022). Las cepas de *Actinomadura* sp. (LOL-011 y LOL-016) analizadas en este estudio no presentaron la presencia de genes de degradación de quitina en el análisis de metabolismo primario.

Se ha demostrado que la quitina induce la producción de compuestos de tipo antibiótico, lo cual pudiera ser útil para competencia efectiva de los microorganismos que habitan dicho nicho, en este caso las cepas de *Micromonospora* sp. que habitan la Laguna Ojo de Liebre. A pesar de observar una diferencia de crecimiento con la adición de quitina al medio de cultivo con las cepas de *Micromonospora* sp. (LOL-025 y LOL-027), no fue posible realizar extracciones químicas de los productos químicos producidos, por lo que se recomienda realizar dichos análisis para observar si existe una diferencia en la producción de metabolitos. Este tipo de análisis nos daría evidencia de lo que se ha observado en otras bacterias, en donde la adición de quitina a los medios de cultivo ha estimulado la producción de los antibióticos geldanamicina en *Streptomyces melanosporofaciens*, y de andrimid en *Vibrio coralliilyticus* (Clermont *et al.*, 2010; Wietz *et al.*, 2011). Cabe destacar que medios de cultivo sólido con exoesqueleto de camarón (principalmente quitina y quitosano) también ha inducido la producción de compuestos bioactivos en cepas de *Pseudonocardia carboxydivorans* inhibiendo cepas patógenas de *Staphylococcus aureus* (Setiawan *et al.*, 2021).

Análisis genómicos de metabolismo secundario en cepas de *Micromonospora* han demostrado la presencia de genes para la expresión de antibióticos, degradación de quitina y sideróforos; compuestos que pudieran contribuir a la defensa de organismos hospederos de este tipo de cepas o sí mismas (Carro *et al.*, 2018). Además, las cepas de *Micromonospora* sp. LOL-025 y LOL-027 han presentado actividad anticancerígena contra diferentes líneas celulares de cáncer (Zamora *et al.*, 2022); lo cual puede deberse a la gran diversidad de rutas que presentaron en los análisis de antiSMASH (Fig. 10). Análisis genómicos de 50 cepas de *Micromonospora* demostraron que este género presenta BGCs (con un rango de 7-13 BGC y un máximo de 28 BGC en 4 cepas) (Hifnawy *et al.*, 2020). En comparación, las cepas *Micromonospora* sp. LOL-025 y LOL-027 analizadas en el presente estudio, presentan hasta 30 BGCs demostrando el potencial de este género para producir una gran cantidad de metabolitos secundarios (Fig. 10).

En particular la cepa *Micromonospora* sp. LOL-025 mostró la mayor cantidad de BGC asociados a policétidos tipo 1 (PKS1), el cual es un grupo común y de los más abundantes en diferentes especies del género *Micromonospora* (Hifnawy *et al.*, 2020). Además se observó la presencia de BGC asociados a macrólidos como aculeximycin y sporolide, que ya han sido reportados por su actividad antibiótica y antiviral en actinobacterias raras como *Kutzneria* sp. y *Salinispora tropica* (Al-Fadhli *et al.*, 2022; Dineshkumar *et al.*, 2014). Cabe destacar que el genoma de *Micromonospora* sp. LOL-027 también presentó la presencia de un BGC asociado a sporolide con un 51% de similitud y un 57% de similitud con el BGC de PKS1 de

macrotermycins (Tabla VIII), que han sido aisladas originalmente de la cepa de *Amycolatopsis* sp. presentando actividad antibacteriana contra el patógeno humano *Staphylococcus aureus* y actividad antifúngica (Benndorf *et al.*, 2018).

Otro compuesto que se ha reportado con actividad antibiótica es la livipeptina, el cual es producido por un BGC de tipo NRPS, y se identificó en el genoma de *Micromonospora* sp. LOL-025 con un 100% de similitud (Tabla VIII). Aunque inicialmente el BGC de livipeptina fue encontrado en el genoma de *Streptomyces lividans* (Cruz-Morales *et al.*, 2013), Carro y colaboradores (2018), encontraron este BGC en los genomas de *Micromonospora peucetia* y *Micromonospora echinofusca*. Además, los genomas de *Micromonospora* sp. LOL-025 y LOL-027 presentaron dos rutas asociadas a la síntesis de lazo péptidos (Fig. 10), los cuales han sido conocidos por su potencial anticancerígeno y antimicrobiano en diferentes cepas de actinobacterias como *Streptomyces griseoflavus* (Potterat *et al.*, 1994), *Rhodococcus* sp. (Iwatsuki *et al.*, 2006), *Streptomyces leeuwenhoekii* (Elsayed *et al.*, 2015), *Actinokineospora spheciospongiae* (Takasaka *et al.*, 2017), *Planomonospora sphaerica* (Kodani *et al.*, 2017). Debido al bajo porcentaje de similitud (<10%) de estas rutas de lazo péptidos en nuestros genomas con lo conocido en las bases de datos, estas rutas pudieran representar una nueva fuente de nuevos compuestos con potencial anticancerígeno y/o antibiótico.

Un compuesto comúnmente producido por bacterias, hongos y plantas son los sideróforos, que son agentes quelantes del hierro y que han mostrado una gran diversidad de actividades biológicas (Wang *et al.*, 2014; Cruz-Morales *et al.*, 2017). En particular se ha reportado la producción de los sideróforos Desferrioxamine en una gran cantidad de cepas de *Streptomyces* sp. (Challis y Ravel, 2000), *Salinispora* sp. (Roberts *et al.*, 2012) y *Micromonospora provocatoris* (Abdel-Mageed *et al.*, 2021). Los genomas de *Micromonospora* sp. LOL-025 y LOL-027 presentan una ruta de BGC relacionada con el sideróforo Desferrioxamine E (Fig.10). Dicha ruta pudiera ser expresada por las cepas de *Micromonospora* sp. en condiciones naturales de la Laguna Ojo de Liebre, ya que se han reportado concentraciones de no enriquecimiento de hierro en los sedimentos de la Laguna (Valdivieso-Ojeda *et al.*, 2021).

El genoma *Micromonospora* sp. LOL-025, mostró similitud de arriba del 50% con el BGC de SapB (Tabla VIII), el cual ha sido encontrado en diferentes cepas de *Micromonospora* sp. y *Streptomyces* sp., y que está asociado con procesos de morfogénesis que ayuda en la protusión elevada de hifas aéreas (Carro *et al.*, 2018, Arulprakasam *et al.*, 2021). Cabe mencionar que las cepas de *Micromonospora* sp. LOL-025 y LOL-027 no presentaron en cultivo sólido hifas aéreas, pero sí se observó la producción de esporas negras a medida que envejecía el cultivo. Aunque se desconoce la estructura precisa de los pigmentos de esporas, hay estudios que reportan que su biosíntesis es catalizada por enzimas PKS de tipo II (Lee *et al.*, 2005). Análisis genómicos revelaron un grupo de genes PKS de tipo II presente en los

genomas de las cepas tipo (*M. echinofusca* y *M. pattaloongensis*) y en los genomas de *Micromonospora* sp. (LOL-025; LOL-027) (Fig. 10).

En el análisis de metabolismo primario de las cepas de *Actinomadura* sp. se encontró que solo las cepas LOL-011 y LOL-016 mostraron la ruta de degradación de taurina. La taurina es un compuesto similar a un aminoácido que pertenece a los organosulfonatos naturales y que se conoce como fuente de energía para las bacterias marinas (Clifford *et al.*, 2019; Cook y Denger, 2002). Estudios han reportado este compuesto disponible en el tejido de almejas, mesozooplancton y también producido por un gran número de algas (Webb y Johannes, 1967; Clifford *et al.*, 2017; Lee *et al.*, 1997; Pruski *et al.*, 2000; Amin *et al.*, 2015; Tevatia *et al.*, 2015). La contribución de asimilación de taurina por bacterias heterótrofas varía de 21% en zonas epipelágicas y 16% en zonas batipelágicas (Clifford *et al.*, 2019). Además, se tiene reportado que en general los compuestos organosulfonatos representan entre el 20-40% de la materia orgánica azufrada de sedimentos marinos (Vairavamurthy *et al.*, 1994). De ahí que este compuesto al igual que la quitina haya sido de nuestro interés, ya que nuestras cepas fueron aisladas de sedimentos marinos de la Laguna Ojo de Liebre, que contiene alta concentración de mesozooplancton como anfípodos y la gran cantidad de moluscos en el bentos (Caraveo-Patiño y Soto, 2005). Por lo que podemos inferir que las actinobacterias de sedimento marino de la Laguna tienen la disponibilidad de taurina en su medio natural. En medio de cultivo enriquecido con taurina, la cepa *Actinomadura* sp. LOL-011 mostró una mayor tasa de crecimiento que en el medio control (1.0730) (Fig. 7). Además, en ambas cepas se observa un

aumento en el crecimiento en el día 8 con los medios con taurina, a diferencia del medio control A1. En particular, para el octavo día, la cepa *Actinomadura* sp. LOL-011 en el medio taurina 100% creció 8.5% más que en el medio control y en el medio taurina 50% creció 2% más que el medio control. Para la cepa *Actinomadura* sp. LOL-016 tanto en el medio taurina 100% y taurina 50% creció 7% más que en el medio control (Fig. 7).

Aunque en el presente estudio no fue posible realizar extracciones químicas de los cultivos con los medios de taurina, se sugiere que se realicen dichos análisis de los metabolitos producidos en los diferentes medios, para verificar si hubo un efecto en la producción de compuestos al adicionar taurina. Análisis de utilización de taurina en los medios de cultivo como única fuente de carbono, han demostrado la identificación de nuevas cepas de actinobacteria del género *Marmicola* sp. que tienen la capacidad de degradación de este compuesto (Tan *et al.*, 2022). A pesar de que la taurina es un nutriente utilizado como medio de cultivo (Tan *et al.*, 2022) no se tienen reportados estudios específicos en la producción de metabolitos secundarios.

Análisis genómicos de metabolismo secundario de las cepas de *Actinomadura* sp. LOL-011 y LOL-016, detectaron 30 y 31 BGC, respectivamente (Fig. 9), lo cual resulta similar a lo encontrado para *Actinomadura parvosata subsp. kistnae* con 33 BGC detectados (Kusserow y Gulder, 2017) y con la cepa de *Actinomadura graeca* con 27 BGC (Tarantini *et al.*, 2021), independientemente de la



localidad de la cual han sido aisladas estas cepas. Los dos genomas de *Actinomadura* sp. (LOL-011 y LOL-016) presentaron el BGC relacionado con la producción de Maduropeptin, el cual se reportó por primera vez en 1991 en la cepa *Actinomadura madurae* H710-49 (Hanada *et al.*, 1991). Fue hasta 2007 cuando Van Lanen y colaboradores caracterizaron el BGC del compuesto en la cepa *Actinomadura madurae* ATCC 39144 mediante expresión heteróloga. Cabe destacar que se ha reportado que Maduropeptin presenta actividad antibiótica y anticancerígena (Hanada *et al.*, 1991 y Zein y Schroeder, 1998) lo cual podría estar relacionado con la actividad anticancerígena presentada por las cepas *Actinomadura* sp. LOL-011 y LOL-016 (Zamora *et al.*, 2022).

Los genomas de *Actinomadura* LOL-011 y LOL-016, contienen genes relacionados a la biosíntesis de Venezuelina, previamente reportado para la cepa de *Streptomyces* sp. DUT11 (Xu *et al.*, 2018) y para la cepa de *Actinomadura graeca* (Tarantini *et al.*, 2021). Además, se encontró en ambas cepas de *Actinomadura* sp. LOL-011 y LOL-016 y las cepas tipo de *Actinomadura rifamycinini* y *Actinomadura cremea*, el BGC relacionado con la producción de Ectoína con un 100% de similitud, Este BGC ha sido previamente reportado en distintos genomas de actinobacterias como *Streptomyces chrysomallus* (Prabhu *et al.*, 2004), *Actinomadura graeca* (Tarantini *et al.*, 2021), así como el genoma de *Actinomadura rubrisoli* (Ay, 2021). La Ectoína es un compuesto que es producido por una gran diversidad de microorganismos y que los protege contra el estrés osmótico extremo (Pastor *et al.*, 2010). En general una gran cantidad de microorganismos halófilos cuentan con el

BGC de la Ectoína que las ayuda a tolerar altas concentraciones de sal, incluyendo una gran variedad de géneros de actinobacterias como: *Gorgonia*, *Rhodococcus*, *Nocardia*, *Mycobacterium*, *Amycolatopsis*, *Streptomyces*, *Nocardiopsis*, *Actinomadura*, entre otros. (Widderich *et al.*, 2014).

Debido a que las cepas de *Actinomadura* han sido aisladas de la Laguna Ojo de Liebre, que es una laguna hipersalina, la presencia del BGC de la Ectoína afirma la importancia de su presencia en los genomas analizados. Cabe mencionar que este BGC solamente se encontró en los genomas de *Actinomadura* y no en los de *Micromonospora*, lo que sugiere que los mecanismos de protección contra el estrés osmótico son diferentes entre géneros. Se ha estudiado que existen diferentes mecanismos de halotolerancia en actinobacterias que ayudan a tener un balance de sales intracelular, lo cual protege la estructura de la célula (Valan Arasu *et al.*, 2016). En los últimos años, las actinobacterias halófilas han ganado gran importancia ya que han logrado aislar una gran cantidad de compuestos con actividad antibiótica, antifúngica y antiviral (Manivasaga *et al.*, 2014).

## 8. CONCLUSIÓN

Se encontraron diferencias en el metabolismo primario entre los genomas de las cepas de *Actinomadura* y *Micromonospora*. En particular, los genomas de *Actinomadura* presentaron rutas metabólicas únicas para la degradación de taurina, sulfolactato y malonato; a diferencia de los genomas de *Micromonospora* que poseen rutas únicas de degradación de quitina, pirimidina, uracilo y trehalosa.

Una ruta de interés en los genomas de *Actinomadura* es la degradación de taurina, componente que es utilizado por microorganismos de sedimento como fuente de carbono, nitrógeno, azufre y energía. Curvas de crecimiento de las cepas de *Actinomadura* suplementado con 1gr de taurina, mostró a la cepa *Actinomadura* sp. LOL-011 con una constante de crecimiento mayor que el medio control (A1). Además, las dos cepas de *Actinomadura* sp. LOL-011 y LOL-016 mostraron un mayor volumen empacado al día 8 de crecimiento, comparado con el medio A1.

La quitina fue otra ruta metabólica de interés encontrada en los genomas de *Micromonospora* sp. Debido a que la quitina es uno de los principales polímeros de los sedimentos marinos, podemos inferir que la presencia de este componente tiene beneficios a los microorganismos que puedan degradarlo como lo son las cepas de *Micromonospora* sp. LOL-025 y LOL-027 de este estudio. Curvas de crecimiento

adicionando quitina mostró una mayor tasa de crecimiento para la cepa *Micromonospora* sp. LOL-027.

Se encontraron diferencias en el metabolismo secundario entre los genomas de *Actinomadura* y *Micromonospora*. Los genomas de *Actinomadura* sp. LOL-011 y LOL-016 presentaron en promedio 31 grupos de genes biosintéticos (BGC), a diferencia de 29 BGC en promedio para los genomas de *Micromonospora*. Los grupos de genes biosintéticos (BGC) en los genomas analizados fueron terpenos, y policétidos. Del total de BGC que se predicen para los genomas de *Actinomadura* sp. solamente tres presentan un porcentaje de similitud de 50% con los reportados en las bases de datos. Para el caso de los genomas de *Micromonospora* sp. son 6 BGC los que presentan un porcentaje de similitud mayor del 50% con los reportado en las bases de datos. Esto demuestra el gran potencial de rutas metabólicas que presentan ambos géneros estudiados para la producción de nuevos compuestos con actividad antibiótica y/o anticancerígena.

Los genomas de *Actinomadura* sp. LOL-011 y LOL-016 presentaron la presencia de un BGC relacionado con la Ectoína, un compuesto utilizado por diversos microorganismos halófilos para protegerlas contra el estrés osmótico. Al ser bacterias que viven en una laguna hipersalina se corrobora la presencia de este tipo de rutas para la protección ante altas salinidades.

Los genomas de *Micromonospora* sp. LOL-025 y LOL-027 presentaron la presencia de un BGC relacionado con la Desferrioxamine E, un compuesto que les ayuda a poder incorporar hierro como un metal indispensable implicado en diversos procesos celulares, de estrés oxidativo y respiración celular.

Con el análisis del metabolismo primario, se logró modificar el medio control para lograr medios específicos para cada género analizado (*Actinomadura* y *Micromonospora*) en los cuales se logró observar un mayor crecimiento celular en los medios modificados, que en el medio control. Además, el análisis de metabolismo secundario reveló que solamente el 10% de las rutas metabólicas presentan al menos un 50% de similitud con lo que está reportado en las bases de datos. Asimismo, los genomas analizados tienen BGC que no se encuentran en las bases de datos. Por lo que el analizar el metabolismo secundario de genomas bacterianos de lugares poco explorados, como la Laguna Ojo de Liebre, existe un gran potencial de descubrir un gran porcentaje de BGC que pudieran expresar nuevos compuestos químicos.

## 9. REFERENCIAS

- Abdel-Mageed, W. M., Al-Wahaibi, L. H., Lehri, B., Al-Saleem, M. S., Goodfellow, M., Kusuma, A. B., y Karlyshev, A. V. (2021). Biotechnological and ecological potential of *Micromonospora provocatoris* sp. nov., a gifted strain isolated from the Challenger Deep of the Mariana Trench. *Marine drugs*, 19(5), 243.
- Abdelmohsen, U. R., Grkovic, T., Balasubramanian, S., Kamel, M. S., Quinn, R. J., y Hentschel, U. (2015). Elicitation of secondary metabolism in actinomycetes. *Biotechnology advances*, 33(6), 798-811.
- Al-Fadhli, A. A., Threadgill, M. D., Mohammed, F., Sibley, P., Al-Ariqi, W., y Parveen, I. (2022). Macrolides from rare actinomycetes: Structures and bioactivities. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 106523.
- Amin, S. A., Hmelo, L. R., Van Tol, H. M., Durham, B. P., Carlson, L. T., Heal, K. R., y Armbrust, E. V. (2015). Interaction and signalling between a cosmopolitan phytoplankton and associated bacteria. *Nature*, 522(7554), 98-101.
- Arasu, M. V., Esmail, G. A., Al-Dhabi, N. A., y Ponmurugan, K. (2016). Managing pests and diseases of grain legumes with secondary metabolites from actinomycetes. In *Plant Growth Promoting Actinobacteria* (pp. 83-98). Springer, Singapore.
- Atlas, R. 1997. Principles of microbiology. WCB McGrill-Hill, New York, NY.
- Augustine, D., Jacob J. C., Ramya K. D., y Philip R. (2013). Actinobacteria from sediment samples of Arabian Sea and Bay of Bengal: Biochemical and physiological characterization. *Int. J. Res. Mar. Sciences*. 2(2):56-63.
- Aunpad R, Panbangred W. (2003) Cloning and characterization of the constitutively expressed chitinase C gene from a marine bacterium, *Salinivibrio costicola* strain

5SM-1. J Biosci Bioeng 96:529–536

Ay, H. (2021). Genomic insight into a novel actinobacterium, *Actinomadura rubrisoli* sp. nov., reveals high potential for bioactive metabolites. *Antonie van Leeuwenhoek*, 114(2), 195-208.

Baral B, Akhgari A, Metsä-Ketelä M. (2018) Activación de vías metabólicas secundarias microbianas: avenidas y desafíos. *Synth Syst Biotechnol* 3: 163-178. DOI:1016/j.synbio.2018.09.001.

Barka, E. A., Vatsa, P., Sanchez, L., Gaveau-Vaillant, N., Jacquard, C., Klenk, H. P., y van Wezel, G. P. (2016). Taxonomy, physiology, and natural products of Actinobacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 80(1), 1-43.

Bassler BL, Yu C, Lee CYC, Roseman S (1991) Chitin utilization by marine bacteria. Degradation and catabolism chitin oligosaccharides by *Vibrio furnissii*. *J Biol Chem* 266:24276–24286

Becerril-Espinosa A. (2011) Actinobacterias aisladas del sedimento marino del Golfo de California y de Bahía Todos Santos: diversidad, bioactividad y dominios cetosintetasa. PhD thesis, Universidad Autónoma de Baja California, México, 114pp.

Benndorf, R., Guo, H., Sommerwerk, E., Weigel, C., Garcia-Altare, M., Martin, K., y Beemelmans, C. (2018). Natural products from Actinobacteria associated with fungus-growing termites. *Antibiotics*, 7(3), 83.

Brzezinska MS, Lalke-Porczyk E, Donderski W, Walczak M (2008) Occurrence and activity of microorganisms in shrimp waste. *Curr Microbiol* 57:580–587

Bull, A. T., Stach, J. E. M., Ward, A. C., y Goodfellow, M. (2005) Marine Actinobacteria: perspectives, challenges, future directions. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 87, 65–79.

- Bull, A.T.; Stach, J.E.M.; Ward, A.C.; Goodfellow, M. (2005) Marine Actinobacteria: Perspectives, challenges, future directions. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 87, 65–79.
- Caraveo-Patiño, J., & Soto, L. A. (2005). Stable carbon isotope ratios for the gray whale (*Eschrichtius robustus*) in the breeding grounds of Baja California Sur, Mexico. *Hydrobiologia*, 539(1), 99-104.
- Cardoso-Martínez, F., Becerril-Espinosa, A., Barrila-Ortíz, C., Torres-Beltrán, M., Ocampo-Alvarez, H., Iñiguez-Martínez, A. M., y Soria-Mercado, I. E. (2015). Bioactividad antibacterial y citotóxica de actinobacterias marinas del Parque Nacional Bahía de Loreto, México. *Hidrobiológica*, 25(2), 223-229.
- Carro, L., Nouioui, I., Sangal, V., Meier-Kolthoff, J. P., Trujillo, M. E., Montero-Calasanz, M. D. C., y Goodfellow, M. (2018). Genome-based classification of micromonosporae with a focus on their biotechnological and ecological potential. *Scientific reports*, 8(1), 1-23.
- Challis, G. L., y Ravel, J. (2000). Coelichelin, a new peptide siderophore encoded by the *Streptomyces coelicolor* genome: structure prediction from the sequence of its non-ribosomal peptide synthetase. *FEMS microbiology letters*, 187(2), 111-114. peptides produced by *Rhodococcus* sp. K01– B0171, have a lasso structure. *Journal of the American Chemical Society*, 128(23), 7486-7491.
- Clermont, N., Legault, G., Lerat, S., y Beaulieu, C. (2010). Effect of biopolymers on geldanamycin production and biocontrol ability of *Streptomyces melanosporofaciens* strain EF-76. *Canadian journal of plant pathology*, 32(4), 481-489.
- Clifford EL, Hansell DA, Varela MM, Nieto-Cid M, Herndl GJ, Sintes E (2017) El zooplancton de los crustáceos libera grandes cantidades de materia orgánica disuelta en forma



de taurina en el océano. *Limnol Oceanogr* 62:2745–2758.

Clifford, E. L., Varela, M. M., De Corte, D., Bode, A., Ortiz, V., Herndl, G. J., y Sintés, E.

(2019). Taurine is a major carbon and energy source for marine prokaryotes in the North Atlantic Ocean off the Iberian Peninsula. *Microbial ecology*, 78(2), 299-312.

Colwell RR (1970) Polyphasic taxonomy of the genus *Vibrio*: numerical taxonomy of *Vibrio cholerae*, *Vibrio parahaemolyticus*, and related *Vibrio* species. *J Bacteriol* 104:410–433

Cook AM, Denger K (2002) Disimilación de los sulfonatos C2. *Arch Microbiol* 179: 1–6. DOI:10.1007/s00203-002-0497-0

Crawford, D. L., Lynch, J. M., Whipps, J. M. y Ousley, M. A. (1993). Isolation and Characterization of Actinomycete Antagonist of a fungal Root Pathogen. *Appl Environ Microbiol* 59, 3899-905.

Cruz-Morales, P., Vijgenboom, E., Iruegas-Bocardo, F., Girard, G., Yáñez-Guerra, L. A., Ramos-Aboites, H. E., y Barona-Gómez, F. (2013). The genome sequence of *Streptomyces lividans* 66 reveals a novel tRNA-dependent peptide biosynthetic system within a metal-related genomic island. *Genome biology and evolution*, 5(6), 1165-1175.

Das, S., Ward, L. R. & Burke, C (2008). Prospects of using marine actinobacteria as probiotics in aquaculture. *Appl Microbiol Biotechnol* 81, 419–429, DOI:10.1007/s00253-008-1731-8

Dineshkumar, K., Aparna, V., Madhuri, K. Z., y Hopper, W. (2014). Biological activity of sporolides A and B from *Salinispora tropica*: in silico target prediction using ligand-based pharmacophore mapping and in vitro activity validation on HIV-1 reverse

transcriptase. *Chemical biology & drug design*, 83(3), 350-361.

- Elsayed, S. S., Trusch, F., Deng, H., Raab, A., Prokes, I., Busarakam, K., y Rateb, M. E. (2015). Chaxapeptin, a lasso peptide from extremotolerant *Streptomyces leeuwenhoekii* strain C58 from the hyperarid Atacama Desert. *The Journal of organic chemistry*, 80(20), 10252-10260.
- El-Tarabily, K. y Soliman, M. (2000). Biological control of *Sclerotinia minor* using a chitinolytic bacterium and actinomycetes. *Plant Pathol* 49, 573.
- El-Tarabily, K. (1997). The potencial for the biological control of cavity-spot disease of carrots, caused by *Pythium coloratum*, by streptomycete and non-streptomycete actinomycetes. *New Phytol* 137, 495-507.
- Evangelista-Martínez, Z. (2014). Isolation and characterization of soil *Streptomyces* species as potential biological control agents against fungal plant pathogens. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 30(5), 1639-1647.
- Fenical, W. y P. R. Jensen (2006). Developing a new resource for drug discovery: marine actinomycete bacteria. *Nat. Chem. Biol.* 2(12):666-673.
- Fernández, C. R. (2005). Análisis de la diversidad de Actinomicetos asociados a raíces de *Lupinus angustifolius*. Trabajo de Grado. Departamento de Microbiología y genética. Universidad de Salamanca. Salamanca.
- Fiedler, H.P., C. Bruntner, A.T. Bull, A.C. Ward, M. Goodfellow, O. Potterat, C. Puder y G. Mihm. (2005) Marine actinomycetes as a source of novel secondary metabolites. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 87(1):37-42.
- Frasch HJ, Kalan L, Kilian R, Martin T, Wright GD, Stegmann E. (2015) Alternative pathway to a glycopeptide-resistant cell wall in the balhimycin producer *Amycolatopsis*

balhimycina. *ACS Infect Dis* 1:243–252. DOI:10.1021/acsinfecdis.5b00011.

Han Y, Yang B, Zhang F, Miao X, Li Z (2009) Characterization of antifungal chitinase from marine *Streptomyces* sp. DA11 associated with South China sea sponge *Craniella australiensis*. *Mar Biotechnol* 11:132–140

Hanada, M., Ohkuma, H., Yonemoto, T., Tomita, K., Ohbayashi, M., Kamei, H., y Forenza, s. (1991). Maduropeptin, a complex of new macromolecular antitumor antibiotics. *The Journal of Antibiotics*, 44(4), 403-414.

Hifnawy, M. S., Fouda, M. M., Sayed, A. M., Mohammed, R., Hassan, H. M., AbouZid, S. F., y Abdelmohsen, U. R. (2020). The genus *Micromonospora* as a model microorganism for bioactive natural product discovery. *RSC advances*, 10(35), 20939-20959.

Hirono I, Yamashita M, Aoki T (1998) Molecular cloning of chitinase genes from *Vibrio anguillarum* and *V. parahaemolyticus*. *J Appl Microbiol* 84:1175–1178

Hirsch, A. M. y Valdés, M. (2010). *Micromonospora*: An important microbe for biomedicine and potentially for biocontrol and biofuels. *Soil Biol Biochem* 42, 536–542, DOI:10.1016/j.soilbio.2009.11.023

Howard MB, Ekborg NA, Taylor LE, Weiner RM, Hutcheson SW (2003) Genomic analysis and initial characterization of the chitinolytic system of *Microbulbifer degradans* strain 2-40. *J Bacteriol* 185:3352–3360

Igarashi, Y., Yanase, S., Sugimoto, K., Enomoto, M., Miyanaga, S., Trujillo, M. E., y Kuwahara, S. (2011). Lupinacidin C, an inhibitor of tumor cell invasion from *Micromonospora lupini*. *Journal of natural products*, 74(4), 862-865.

Itoi S, Kanomata Y, Koyama Y, Kadokura K, Uchida S, Nishio T, Oku T, Sugita H (2007) Identification of a novel endochitinase from a marine bacterium *Vibrio*

*proteolyticus* strain No. 442. *Biochim Biophys Acta* 1774:1099–1107

Iwatsuki, M., Tomoda, H., Uchida, R., Gouda, H., Hirono, S., & Ōmura, S. (2006). Lariatins, antimycobacterial

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

Jiang, C.L. y L.H. Xu. (1996) Diversity of aquatic actinomycetes in lakes of the middle plateau, Yunnan, China. *Appl. Environ. Microbiol.* 62(1): 249-253.

Kai Blin, Simon Shaw, Alexander M Kloosterman, Zach Charlop-Powers, Gilles P van Wezel, Marnix H Medema, Tilmann Weber. (2021) antiSMASH 6.0: improving cluster detection and comparison capabilities, *Nucleic Acids Research*, Volume 49, Issue W1, Pages W29–W35. DOI:10.1093/nar/gkab335

Kelecom, A. (2002) Secondary metabolites from marine microorganisms. *An. Acad. Bras. Cienc.* 74(1): 151-170.

Keyhani NO, Roseman S (1999) Physiological aspects of chitin catabolism in marine bacteria. *Biochim Biophys Acta* 1473:108–122

Kimura, T., Iwatsuki, M., Asami, Y., Ishiyama, A., Hokari, R., Otoguro, K., Nakashima, T. (2016). Anti-trypanosomal compound, sagamilactam, a new polyene macrocyclic lactam from *Actinomadura* sp. K13-0306. *The Journal of Antibiotics*, 69(11), 818-824.

Kodani, S., Inoue, Y., Suzuki, M., Dohra, H., Suzuki, T., Hemmi, H., y Ohnishi-Kameyama, M. (2017). Sphaericin, a lasso peptide from the rare actinomycete *Planomonospora sphaerica*. *European Journal of Organic Chemistry*, 2017(8), 1177-1183.

Komaki, H., Harunari, E., Ichikawa, N., Hosoyama, A., Hamada, M., Duangmal, K., y

- Igarashi, Y. (2020). Draft genome sequence of *Actinomadura* sp. K4S16 and elucidation of the nonthmicin biosynthetic pathway. *Journal of genomics*, 8, 53.
- Konwar, K. M., Hanson, N. W., Pagé, A. P., y Hallam, S. J. (2013). MetaPathways: a modular pipeline for constructing pathway/genome databases from environmental sequence information. *BMC bioinformatics*, 14(1), 1-10.
- Kusserow, K., & Gulder, T. A. (2017). Complete genome sequence of *Actinomadura parvosata* subsp. *kistnae*, a rich source of novel natural product (bio-) chemistry. *Journal of Genomics*, 5, 75.
- Lee RW, Childress JJ, Desaulniers NT (1997) Los efectos de la exposición a las piscinas de amoníaco y taurina de la almeja simbiótica *Solemya reidi*. *J Exp Biol* 200:2797–2805
- Lee, Md, Manning, Jk, Williams, Dr, Kuck, Na, Testa, Rt Y Borders, Db (1989). Caliceamicinas, una nueva familia de antibióticos antitumorales 3. aislamiento, purificación y caracterización de Caliceamicinas  $\beta$  1 Br,  $\gamma$  1 Br,  $\alpha$  2 I,  $\alpha$  3 I,  $\beta$  1 I,  $\gamma$  1 I Y  $\delta$  1 I. *The Journal of antibiotics*, 42 (7), 1070-1087.
- Lee, N., Kim, W., Hwang, S., Lee, Y., Cho, S., Palsson, B., y Cho, B. K. (2020). Thirty complete *Streptomyces* genome sequences for mining novel secondary metabolite biosynthetic gene clusters. *Scientific data*, 7(1), 1-9.
- Lee, S. R., Lee, D., Yu, J. S., Benndorf, R., Lee, S., Lee, D. S., y Kim, K. H. (2018). Natalenamides A–C, cyclic tripeptides from the termite-associated *Actinomadura* sp. RB99. *Molecules*, 23(11), 3003. Ay, H. (2021)
- Lee, S.Y., Kim H.U., Park J.H., y T.Y. Kim, (2009) Metabolic engineering of microorganisms: general strategies and drug production. *Drug Discovery Today*, 14(1): p. 78-88
- Lee, T. S., Khosla, C., y Tang, Y. (2005). Orthogonal protein interactions in spore pigment

producing and antibiotic producing polyketide synthases. *The Journal of Antibiotics*, 58(10), 663-666.

Letzel, A. C., Li, J., Amos, G. C., Millán-Aguiñaga, N., Ginigini, J., Abdelmohsen, U. R., y Jensen, P. R. (2017). Genomic insights into specialized metabolism in the marine actinomycete *Salinispora*. *Environmental microbiology*, 19(9), 3660-3673.

Li J, Dong J, Luo X, Yang J y Zhang S. (2014). Detection of polyketide synthase and nonribosomal peptide synthetase biosynthetic genes from antimicrobial coral associated actinomycetes. *Antonie van Leeuwenhoek, Volumen (106)*, 623–635.

Li X, Roseman S (2004) The chitinolytic cascade in *Vibrios* is regulated by chitin oligosaccharides and a two-component chitin catabolic sensor/kinase. *Proc Natl Acad Sci USA* 101:627–631

Manivasagan, P., Venkatesan, J., Sivakumar, K., y Kim, S. K. (2014). Pharmaceutically active secondary metabolites of marine actinobacteria. *Microbiological research*, 169(4), 262-278.

Maskey RP, Li FC, Qin S, Fiebig HH, Laatsch H (2003) Chandrananimycins AC: production of novel anticancer antibiotics from a marine *Actinomadura* sp. isolate M048 by variation of medium composition and growth conditions. *J Antibiot* 56:622–629 Ay, H. (2021)

Mazzei E, Iorio M, Maffioli SI, Sosio M, Donadio S (2012) Characterization of madurastatin C1, a novel siderophore from *Actinomadura* sp. *J Antibiot* 65:267–269 Ay, H. (2021)

Medema, M. H., Blin, K., Cimermancic, P., De Jager, V., Zakrzewski, P., Fischbach, M. A., y Breitling, R. (2011). antiSMASH: rapid identification, annotation and analysis of secondary metabolite biosynthesis gene clusters in bacterial and fungal genome

sequences. *Nucleic acids research*, 39(suppl\_2), W339-W346.

Meibom KL, Li XB, Nielsen AT, Wu CY, Roseman S, Schoolnik GK (2004) The *Vibrio cholerae* chitin utilization program. *Proc Natl Acad Sci USA* 101:2524–2529

Nawani N., Aigle B., Mandal A., Bodas M., Ghorbel S., y Prakash D. (2013). Actinomycetes: Role in biotechnology and medicine. *BioMed Res. Int.*, Volume 2013, Article ID 687190, 1 p.

Neiendam Nielsen, M., y Sørensen, J. (1999). Chitinolytic activity of *Pseudomonas fluorescens* isolates from barley and sugar beet rhizosphere. *FEMS Microbiology Ecology*, 30(3), 217-227.

Nett, M, Ikeda, H y Moore, BS 2009, 'Genomic basis for natural product biosynthetic diversity in the actinomycetes', *Natural Product Reports*, vol. 26, no. 11, pp. 1362-84.

Nett, M., Ikeda, H., y Moore, B. S. (2009). Genomic basis for natural product biosynthetic diversity in the actinomycetes. *Natural product reports*, 26(11), 1362-1384.

Ōmura, S., Ikeda, H., Ishikawa, J., Hanamoto, A., Takahashi, C., Shinose, M., y Hattori, M. (2001). Genome sequence of an industrial microorganism *Streptomyces avermitilis*: deducing the ability of producing secondary metabolites. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(21), 12215-12220.

Oren, A., y Garrity, G. M. (2021). Valid publication of the names of forty-two phyla of prokaryotes. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 71(10), 005056.

Pastor, J. M., Salvador, M., Argandoña, M., Bernal, V., Reina-Bueno, M., Csonka, L. N., y Cánovas, M. (2010). Ectoines in cell stress protection: uses and biotechnological production. *Biotechnology advances*, 28(6), 782-801.

- Pérez Curiel, J. (2011). *Direccionamiento del metabolismo primario a metabolismo secundario para la evaluación de la producción de actinorrodina por medio de la modulación de citrato sintasa y aconitasa en Streptomyces coelicolor* (Tesis doctoral).
- Potterat, O., Stephan, H., Metzger, J. W., Gnau, V., Zähler, H., y Jung, G. (1994). Aborycin— A Tricyclic 21-Peptide Antibiotic Isolated from *Streptomyces griseoflavus*. *Liebigs Annalen der Chemie*, 1994(7), 741-743.
- Prabhu, J., Schauwecker, F., Grammel, N., Keller, U., y Bernhard, M. (2004). Functional expression of the ectoine hydroxylase gene (thpD) from *Streptomyces chrysomallus* in *Halomonas elongata*. *Applied and environmental microbiology*, 70(5), 3130-3132.
- Pruski AM, Fiala-médioni A, Fisher CR, Colomines JC (2000) Composición de aminoácidos libres y compuestos relacionados en invertebrados con bacterias simbióticas en filtraciones de hidrocarburos en el Golfo de México. *Mar Biol* 136: 411–420. DOI:10.1007/s002270050700
- Quiñones-Aguilar, E. E., Evangelista-Martínez, Z., y Rincón-Enríquez, G. (2016). Los actinomicetos y su aplicación biotecnológica. *Elementos*, 101, 59-64.
- Raja, A., y Prabakarana, P. (2011). Actinomycetes and drug-an overview. *American Journal of Drug Discovery and Development*, 1(2), 75-84.
- Rigali, S., Titgemeyer, F., Barends, S., Mulder, S., Thomae, A. W., Hopwood, D. A., y Van Wezel, G. P. (2008). Feast or famine: the global regulator DasR links nutrient stress to antibiotic production by *Streptomyces*. *EMBO reports*, 9(7), 670-675.
- Setiawan, A., Widyastuti, W., Irawan, A., Wijaya, O. S., Laila, A., Setiawan, W. A., y Hendri, J. (2021). Solid state fermentation of shrimp shell waste using *Pseudonocardia carboxydivorans* 18A13O1 to produce bioactive metabolites. *Fermentation*, 7(4), 247.



- Shin B, Kim B-Y, Cho E, Oh K-B, Shin J, Goodfellow M, Oh D-C (2016) Actinomadurol, an antibacterial norditerpenoid from a rare actinomycete, *Actinomadura* sp. KC 191. J Nat Prod 79:1886–1890
- Simmons L, Kaufmann K, Garcia R, Schwär G, Huch V, Müller R (2011) Bendigoles D-F, bioactive sterols from the marine sponge-derived *Actinomadura* sp. SBMs009. Bioorg Med Chem 19:6570–6575 → Ay, H. (2021)
- Somerville CC, Colwell RR (1993) Sequence analysis of the  $\beta$ -*N*-acetylhexosaminidase gene of *Vibrio vulnificus*: evidence for a common evolutionary origin of hexosaminidases. Proc Natl Acad Sci USA 90:6751–6755
- Stefanidi E, Vorgias CE (2008) Molecular analysis of the gene encoding a new chitinase from the marine psychrophilic bacterium *Moritella marina* and biochemical characterization of the recombinant enzyme. Extremophiles 12:541–552
- Subramani, R. y Aalbersberg W. (2012). Marine actinomycetes: An ongoing source of novel bioactive metabolites. Microbiol. Res. 167(10):571-580.
- Suginta W (2007) Identification of chitin binding proteins and characterization of two chitinase isoforms from *Vibrio alginolyticus* 283. Enzyme Microb Tech 41:212–220
- Svitil AL, Ní Chadhain SM, Moore JA, Kirchman DL (1997) Chitin degradation proteins produced by the marine bacterium *Vibrio harveyi* on different forms of chitin. Appl Environ Microb 63:408–413
- Takasaka, N., Kaweewan, I., Ohnishi-Kameyama, M., y Kodani, S. (2017). Isolation of a new antibacterial peptide actinokineosin from *Actinokineospora spheciospongiae* based on genome mining. *Letters in applied microbiology*, 64(2), 150-157.
- Talukdar, M., Das, D., Bora, C., Bora, T. C., Boruah, H. P. D., y Singh, A. K. (2016). Complete

genome sequencing and comparative analyses of broad-spectrum antimicrobial-producing *Micromonospora* sp. HK10. *Gene*, 594(1), 97-107.

Tan, Y., Zhang, M., Pan, Y., y Xie, L. (2022). Curative effect and possible mechanism of taurine on early corneal alkali burns. *Chinese Medical Journal*, 135(06), 744-746.

Tarantini, F. S., Brunati, M., Taravella, A., Carrano, L., Parenti, F., Hong, K. W., y Chan, W. C. (2021). *Actinomadura graeca* sp. nov.: A novel producer of the macrocyclic antibiotic zelvomycin. *Plos one*, 16(11), e0260413.

Tevatia R, Allen J, Rudrappa D, White D, Clemente TE, Cerutti H, Demirel Y, Blum P (2015) The taurine biosynthetic pathway of microalgae. *Algal Res* 9:21–26. DOI:10.1016/j.algal.2015.02.012

Torres-Beltrán, M., Cardoso-Martínez, F., Millán-Aguñaga, N., Becerril-Espinosa, A., y Soria-Mercado, I. E. (2012). Evaluation of the Gulf of California as a potential source of bioactive marine actinobacteria. *Ciencias Marinas*, 38(4), 609-624.

Trujillo, M. E., Riesco, R., Benito, P. y Carro, L. (2015) Endophytic actinobacteria and the interaction of *Micromonospora* and nitrogen fixing plants. *Front Microbiol* 6, 1341, DOI:10.3389/fmicb.2015.01341

Trujillo, M. E., Bacigalupe, R., Pujic, P., Igarashi, Y., Benito, P., Riesco, R., y Normand, P. (2014). Genome features of the endophytic actinobacterium *Micromonospora lupini* strain Lupac 08: on the process of adaptation to an endophytic life style?. *PLoS One*, 9(9), e108522.

Tsujibo H, Orikoishi H, Tanno H, Fujimoto K, Miyamoto K, Imada C, Okami Y, Inamori Y (1993) Cloning, sequence, and expression of a chitinase gene from a marine bacterium, *Alteromonas* sp. Strain O-7. *J Bacteriol* 175:176–181

- Vairavamurthy, A., Zhou, W., Eglinton, T., y Manowitz, B. (1994). Sulfonates: a novel class of organic sulfur compounds in marine sediments. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 58(21), 4681-4687.
- Valdivieso-Ojeda, J. A., Huerta-Díaz, M. A., Delgadillo-Hinojosa, F., Otero, X. L., Arenas-Islas, D., y García-Orozco, J. (2021). Sediment trace metal levels in the Ojo de Liebre Lagoonal Complex (Baja California, Mexico), a marine wildlife protected area. *Marine Pollution Bulletin*, 165, 112097.
- van der Meij, A., Worsley, S. F., Hutchings, M. I. y van Wezel, G. P. (2017) Chemical ecology of antibiotic production by actinomycetes. *FEMS Microbiol. Rev.* 41, 392–416
- Van Lanen, S. G., Oh, T. J., Liu, W., Wendt-Pienkowski, E., y Shen, B. (2007). Characterization of the maduropeptin biosynthetic gene cluster from *Actinomadura madurae* ATCC 39144 supporting a unifying paradigm for enediyne biosynthesis. *Journal of the American Chemical Society*, 129(43), 13082-13094.
- Wang, W., Qiu, Z., Tan, H., y Cao, L. (2014). Siderophore production by actinobacteria. *Biometals*, 27(4), 623-631.
- Ward, A.C. y N. Bora. (2006) Diversity and biogeography of marine actinobacteria. *Curr Opin Microbiol.*9(3): 279-86.
- Watve, M. G., Tickoo R., Jog M. y Bhole B. D. (2001). How many antibiotics are produced by the genus *Streptomyces*? *Arch. Microbiol.* 176:386-390.
- Webb K, Johannes R (1967) Estudios de la liberación de aminoácidos libres disueltos por zooplancton marino. *Limnol Oceanogr* 12: 376–382
- Weinstein, M. J., Luedemann, G. M., Oden, E. M., Wagman, G. H., Rosselet, J. P., Marquez, J. A., Coniglio, C. T., Charney, W., Herzog, H. L., y Black, J. (1963) Gentamicin, a

new antibiotic complex from *Micromonospora*. *J. Med. Chem.*, 122, 463–464.

Weinstein, M. J., Marquez, J. A., Testa, R. T., Wagman, G. H., Oden, E. M., y Waitz, J. A.

(1970). Antibiotic 6640, a new micromonospora-produced aminoglycoside antibiotic.

*The Journal of antibiotics*, 23(11), 551-554.

Weinstein, M. J., Wagman, G. H., Marquez, J. A., Testa, R. T. y Waitz, J. A. Verdamicin, a

new broad spectrum aminoglycoside antibiotic. *Antimicrob Agents Chemother* 7, 246–

249 (1975).

Whitman, W. B. (2012) *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology: Volume 5: The*

*Actinobacteria* (Springer Science & Business Media).

Widderich, N., Hoepfner, A., Pittelkow, M., Heider, J., Smits, S. H., y Bremer, E. (2014).

Biochemical properties of ectoine hydroxylases from extremophiles and their wider

taxonomic distribution among microorganisms. *PLoS one*, 9(4), e93809.

Wieme AD, Gosselé F, Snauwaert C, Cleenwerck I, Vandamme P (2019) *Actinomadura*

*roseirufa* sp. nov., producer of semduramicin, a polyether ionophore. *Int J Syst Evol*

*Microbiol* 69:3068–3073

Wietz, M., Månsson, M., y Gram, L. (2011). Chitin stimulates production of the antibiotic

andrimid in a *Vibrio coralliilyticus* strain. *Environmental microbiology reports*, 3(5),

559-564.

Wortman AT, Somerville CC, Colwell RR (1986) Chitinase determinants of *Vibrio vulnificus*:

gene cloning and applications of a chitinase probe. *Appl Environ Microbiol* 52:142–

145

Xu L, Huang H, Wei W, Zhong Y, Tang B, Yuan H, Zhu L, Huang W, Ge M, Yang S, Zheng

H, Jiang W, Chen D, Zhao GP, Zhao W. (2014). Complete genome sequence and

comparative analyses of the vancomycin-producing *Amycolatopsis orientalis*. *BMC Genomics* 15:363–381. DOI:10.1186/1471-2164-15-363.

Zamora-Quintero, A. Y., Torres-Beltrán, M., Matus, D. G. G., Oroz-Parra, I., & Millán-Aguiñaga, N. (2022). Rare actinobacteria isolated from the hypersaline Ojo de Liebre Lagoon as a source of novel bioactive compounds with biotechnological potential. *Microbiology*, 168(2), 001144.

Zein, N., y Schroeder, D. R. (1998). Kedarcidin and maduropeptin: Two novel antitumor chromoproteins with selective protease activity and DNA cleaving properties. In *Advances in DNA Sequence-Specific Agents* (Vol. 3, pp. 201-225). Elsevier.

Ziemert, N., Lechner, A., Wietz, M., Millán-Aguiñaga, N., Chavarria, K. L., y Jensen, P. R. (2014). Diversity and evolution of secondary metabolism in the marine actinomycete genus *Salinispora*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(12), E1130-E1139.