



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA
FACULTAD DE CIENCIAS MARINAS
CAMPUS ENSENADA



**Análisis genómico del metabolismo secundario de bacterias del género
Nocardiosis provenientes de sedimento de la Fosa de las Marianas**

TESIS

Para obtener el título de:

OCEANÓLOGA

Presenta:

NATALYE ISSABELLA MANRÍQUEZ DÍAZ

Directora de tesis: DRA. NATALIE MILLÁN AGUIÑAGA

Co-directora de tesis: DRA. MÓNICA TORRES BELTRÁN

Sinodal: DRA. DULCE GUADALUPE GUILLÉN MATUS

Ensenada, B.C. México.

Mayo, 2024

RESUMEN

El océano profundo se caracteriza por la ausencia de luz y de condiciones ambientales críticas para el hábitat; por ello los organismos y microorganismos que se encuentran en el fondo marino profundo se les denomina extremófilos. Un grupo de bacterias que se ha caracterizado por tener géneros presentes en el sedimento de lugares extremos es el filo Actinomycetota. Este filo ha sido estudiado debido a su producción de compuestos activos con aplicación farmacológica. En particular, se ha documentado que el género *Nocardiopsis* produce una gran diversidad de compuestos bioactivos. El objetivo de este trabajo es analizar y comparar el metabolismo secundario de cuatro genomas de actinobacterias del género *Nocardiopsis* aisladas de sedimento de la Fosa de las Marianas. El aislamiento bacteriano se realizó siguiendo el método de estampado en seco del sedimento, logrando aislar cuatro cepas: CNY-900, CNY-902, CNY-903 y CNY-904. Las cepas aisladas fueron identificadas taxonómica y filogenéticamente con base en el gen 16S rRNA, las cuales pertenecen al género *Nocardiopsis*. Se extrajo el ADN y se realizó la secuenciación del genoma utilizando la plataforma Illumina HiSeq 4000, para explorar el metabolismo secundario de los genomas utilizando antiSMASH enfocado en la identificación de grupos de genes biosintéticos (BGCs) para metabolitos secundarios con potencial de actividad biológica. En promedio presentaron un 6% del genoma destinado a la biosíntesis de metabolitos secundarios con un promedio de 22 BGCs de los tipos péptidos no ribosomales sintetasa (NRPS), policétido sintasa (PKS), entre otros. Se estandarizaron curvas de crecimiento de las cuatro cepas para determinar su constante de crecimiento y el tiempo de duplicación. Para evaluar la actividad antibacteriana, se extrajeron los compuestos químicos con acetato de etilo y metanol, con los extractos crudos obtenidos de las cuatro cepas se hicieron bioensayos del tipo antibiogramas y pruebas de antagonismo contra la cepa patógena *Vibrio harveyi*. Sólo los extractos de acetato de etilo presentaron actividad antimicrobiana, observándose la mayor actividad a las 6 horas de exposición al inóculo de *Vibrio harveyi*. Las pruebas de antagonismo mostraron un efecto posterior a las 24h de exposición de *Vibrio* con *Nocardiopsis*.

Estos análisis revelan el alto potencial que presentan los genomas para la biosíntesis de compuestos bioactivos y representan una oportunidad para evaluar la actividad antimicrobiana de los extractos a otras concentraciones, purificados, en otras condiciones y con otros patógenos.

Palabras clave: Bacterias, Potencial Genómico, Efecto Antibacteriano.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA
FACULTAD DE CIENCIAS MARINAS
CAMPUS ENSENADA



**“Análisis genómico del metabolismo secundario de bacterias del género
Nocardiosis provenientes de sedimento de la Fosa de las Marianas”**

TESIS

PARA CUBRIR LOS REQUISITOS NECESARIOS PARA OBTENER EL TÍTULO DE
OCEANÓLOGO

PRESENTA:

Natalye Issabella Manríquez Díaz
354617

A quien el Comité de Tesis autoriza el trabajo terminal, después de haber efectuado una revisión minuciosa del mismo y de acuerdo con el Art. 19 del R.G.E.P.E.P, las y los señores profesores emiten los siguientes votos aprobatorios mediante rubrica:


Dra. Natalie Millán Aguiñaga
DIRECTOR


Dra. Mónica Torres Beltrán
CO-DIRECTOR


Dra. Dulce Guadalupe Guillén Matus
SINODAL

“Por la Realización Plena del Ser”

C.c.p.- Archivo
C.c.p.- Minutario

AGRADECIMIENTOS

A mi comité de tesis, Dra. Natalie Millán gracias por confiar en mí para este trabajo, es un honor haber aprendido de usted y tenerla presente, es mi ejemplo a seguir, la quiero mucho. Dra. Mónica Torres, le agradezco cada momento en que me ayudó a aclarar mi mente y animarme a seguir adelante, por confiar en mí y estar presente durante este proceso. Dra. Dulce Guillén, gracias por su tiempo, por transmitirme su conocimiento y por aceptar ser parte de este trabajo. Les agradezco su paciencia y sus recomendaciones en este trabajo.

A mi familia, por su apoyo incondicional en todas las etapas de mi vida, por estar presentes y por creer en mí. A mi papá y a mi mamá, los amo y estoy profundamente agradecida por su apoyo, amor y esfuerzo. Mis cuates, los amo con mi corazón desde el primer momento que los vi. A mi hermano mayor, por ser mi guardián y enseñarme a ser buena hermana.

A mis amigos, por los aprendizajes que nos dio la vida de foráneos y por el apoyo incondicional que nos dimos en los momentos más difíciles. Deyanira, Katia, Verónica, Yessica, Itzel, Julián, Marlenne, gracias por hacer la universidad más amena.

A Alex, por estar presente y quererme como soy. Me iluminaste el camino y estoy profundamente agradecida con la vida por conocerte.

A la Universidad Autónoma de Baja California, por brindar espacios y personal para mantener a flota la Facultad de Ciencias Marinas, la cual fue y seguirá siendo mi hogar frente al mar.

A cada profesor que formó parte en mi proceso para ser Oceanóloga.

Y por último, pero no menos importante, a Chester y Güero. Mis mascotas que me acompañaron en mis días de desvelo.

DEDICATORIA

A mis padres, este trabajo refleja el esfuerzo y dedicación que aprendí de ustedes.

Y a mí misma, por no rendirme, por mantener la cabeza en alto y no dejarme apagar. Agradecida por las decisiones que me llevaron a realizar esta tesis.

ÍNDICE DE CONTENIDO

1. INTRODUCCIÓN	11
2. ANTECEDENTES	13
3. ÁREA DE ESTUDIO	16
4. HIPÓTESIS	16
5. OBJETIVOS	17
5.1. OBJETIVO GENERAL	17
5.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	17
6. METODOLOGÍA	17
6.1. TRATAMIENTO DE SEDIMENTO Y AISLAMIENTO BACTERIANO	17
6.2. ANÁLISIS FILOGENÉTICOS	18
6.3. CURVAS DE CRECIMIENTO	18
6.4. EXTRACCIÓN QUÍMICA	19
6.5. BIOENSAYOS ANTIMICROBIANOS	20
6.6. PRUEBAS DE ANTAGONISMO MICROBIANO	21
6.7 ANÁLISIS GENÓMICO DE METABOLITOS SECUNDARIOS	23
6.8 ANÁLISIS ESTADÍSTICOS	23
7. RESULTADOS	24
7.1. AISLAMIENTO BACTERIANO	24
7.2. ÁRBOL FILOGENÉTICO	25
7.3. CURVAS DE CRECIMIENTO	27
7.4. BIOENSAYOS ANTIMICROBIANOS	29
7.5. ANTAGONISMO MICROBIANO	31
7.6. ANÁLISIS GENÓMICOS DE METABOLITOS SECUNDARIOS	36
8. DISCUSIÓN	39
8.1. AISLAMIENTO BACTERIANO	39
8.2. CURVA DE CRECIMIENTO	39

8.3. EFECTO ANTIBACTERIANO Y ANTAGONISMO MICROBIANO	41
8.4. ANÁLISIS GENÓMICO DE METABOLITOS SECUNDARIOS	43
9. CONCLUSIONES	45
10. LITERATURA CITADA	46
11. ANEXOS	51

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Esquema de la metodología de la prueba antagónica *Nocardiopsis* vs *Vibrio harveyi* en estriado.

Figura 2. Esquema de la metodología de la prueba antagónica *Nocardiopsis* vs *Vibrio harveyi* en gota.

Figura 3. Cepas CNY del género *Nocardiopsis* aisladas del sedimento de la Fosa de las Marianas en medio A1 sólido.

Figura 4. Árbol filogenético del gen 16S rRNA incluyendo las cepas CNY-900, CNY-902, CNY-903, CNY-904 y las cepas tipo de *Nocardiopsis* recuperadas de la base de datos bacterio.net.

Figura 5. Curvas de crecimiento de cada cepa CNY del género *Nocardiopsis* en medio A1 líquido.

Figura 6. Comparación de las curvas de crecimiento de las cepas CNY del género *Nocardiopsis* en medio A1 líquido.

Figura 7. Halos de inhibición transcurridas 6 horas. El efecto antibacteriano de los extractos con acetato de etilo de *Nocardiopsis* contra *Vibrio harveyi*.

Figura 8. Halos de inhibición transcurridas 18 horas. El efecto antibacteriano de los extractos con acetato de etilo de *Nocardiopsis* contra *Vibrio harveyi*.

Figura 9. Prueba antagónica *Nocardiopsis* vs *Vibrio* en estriado a las 24 horas de inóculo de la cepa patógena *Vibrio harveyi*.

Figura 10. Prueba antagónica *Nocardiopsis* vs *Vibrio* en estriado al sexto día de inóculo de la cepa patógena *Vibrio harveyi*.

Figura 11. Prueba antagónica *Nocardiopsis* vs *Vibrio* en estriado al día 20 de inóculo de la cepa *Nocardiopsis* y el día 16 del inóculo de *Vibrio harveyi*.

Figura 12. Prueba antagónica *Nocardiopsis* vs *Vibrio* en gota a las 24 horas de inóculo de la cepa patógena *Vibrio harveyi*.

Figura 13. Prueba antagónica *Nocardiopsis* vs *Vibrio* en gota al sexto día de sembrado de la cepa *Vibrio harveyi*.

Figura 14. Prueba antagónica *Nocardiopsis* vs *Vibrio* en gota al día 20 de inóculo de la cepa *Nocardiopsis* y el día 16 del inóculo de *Vibrio harveyi*.

Figura 15. Tipo de biosíntesis de los grupos de genes biosintéticos (BGCs) compartidos por las cepas de *Nocardiosis* con la cepa tipo del género *N. dassonvillei* (NCTC10488).

Figura 16. Productos de los grupos de genes biosintéticos (BGCs) compartidos entre las cepas del género *Nocardiosis* y la cepa tipo *N. dassonvillei* (NCTC10488). Se incluyen BGCs con una similitud de secuencia mayor al 50%.

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Valores del tiempo de duplicación correspondiente a las cuatro cepas del género *Nocardiosis*.

Tabla 2. Valores de la constante de crecimiento correspondiente a las cuatro cepas del género *Nocardiosis* calculadas a partir de la fase exponencial.

Tabla 3. Promedio y desviación estándar de halos de inhibición generados por el efecto antibacteriano contra *Vibrio harveyi* de los extractos químicos con acetato de etilo producidos por las cuatro cepas CNY del género *Nocardiosis*.

1. INTRODUCCIÓN

Los extremófilos son aquellos microorganismos que se desarrollan, habitan y sobreviven en condiciones extremas de diversos parámetros fisicoquímicos como temperatura, presión, salinidad, pH, oxígeno, entre otras variables (Velásquez *et al.*, 2018). En el planeta Tierra existen distintos ambientes extremos, por ejemplo, el océano profundo que se caracteriza por la ausencia de luz, altas presiones y otras condiciones ambientales críticas (Manivasagan *et al.*, 2013). Los microorganismos que se encuentran en los sedimentos profundos se les considera extremófilos, en particular encontrándose microorganismos barófilos (piezófilos) y barotolerantes (piezotolerantes). Los barófilos son aquellos que crecen a presiones superiores o iguales a 350 atm, mientras que los barotolerantes viven, crecen y se reproducen a 1 atmósfera de presión atmosférica, pero son capaces de crecer a altas presiones, aunque su tasa de crecimiento no sea óptima (Abe y Horikoshi, 2001). Algunas adaptaciones que presentan los microorganismos barófilos y barotolerantes es la gran concentración de ácidos grasos insaturados en la membrana plasmática y una tasa de crecimiento relativamente lenta (Ramírez *et al.*, 2006). Algunas aplicaciones del metabolismo de los barófilos son el uso de las enzimas que producen, utilizadas en distintas ramas de la industria por su tolerancia y función a altas presiones; no obstante, en la actualidad hay pocos usos prácticos por lo complicado que es su cultivo bajo las condiciones extremas necesarias (Ramírez *et al.*, 2006).

Las zonas hadales del océano (> 6000 m) representan el 45% de toda la profundidad del océano siendo principalmente fosas marinas (depresiones alargadas del fondo marino) formadas en zonas de subducción. Las características fisicoquímicas que presentan las zonas hadales son temperaturas que fluctúan entre los 1.0 y 2.5°C, salinidades de entre 34 y 35, pH de 7.7-7.8, presiones superiores a 350 atm y concentraciones de oxígeno disuelto de 90-170 µM. Los nutrientes son escasos, pero presentan mayores concentraciones de materia orgánica en comparación a las aguas suprayacentes. La mayor concentración de materia orgánica se debe a la morfología de las fosas,

principalmente por sus pronunciadas pendientes que funcionan como embudo, acumulando el material en el punto más profundo de su interior (Olivares-Mendoza, 2022). Los sedimentos profundos pueden llegar a ser abundantes en microorganismos. Por ejemplo, Bull y colaboradores (2005) mencionan que el sedimento de los mares profundos contiene más de 1 billón de células/cm³. Un ambiente extremo de gran interés para la comunidad científica es la Fosa de las Marianas debido a que se ha demostrado que sus sedimentos son ricos en carbono orgánico, así como en abundancia y diversidad de microorganismos (Peng *et al.*, 2021). La Fosa de las Marianas es una zona hadal, alcanzando casi los 11 km y una presión de 1100 atm. Se encuentra ubicada en el Océano Pacífico Occidental a unos 200 km de las Islas Marianas pertenecientes a Estados Unidos de América, formada por la subducción de la placa del Pacífico respecto a la placa del Este Filipina (Hsui y Youngquist, 1985).

Algunos géneros de bacterias extremófilas que habitan zonas hadales, como la Fosa de las Marianas, pertenecen al grupo de las actinobacterias. Las actinobacterias pertenecen al filo Actinomycetota (Goodfellow, 2021) el cual es uno de los filos del dominio Bacteria que se caracteriza por ser extenso, diverso y complejo. Se encuentra dividido en seis clases, Acidimicrobiia, Actinomycetes, Coriobacteriia, Nitriliruptoria, Rubrobacteria, y Thermoleophilia (Oren y Garrity, 2021). Las actinobacterias son bacterias Gram positivas, pueden ser aerobias, anaerobias facultativas, o anaerobias, y tienen una amplia variedad de fenotipos que van desde cocos hasta micelios (Álvarez *et al.*, 2017). Algunos grupos se distinguen por producir esporas como agentes de dispersión y supervivencia, por ello la mayoría de este grupo bacteriano tiene la capacidad de formar un micelio radial para captar nutrientes (Maier *et al.*, 2000 y Prieto-Davó *et al.*, 2008).

Las actinobacterias marinas tienen una amplia diversidad fisiológica y propiedades metabólicas ligadas a su capacidad de generar metabolitos secundarios que dan lugar a compuestos activos. Por ejemplo, algunos de los metabolitos secundarios dan lugar a sustancias puras o mezcla de sustancias que

pueden ejercer una acción farmacológica, inmunológica o metabólica, como moléculas antibióticas que generan actividad y bioactividad como la inhibición de enzimas, biosurfactantes, probióticos, entre otros. Debido a la cualidad de los metabolismos secundarios de estas bacterias, se han utilizado como herramientas para aplicaciones en distintas ramas de la ciencia, como es en el área farmacéutica y biotecnológica específicamente en la biorremediación (Álvarez *et al.*, 2017). En la actualidad, la gran mayoría de los farmacéuticos de origen natural han sido descubiertos de las actinobacterias, siendo el 70% de los fármacos naturales que se utilizan como anticancerígenos, antifúngicos, antibacterianos, antihelmínticos e inmunosupresores (Shi *et al.*, 2022). Considerando su potencial para producir compuestos activos, resulta relevante explorar el metabolismo secundario de géneros de actinobacterias adaptadas a las condiciones extremas como las que ocurren en la Fosa de las Marianas, particularmente por parte de géneros relativamente raros como *Nocardiopsis*.

2. ANTECEDENTES

Dentro del filo Actinomycetota, existe el género *Nocardiopsis* que forma parte de la clase Actinomycetia, orden Streptosporangiales y familia Nocardiopsaceae (Shi *et al.*, 2022). En ambientes terrestres y marinos, el género *Nocardiopsis* se ha relacionado con asociaciones simbióticas con especies de invertebrados y vertebrados, en las que las bacterias obtienen nutrientes y protección, mientras que los simbiositos se protegen con los compuestos activos que sintetizan las bacterias (Lee *et al.*, 2001). Además, este género también se ha encontrado en sedimentos de ambientes extremos de salinidad, temperatura y pH, como el desierto del Sahara en Argelia y en la Antártica (Bennur *et al.*, 2015). Por ejemplo, Abyzov y colaboradores (1983) mencionan el registro de la especie *N. antarcticus* en los sedimentos de la Antártida, y recientemente se descubrió otra cepa aislada de una muestra de suelo en la costa oeste de la península Fildes de la Antártica perteneciente a *N. fildesensis* (Xu *et al.*, 2014). En cuanto a las cepas encontradas en el desierto de Sahara, todas se encontraban relacionadas a *N. litoralis* y *N. xinjiangensis* de acuerdo al gen 16S rRNA. Estas cepas del desierto

de Sahara presentan un potencial genómico con actividad biológica (Meklat *et al.*, 2011).

Nocardioopsis sp. produce una gran variedad de rutas biosintéticas como PKS y NRPS. También se ha documentado diversidad de compuestos químicos como la pendolmicina, apoptolidinas, griseusinas, lipopéptidos y naftoespirononas, entre otros compuestos. La diversidad de rutas biosintéticas y de compuestos químicos que generan se ha experimentado que tienen actividad biológica, como actividad antifúngica, anticancerígena, y antibiótica (Bennur *et al.*, 2015). Por ejemplo, las rutas de PKS y NRPS, se encuentran estructuras químicas del tipo hexapéptidos cíclicos que tienen actividad antimicrobiana; otro ejemplo es la especie *N. trehalosei* que presenta una ruta para la producción de un antibiótico del tipo 3-trehalosamina, *N. mutabilis* produce dopsimina (Wu *et al.*, 2013 en Adlin-Jenifer *et al.*, 2019) y otras especies de *Nocardioopsis* que viven en sedimentos marinos producen un antibiótico tiopéptidico con un cierto porcentaje de aminocetona (Bennur *et al.*, 2015). Estas especies productoras de antibióticos, en el medio natural utilizan las rutas metabólicas secundarias para beneficio propio, ya que funcionan químicamente para eliminar otras bacterias y hongos que compiten por nutrientes disponibles (Bennur *et al.*, 2015).

El antagonismo bacteriano que existe en el ambiente marino, también está presente en la industria de la acuicultura. Destacando el género *Vibrio* sp. que causa vibriosis infectando a organismos como el camarón blanco *Litopenaeus vannamei* (Jayasree *et al.*, 2006) y otras especies marinas como camarones *Penaeus monodon*, *Penaeus japonicus* (Cuéllar-Anjel, 2013); peces como *Salmo salar*, *Scophthalmus maximus*, *Dicentrarchus labrax*, *Sparus aurata*, *Gadus morhua*, entre otros (Amaro *et al.*, 2013). Para combatir las enfermedades causadas por las bacterias oportunistas y patógenas se han realizado estudios con antibióticos naturales provenientes de microorganismos marinos, en particular el género *Nocardioopsis*, por su variedad de metabolitos secundarios antibacterianos y su potencial farmacológico (Ibrahim *et al.*, 2018). Sunish y

colaboradores (2021) documentan que *N. alba* tiene potencial bioactivo *in vitro* contra *Vibrio harveyi* y se ha propuesto como probiótico en la acuicultura. Mientras que Adlin-Jenifer y colaboradores (2019) han aislado diversas especies de *Nocardiosis* en ambientes hipersalinos del sur de India incluyendo *N. salina*, *N. alba* y *N. lucentensis* con actividad antibacteriana contra *Vibrio parahaemolyticus*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Aeromonas hydrophila*. Y actividad antifúngica contra *Aspergillus niger*, *Fusarium* sp., y *Pythium* sp. (Adlin-Jenifer *et al.*, 2019)

Generalmente, para el descubrimiento de compuestos bioactivos, existen dos aproximaciones que se complementan: 1) extracciones químicas y 2) herramientas de minería de genomas. Las extracciones químicas van de la mano con bioensayos que prueban las actividades antimicrobianas, antifúngicas, anticancerígenas, etc. de los compuestos. Por otra parte, los estudios genómicos ayudan a demostrar la presencia de genes biosintéticos que dan lugar a los compuestos bioactivos. Mediante herramientas bioinformáticas, se compara el genoma con repositorios de genomas conocidos para identificar las rutas secundarias y los tipos de productos (Ziemert *et al.*, 2016).

El genoma completo de un microorganismo comprende el total de su material genético, y se diferencia en dos partes; la que tiene los genes núcleo y la parte que tiene genes accesorios (Li *et al.*, 2013). La parte núcleo del genoma es aquella que presenta los genes que codifican las funciones esenciales de la célula, mientras que los genes accesorios son aquellos que no todas las cepas tienen debido a la evolución de su genoma (pérdida o ganancia de genes). Estos genes sólo se presentan cuando la célula los requiere por cuestiones de adaptabilidad como complemento de las funciones básicas (Li *et al.*, 2013). La diversa producción de metabolitos secundarios, son parte de los genes accesorios y son evidencia de la adaptabilidad a las condiciones de estrés, a los ambientes extremos en los que viven, crecen y se reproducen. Por ejemplo, el genoma de las bacterias se encuentra expuesto a la pérdida y ganancia de genes debido a procesos evolutivos y de transferencia horizontal. La pérdida de genes promueve

la creación de nuevas especies; mientras que la ganancia de genes, promueve la versatilidad de las especies ecológicamente (Li *et al.*, 2013). Por ejemplo, la gran adaptabilidad de *Nocardiopsis* spp., es una estrategia importante para mantener flexibilidad genómica y sobrevivir a diferentes ambientes extremos.

El estudio de las bacterias extremófilas como algunas especies de *Nocardiopsis* sp., permite contribuir a enriquecer la filogenia de especies microbianas y provee información del origen de la vida y la vida en ambientes con condiciones ambientales extremas (Ramírez *et al.*, 2009). Además, en el campo biotecnológico y farmacéutico, representa una oportunidad para identificar nuevas rutas metabólicas y compuestos con potencial para el desarrollo de productos industriales y fármacos para combatir enfermedades.

3. ÁREA DE ESTUDIO

En el océano Pacífico existe la cavidad submarina más profunda de la Tierra con una profundidad de 10,915 m (Taira *et al.*, 2004), conocida como "Challenger Deep" o "Abismo Challenger" en español, y está ubicada en la Trincheras de las Marianas (11°22'N, 142°25'E) (Kato, 1998). El sedimento en la zona abisal se caracteriza por ser de limos y arcillas, un fondo plano y uniforme en todas las direcciones. Se ha encontrado que los sedimentos provenientes de la trincheras son ricos en carbono orgánico, propiciando la alta densidad, diversidad y actividad de microorganismos, en este caso barotolerantes y barófilos (Peng *et al.*, 2021).

4. HIPÓTESIS

Los genomas de las cepas del género *Nocardiopsis* aisladas del sedimento de la Fosa de las Marianas presentan rutas de metabolismo secundario que producen compuestos bioactivos con potencial antimicrobiano contra una cepa patógena del género *Vibrio*.

5. OBJETIVOS

5.1. OBJETIVO GENERAL

Analizar y comparar el metabolismo secundario de cuatro genomas de actinobacterias del género *Nocardiopsis* aisladas de sedimento de la Fosa de las Marianas.

5.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar la relación filogenética de cuatro cepas de *Nocardiopsis* (CNY-900, CNY-902, CNY-903 y CNY-904).
- Comparar las rutas metabólicas secundarias entre las cuatro cepas del género *Nocardiopsis* y la cepa tipo más cercana filogenéticamente.
- Establecer y comparar las fases de crecimiento de cuatro cepas de *Nocardiopsis* (CNY-900, CNY-902, CNY-903 y CNY-904).
- Determinar la actividad antibacteriana de extractos crudos de las cuatro cepas de *Nocardiopsis* contra *Vibrio harveyi*.

6. METODOLOGÍA

6.1. TRATAMIENTO DE SEDIMENTO Y AISLAMIENTO BACTERIANO

Para el aislamiento de cepas de actinobacterias se utilizó una muestra de sedimento de la Fosa de las Marianas, que fue recolectada utilizando el sumergible “DEEPSEA CHALLENGER” por medio de un brazo manipulador creado específicamente para muestras sedimentarias (Schrope, 2012). La muestra de sedimento se tomó a 10,898.5 m de profundidad, y una alícuota de la muestra fue proporcionada por el laboratorio del Dr. Douglas Bartlett de Scripps Institution of Oceanography de la Universidad de California San Diego en Estados Unidos de América.

Para realizar el cultivo y aislamiento de cepas de actinobacterias, la alícuota de sedimento se dejó secar en una campana de extracción por 24 horas y se

procedió a estamparlo con una esponja estéril en placas Petri con medio A1 y medio Seawater agar (SWA). El medio A1 contiene 22 g l⁻¹ de sal, 10 g l⁻¹ almidón, 4 g l⁻¹ levadura, 2 g l⁻¹ peptona, 14 g l⁻¹ agar, y el medio SWA contiene 75% agua de mar, 25% agua destilada y 14 g l⁻¹ de agar. Una vez presentado crecimiento en las placas Petri de los dos cultivos, se procedió a realizar cajas de purificación de cada cepa en medio A1.

6.2. ANÁLISIS FILOGENÉTICOS

Las cepas purificadas se cultivaron en 25 ml de medio líquido A1 y se extrajo ADN a partir de pellets bacterianos utilizando el kit Qiagen DNeasy Blood & Tissue. Posteriormente se realizó la amplificación del gen 16S rRNA (utilizando el método en Zamora *et al*, 2022) para conocer la cepa tipo más cercana a nuestras cepas de interés. El árbol filogenético se realizó con el programa Geneious, utilizando el gen 16S rRNA de las cepas CNY y de todas aquellas especies y subespecies que representan cepas tipo de bacterias del género *Nocardiosis* y de géneros cercanos filogenéticamente, procedentes del repositorio Bacterio.net. Se realizó un alineamiento con todas las secuencias y se generó un árbol utilizando el método de Máxima-Verosimilitud utilizando 1000 réplicas de soporte y utilizando el modelo más complejo de GTR+GAMMA.

Adicionalmente el ADN genómico se envió a secuenciar a la compañía SeqCenter (<http://seqcenter.com/>) utilizando la metodología de secuenciación Illumina NextSeq 2000. La asignación taxonómica se obtuvo utilizando el algoritmo K-mer (KmerFinder 3.2) en la página de “Center for Genomic Epidemiology” (<https://www.genomicepidemiology.org/>) y se obtuvo la cepa tipo más cercana a las cuatro cepas.

6.3. CURVAS DE CRECIMIENTO

Para medir el crecimiento de las cepas CNY-900, CNY-902, CNY-903, y CNY-904, cada cepa se inoculó a partir de una placa Petri, a un matraz con 50 mL de medio A1, y se dejó crecer durante cuatro días a una temperatura de 28°C y en agitación constante a 150 rpm. Posteriormente, se inoculó 1 mL de cultivo

estandarizado a un valor de 1 de absorbancia, en matraces con 100 mL de medio A1, por triplicado, creciendo a la temperatura y agitación iniciales. Cada 24 horas, por ocho días, se tomó lectura de la absorbancia de cada muestra en celdas de plástico en un espectrofotómetro (Espectrofotómetro UV-VIS N4S) a 600 nm. La curva de crecimiento se graficó utilizando la absorbancia y el tiempo de incubación en horas. Se identificaron las fases de la curva (fase latencia, exponencial, estacionaria y de muerte) en base a la pendiente. Se calculó la constante de crecimiento (1) a partir de la fase exponencial y el tiempo de duplicación (2) de cada cepa.

$$k = \frac{n}{t} \quad (1)$$

Donde: k es la constante de crecimiento, n es el número de generaciones y t el tiempo.

$$T = \frac{\ln 2}{k} \quad (2)$$

Donde: k es la constante de crecimiento y T el tiempo de generación.

6.4. EXTRACCIÓN QUÍMICA

Para la obtención de los extractos crudos de las cepas de actinobacterias, se realizó una extracción química a partir de los cultivos de cada cepa; este procedimiento se llevó a cabo por duplicado. La extracción química se inició con la preparación de medio de cultivo A1 líquido donde se utilizaron matraces con 100 mL de medio, en los cuales se inocularon las cepas desde 1 mL de criopreservado. Se dejaron crecer a 28°C y en agitación constante a 150 rpm por 72 horas, para luego centrifugar (Eppendorf Centrifuge 5430 R) a 7830 rpm por 10 min y decantar el medio líquido hasta obtener 2 mL de pellet en tubos Falcon. Posteriormente, se inocularon los 2 mL obtenidos en 100 mL de medio A1.

Los matraces inoculados se colocaron en las condiciones de temperatura y agitación antes mencionadas. Posterior a las 72 horas de inoculación, se agregaron 1.5 gr de resina amberlita XAD-7 HP estéril a los cultivos para la extracción de los compuestos químicos que las células liberan al medio. Después

de 24 horas, los cultivos se centrifugaron y se decantó el sobrenadante hasta obtener un pellet de células y amberlita. Los pellets obtenidos se colectaron en tubos Falcon y se colocaron a una temperatura de -66°C para posteriormente liofilizarlos por 24 horas. Posteriormente se realizó una extracción de partición. Para una primera extracción, una vez liofilizadas las muestras, se homogeneizaron con una varilla de vidrio estéril en un matraz y se les agregó 50 mL de acetato de etilo. Se dejaron en agitación por 1 hora y después se filtraron los 50 mL de extracto sin desechar la amberlita. Para una segunda extracción, se repitió el procedimiento anterior utilizando metanol como disolvente.

Una vez obtenidos los extractos químicos se procedió a eliminar los solventes por rotaevaporación y así obtener los extractos crudos. El proceso de rotaevaporación de los extractos de acetato de etilo se realizó a 60°C y 65 cmHg, mientras que los de metanol fueron rotaevaporados a 55°C y de 50-55 cmHg. Una vez concentrados los extractos crudos se colocaron en un vial de centelleo previamente pesado. Los compuestos extraídos con metanol se filtraron usando filtros Whatman $0.2\ \mu\text{m}$ para eliminar sales precipitadas.

6.5. BIOENSAYOS ANTIMICROBIANOS

Para los bioensayos antimicrobianos se siguió el método de difusión en agar (método Kirby-Bauer), el cual se basa en establecer cuantitativamente el efecto de un conjunto de sustancias químicas en cepas patogénicas (Vazquez-Pertejo, 2022). Los extractos fueron pesados y se les agregó el solvente necesario para su extracción en relación peso/volumen. Para ello, la bacteria patógena (*Vibrio harveyi*) se inoculó con un hisopo estéril uniformemente en la placa Petri, e inmediatamente después, se colocaron tres sensidiscos sensidiscos de 6mm de diámetro conteniendo 10 uL de extracto crudo a una concentración de $0.1\ \text{mg}/\mu\text{L}$. Dejándose en incubación a 33°C por un tiempo máximo de 24 horas de incubación, monitoreando cada 6 horas el crecimiento de la cepa *Vibrio harveyi* y la inhibición generada por los extractos.

El halo de inhibición se midió en milímetros, con una regla, considerando solamente zonas sin crecimiento. Con base en el tamaño del halo de inhibición la respuesta del patógeno al extracto se interpretó como resistente (≤ 10 mm), intermedio (de 11 a 15 mm) o susceptible ($16 \geq$ mm). Estos bioensayos se realizaron por duplicado. El efecto de los extractos crudos en el crecimiento del patógeno se comparó con la respuesta a los controles positivo y negativo. Como control positivo se utilizó Florfenicol al 10%, considerando su función antibiótica contra bacterias Gram positivas y Gram negativas, los controles negativos utilizados fueron los solventes de los extractos (metanol y acetato de etilo) y el medio A1 líquido.

6.6. PRUEBAS DE ANTAGONISMO MICROBIANO

Se desarrollaron dos metodologías para observar la capacidad antagónica de las cepas CNY contra una bacteria patógena (*Vibrio harveyi*) utilizando el medio de cultivo A1, y con un crecimiento estandarizado del inóculo de 0.50 de absorbancia_{600m}. En la primera metodología, se realizó un estriado hasta la mitad de la placa Petri de cada una de las cepas CNY y en la otra mitad se estrió la bacteria patógena *Vibrio harveyi*, como se muestra en el siguiente esquema.

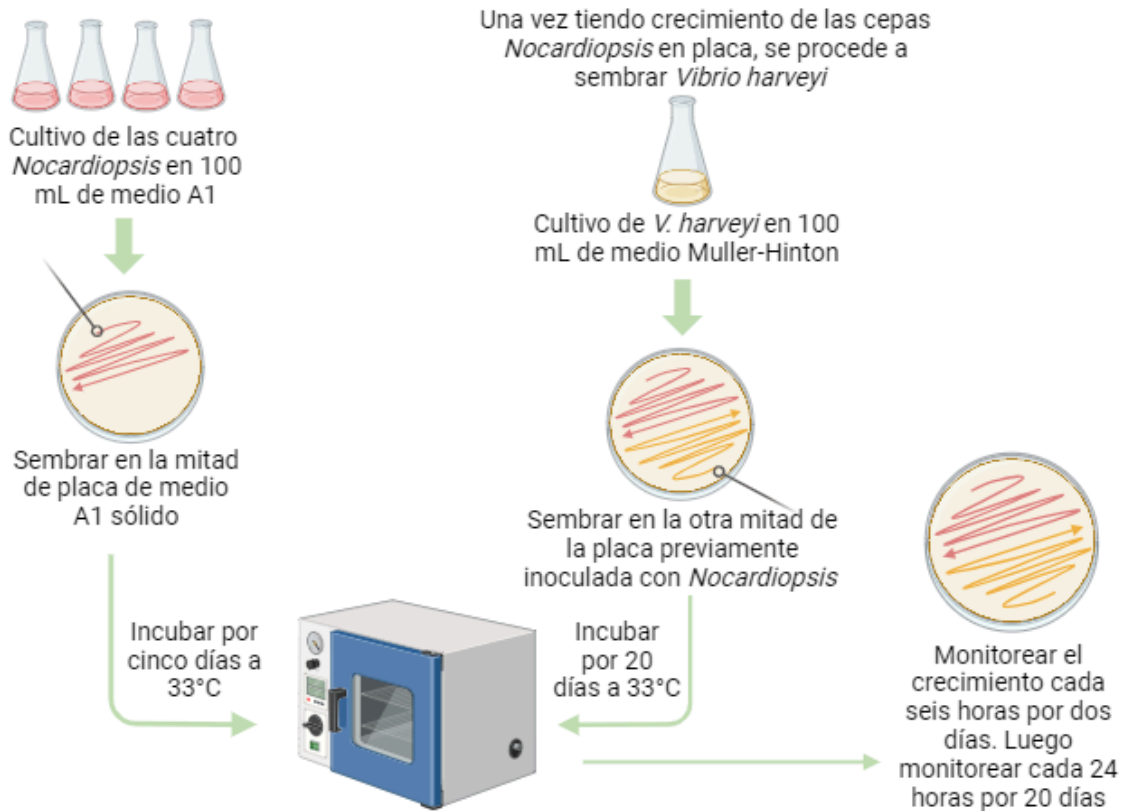


Figura 1. Esquema de la metodología de la prueba antagonica *Nocardiosis* vs *Vibrio harveyi* en estriado. El esquema se realizó en la página de BioRender.

La segunda metodología consistió en aplicar una gota (10 uL) de inóculo de las CNY, y adyacente a ella, una gota (10 uL) del inóculo de *Vibrio harveyi* previamente estandarizada a 0.5 de absorbancia. El método se muestra en el siguiente esquema.

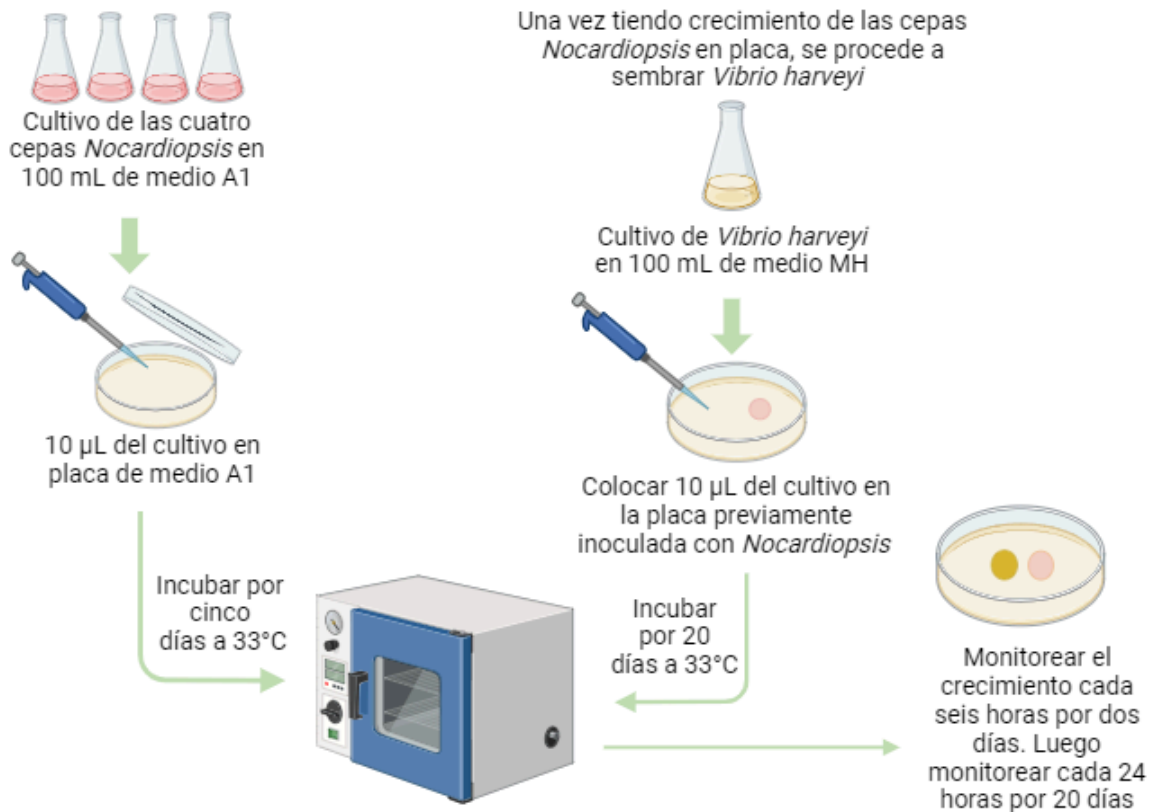


Figura 2. Esquema de la metodología de la prueba antagónica *Nocardiosis* vs *Vibrio harveyi* en gota. El esquema se realizó en la página de BioRender.

6.7 ANÁLISIS GENÓMICO DE METABOLITOS SECUNDARIOS

El análisis genómico de metabolitos secundarios de las cuatro cepas de *Nocardiosis* sp. y la cepa tipo *Nocardiosis dassonvillei* (NCTC10488) se realizó utilizando el programa de identificación y anotación en línea antiSMASH (bacterial versión 7.0.1). Cada genoma se analizó en modalidad de detección relajada y se evaluó el número y clase de rutas de metabolismo secundario. Considerando el producto de la ruta y su estructura, la familia a la que pertenece, y el porcentaje de similitud que tiene el tipo de compuesto con el producto.

6.8 ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

Los análisis estadísticos que se utilizaron para las curvas de crecimiento de las cuatro cepas son análisis básicos de promedio y desviación estándar. Es decir, se

promediaron las absorbancias de cada medición de los triplicados para obtener una sola curva de crecimiento por cepa.

Para los antibiogramas, con resultados no significativos de inhibición, sólo se presentan estadísticos básicos de promedio y desviación estándar.

7. RESULTADOS

7.1. AISLAMIENTO BACTERIANO

A partir de la alícuota de sedimentos se obtuvieron cuatro cepas, las cuales se denominaron como: CNY-900, CNY-902, CNY-903 y CNY-904. De manera general, las colonias en un inicio muestran una coloración blanca translúcida, con el tiempo se observó la formación de esporas color blanco dando una apariencia aterciopelada a las colonias, eventualmente las esporas se tornan más oscuras tendiendo a una tonalidad amarilla. Respecto a la morfología de las colonias, las cepas CNY-900 y CNY-904 presentaron relieves, mientras que las cepas CNY-902 y CNY-903 se mostraron sin relieve y con textura grumosa.

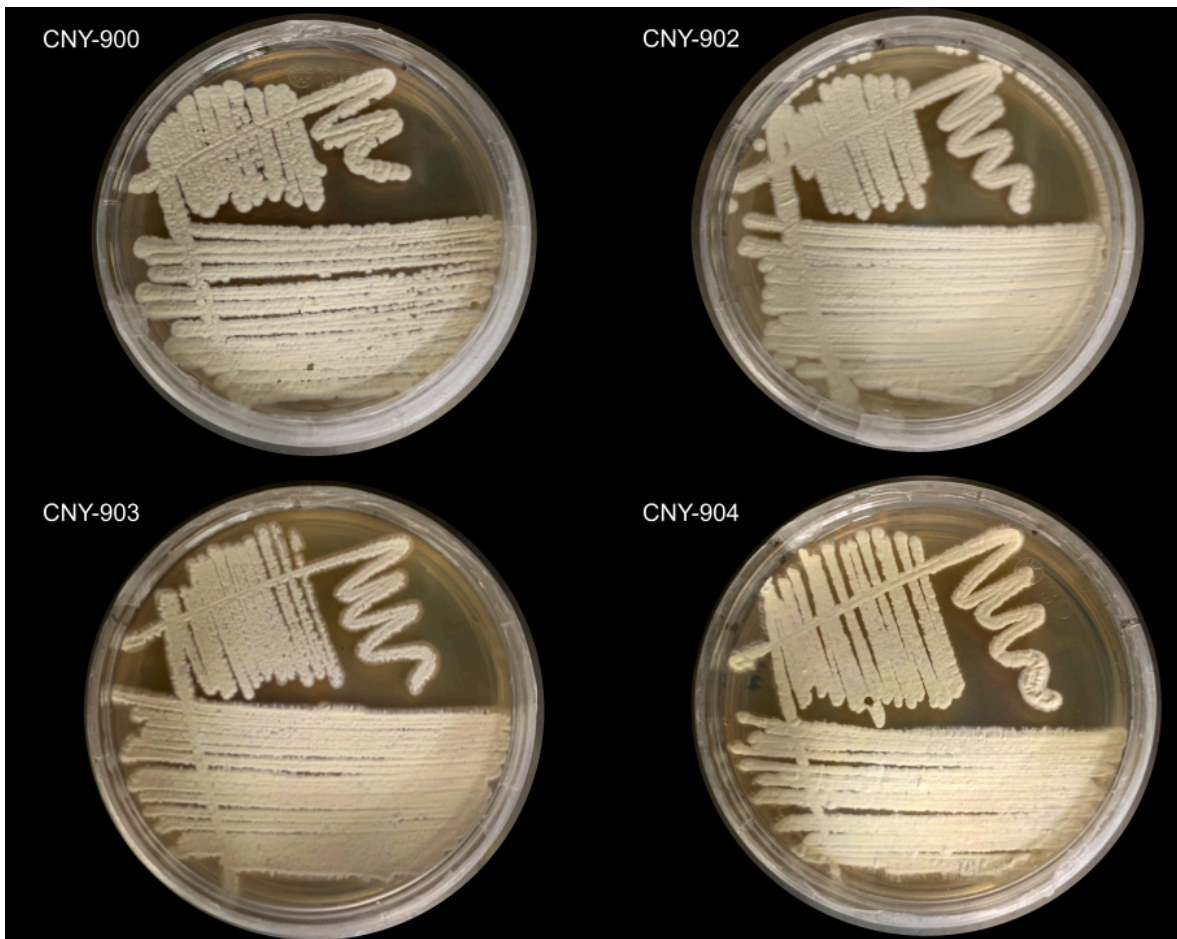


Figura 3. Cepas CNY del género *Nocardiopsis* aisladas del sedimento de la Fosa de las Marianas en medio A1 sólido.

7.2. ÁRBOL FILOGENÉTICO

La afiliación taxonómica utilizando las secuencias del gen 16S rRNA (aproximadamente 1380 pb) fueron utilizadas para realizar un árbol filogenético utilizando el método de máxima verosimilitud (Fig. 4). Las cuatro cepas CNY se encuentran agrupadas en un mismo clado, siendo *Nocardiopsis umidischolae* la más cercana filogenéticamente.

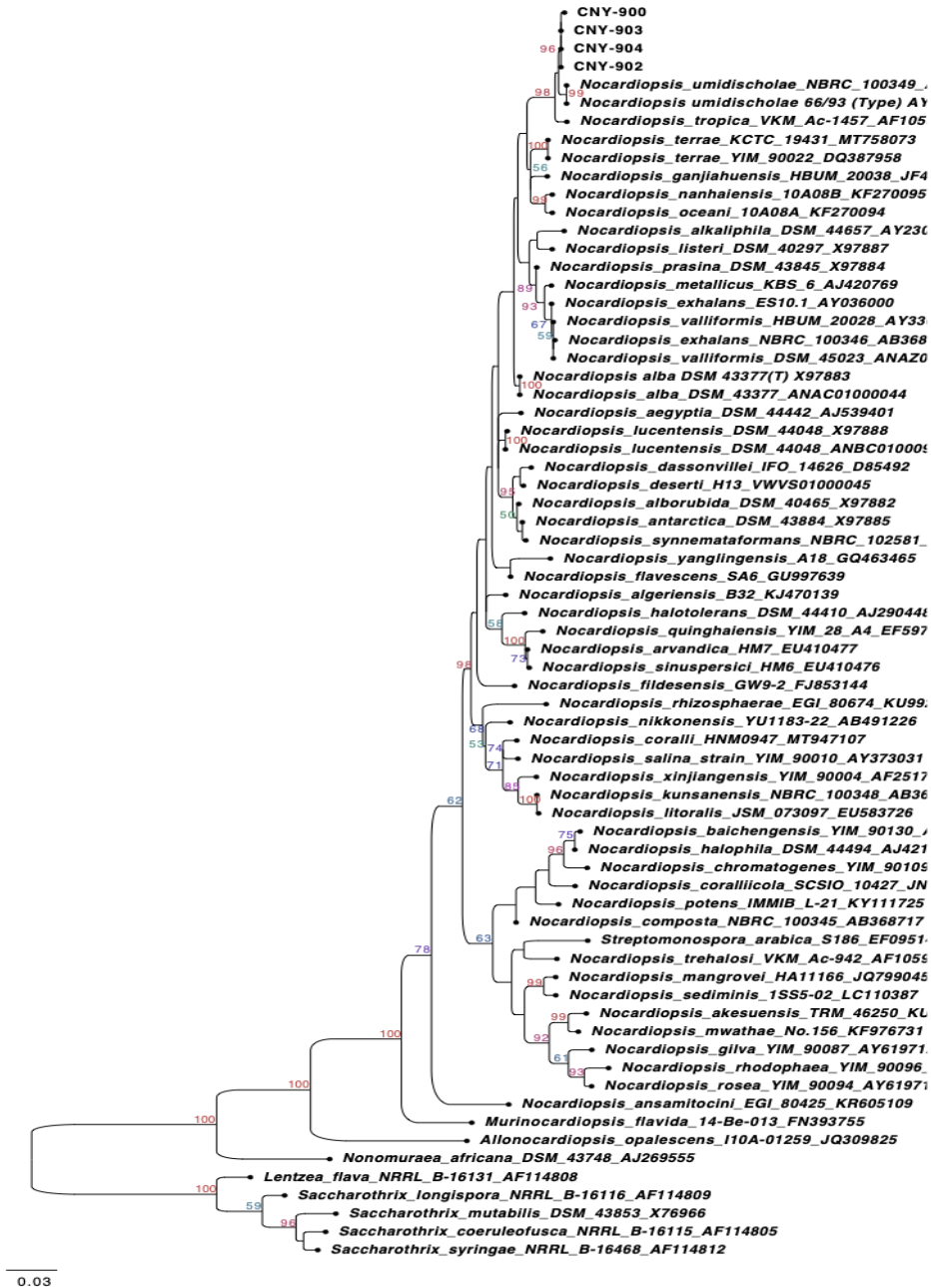


Figura 4. Árbol filogenético del gen 16S rRNA incluyendo las cepas CNY-900, CNY-902, CNY-903, CNY-904 y las cepas tipo de *Nocardiothrix* sp. recuperadas de la base de datos bacterio.net. Se utilizó el método de máxima verosimilitud utilizando el modelo de GTR+GAMMA y con 1000 réplicas de soporte. Los valores de soporte mayor al 50% se muestran en cada clado.

7.3. CURVAS DE CRECIMIENTO

Con base en la variación en el crecimiento celular de las cepas de *Nocardiosis* se generaron curvas de crecimiento para cada cepa. Para cada curva de crecimiento se identificaron las distintas fases de acuerdo a la pendiente. (Fig. 5). La fase latente se observó durante las primeras 24 horas, posterior se observó el crecimiento exponencial bacteriano hasta las 48 horas. La fase estacionaria se observa después de las 48 horas y termina a las 96 horas. Posteriormente se observó el inicio de la fase de muerte. Las curvas de crecimiento de las cepas *Nocardiosis* tienen una duración de 8 días y un comportamiento similar con pequeñas diferencias en la absorbancia. Por ejemplo, en la fase de latencia la CNY-900 y CNY-904 tiene el mismo valor de 0.4, seguida de CNY-902 y CNY-903 con un valor de 0.5. En la fase exponencial, CNY-900 alcanza la mayor absorbancia de 1.5, CNY-902 con 1.4, CNY-903 con 1.3 y CNY-904 con 1.4. Durante la fase estacionaria la CNY-900 y CNY-902 se igualan con una absorbancia de 1.8, mientras que CNY-904 presenta 1.7 y CNY-903 1.6. En la fase de muerte la CNY-900, CNY-903 y CNY-904 alcanzan 1.3 de absorbancia, aunque su comportamiento durante esta fase es diferente, por otra parte la CNY-902 disminuye hasta 1.2 de abs (Fig. 6).

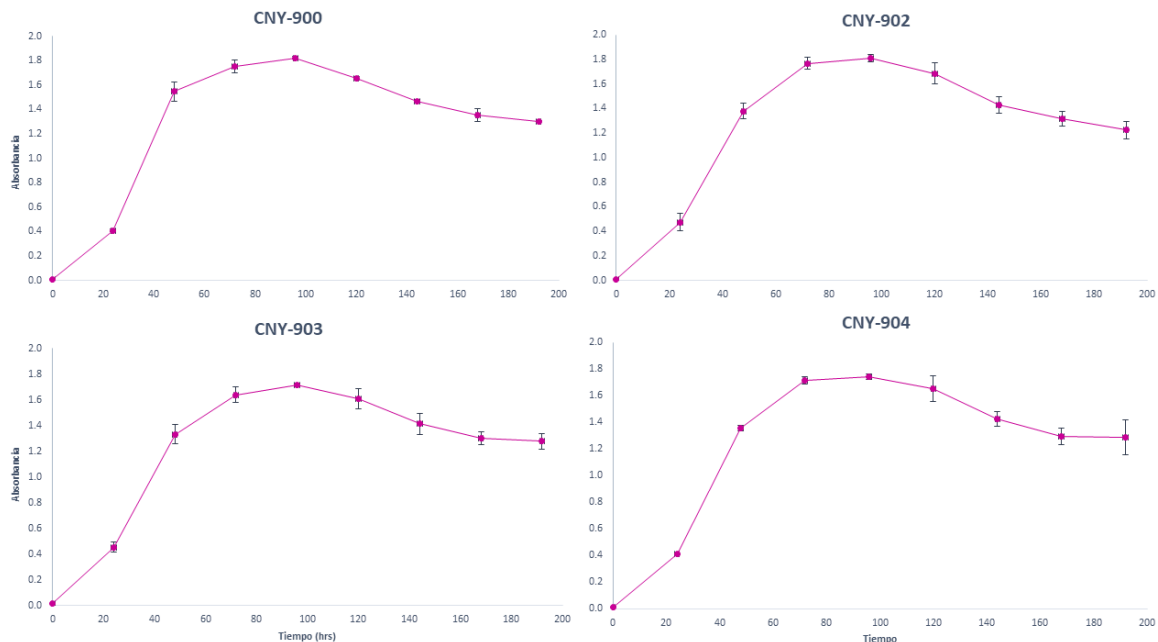


Figura 5. Curvas de crecimiento de cada cepa CNY del género *Nocardiosis* en medio A1 líquido. Las barras de error indican desviación estándar.

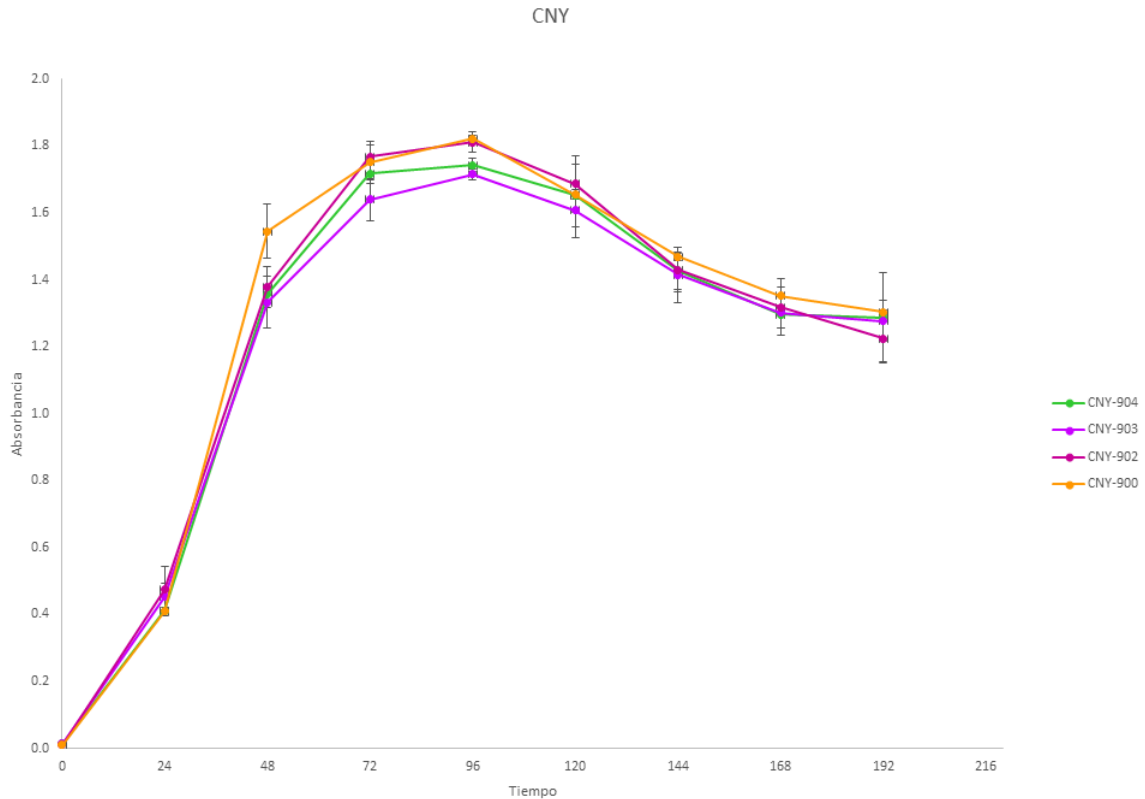


Figura 6. Comparación de las curvas de crecimiento de las cepas CNY del género *Nocardiosis* en medio A1 líquido. Las barras de error indican desviación estándar.

A partir de la fase exponencial, se obtuvo la constante de crecimiento de cada cepa. La cepa CNY-900 presenta un valor mayor de constante de crecimiento (0.055), seguida de la CNY-904 (0.050), y con un valor inferior de 0.045 la CNY-902 y CNY-903 (Tabla 1). Por otra parte, la CNY-902 presenta el mayor tiempo de duplicación, mientras que la CNY-904 la de menor tiempo (Tabla 2).

Tabla 1. Valores de la constante de crecimiento correspondiente a las cuatro cepas del género *Nocardiopsis* calculadas a partir de la fase exponencial.

Cepa	Constante de crecimiento (k)
CNY-900	0.055
CNY-902	0.045
CNY-903	0.045
CNY-904	0.050

Tabla 2. Valores del tiempo de duplicación correspondiente a las cuatro cepas del género *Nocardiopsis*.

Cepa	Tiempo de duplicación (T) en horas
CNY-900	12.512
CNY-902	15.576
CNY-903	15.403
CNY-904	13.919

7.4.BIOENSAYOS ANTIMICROBIANOS

La medición de los halos de inhibición evidencia que los extractos crudos de metanol, a una concentración de 0.1 mg/μL, no presentan actividad antibacteriana contra la cepa patógena del género *Vibrio* (Fig. S1). La cepa CNY-900 presenta menor densidad bacteriana alrededor de los sensidiscos, pero no inhibición. Los controles negativos no presentaron inhibición y el control positivo fue de 40 mm (Fig. S2).

Por otra parte, los extractos de acetato de etilo si presentan inhibición. A las 6 horas de crecimiento de la cepa patógena *Vibrio*, los extractos presentaron inhibición cuando la densidad microbiana era baja (Fig. 7). De acuerdo con los milímetros medidos se interpreta que, a las 6 horas la cepa patógena tiene resistencia intermedia a los extractos de la CNY-900 (14±1.22) y CNY-902 (14±1.94), y es susceptible a los extractos de CNY-903 y CNY-904. A partir de las 12 horas de crecimiento aumentó la densidad microbiana y los halos se pudieron distinguir claramente, la CNY-900 y CNY-904 presentaron mayor inhibición (Fig. 8).

A las 18 y 24 horas los halos fueron disminuyendo (Tabla 3). Se considera que después de 12 horas, el efecto inhibitorio de *Nocardiosis* disminuye, y *V. harveyi* comienza a reproducirse.

Tabla 3. Promedio y desviación estándar de halos de inhibición antibacteriano de los extractos de acetato de etilo de *Nocardiosis* contra *Vibrio harveyi*. La medición corresponde a los milímetros menos la medida del sensidisco (6mm).

Cepa	Halo de inhibición (mm)			
	6 horas	12 horas	18 horas	24 horas
CNY-900	14 ± 1.22	7 ± 1.33	6 ± 2.19	5 ± 1.41
CNY-902	14 ± 1.94	6 ± 0.82	4 ± 1.03	5 ± 1.10
CNY-903	17 ± 1.52	7 ± 1.52	4 ± 0.82	3 ± 1.05
CNY-904	16 ± 0.42	9 ± 0.82	6 ± 1.60	6 ± 1.47

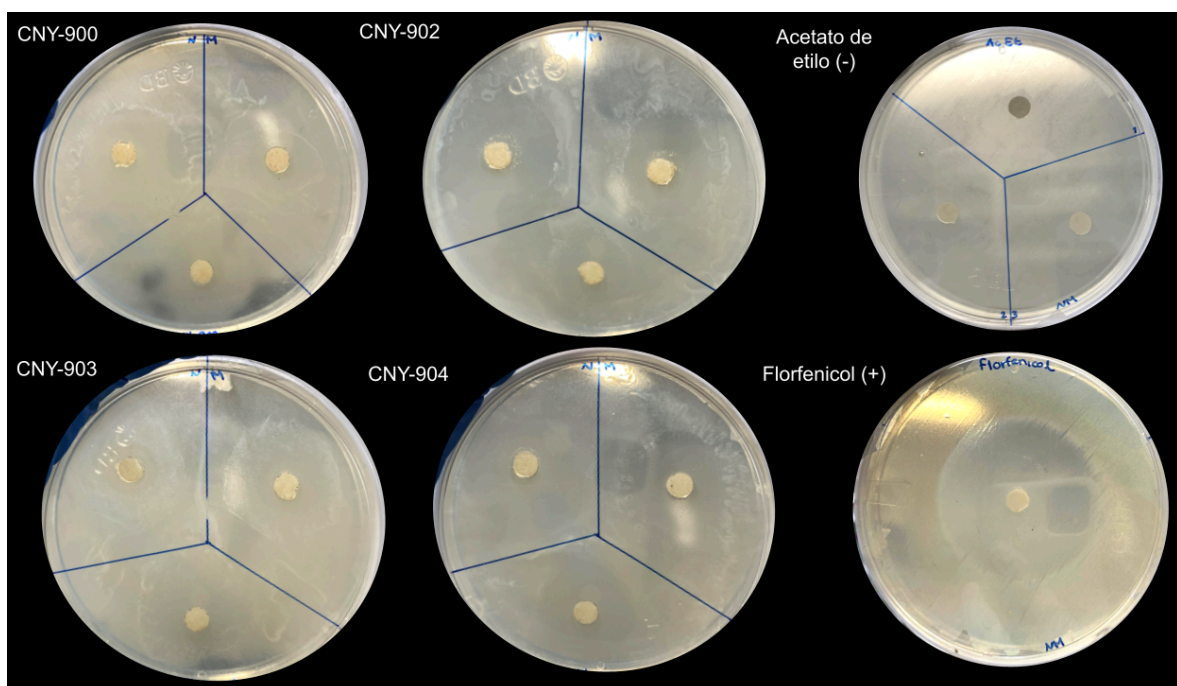


Figura 7. Halos de inhibición transcurridas 6 horas. El efecto antibacteriano de los extractos con acetato de etilo de *Nocardiosis* contra *Vibrio harveyi*. Se incluyen control negativo (derecho superior) y positivo (derecho inferior).

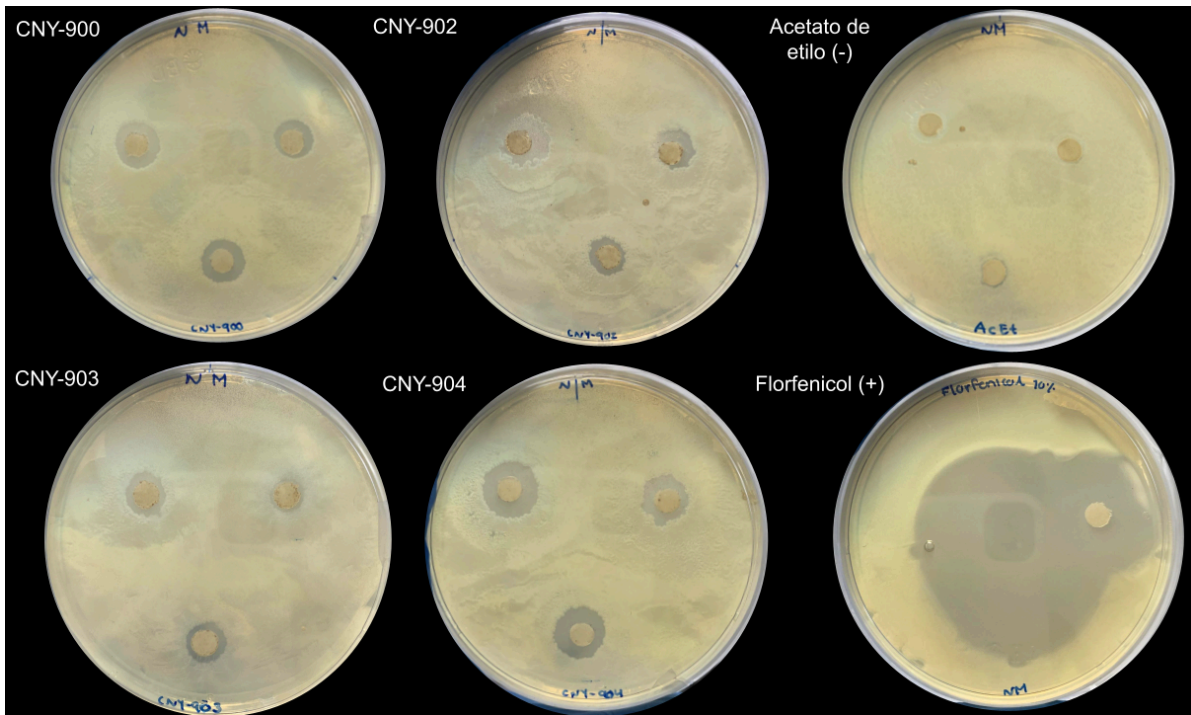


Figura 8. Halos de inhibición transcurridas 18 horas. El efecto antibacteriano de los extractos con acetato de etilo de *Nocardiopsis* contra *Vibrio harveyi*. Se incluyen control negativo (derecho superior) y positivo (derecho inferior).

7.5. ANTAGONISMO MICROBIANO

Los resultados de las pruebas antagónicas entre *Nocardiopsis* y *V. harveyi* en estriado indican que durante las primeras 24 horas de crecimiento, *Nocardiopsis* no inhibió el crecimiento de *V. harveyi*, ya que se observa el mismo crecimiento que en su control (Fig. 9). En los controles de estriado de las cepas *Nocardiopsis* (Fig. S3) se observa crecimiento del mismo tamaño que en las placas antagónicas con la cepa patógena.

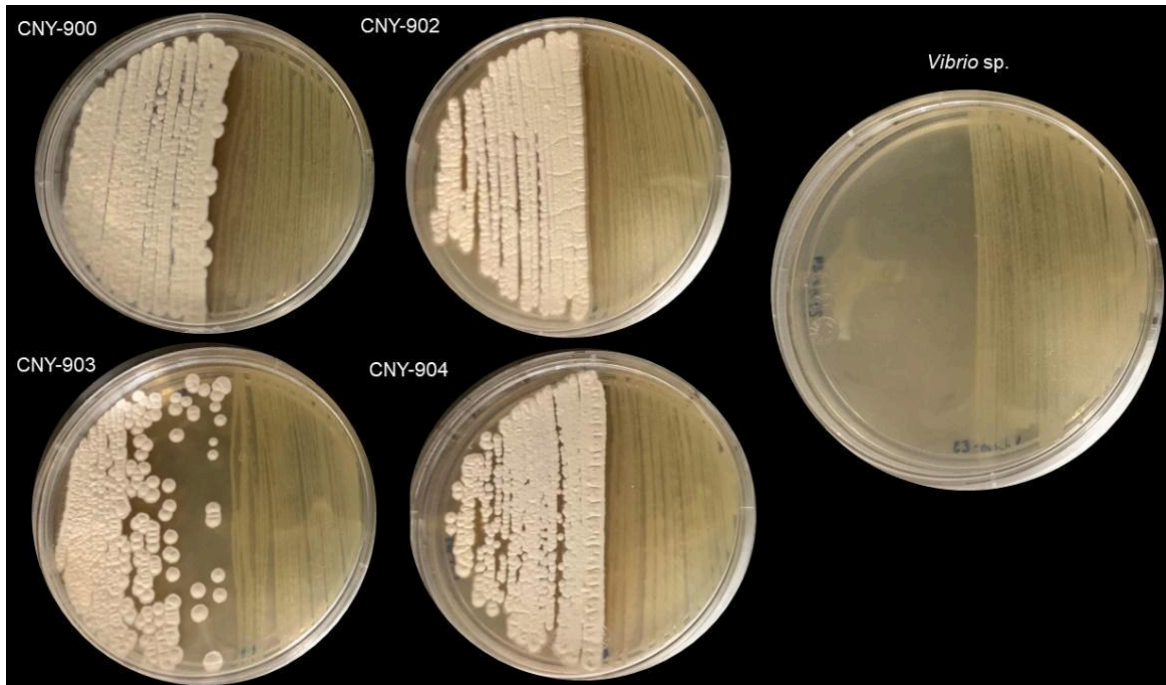


Figura 9. Prueba antagónica *Nocardiosis* vs *Vibrio* en estriado a las 24 horas de inóculo de la cepa patógena *Vibrio harveyi*.

Durante las primeras 48 horas de inóculo de *V. harveyi* en la placa de estriado de la CNY-900 se observa una coloración oscura en la zona de contacto entre las dos cepas. Al sexto día del inóculo de *V. harveyi*, se observa mayor densidad bacteriana de las dos cepas, sin embargo, no hay crecimiento de la cepa *V. harveyi* sobre *Nocardiosis* (Fig. 10). En el control de *V. harveyi* se observa que creció abarcando mayor área en comparación de las placas antagónicas (Fig. 10). Durante los 20 días de monitoreo no se observó crecimiento de *V. harveyi* sobre las cepas *Nocardiosis* ni aumento de densidad bacteriana, por el contrario las cepas *Nocardiosis* comenzaron a esporular sobre *V. harveyi*. Esto confirma que sí hay inhibición de *Vibrio harveyi* (Fig. 11). En cuanto a los controles de estriado de *Vibrio* (Fig. 11) y *Nocardiosis* (Fig.S5) ambas siguieron creciendo, abarcando toda la placa. En los controles de *Nocardiosis* se observa mayor crecimiento y esporulación que en las placas antagónicas (Fig.S5).

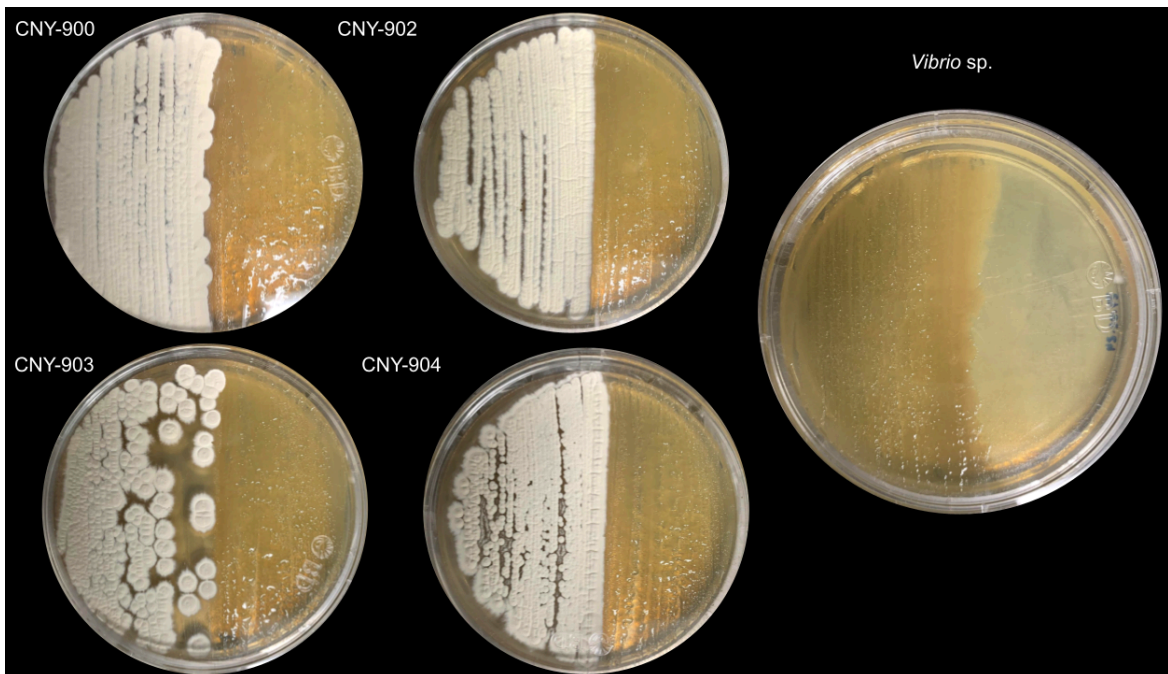


Figura 10. Prueba antagónica *Nocardioopsis* vs *Vibrio* en estriado al sexto día de inóculo de la cepa patógena *Vibrio harveyi*.

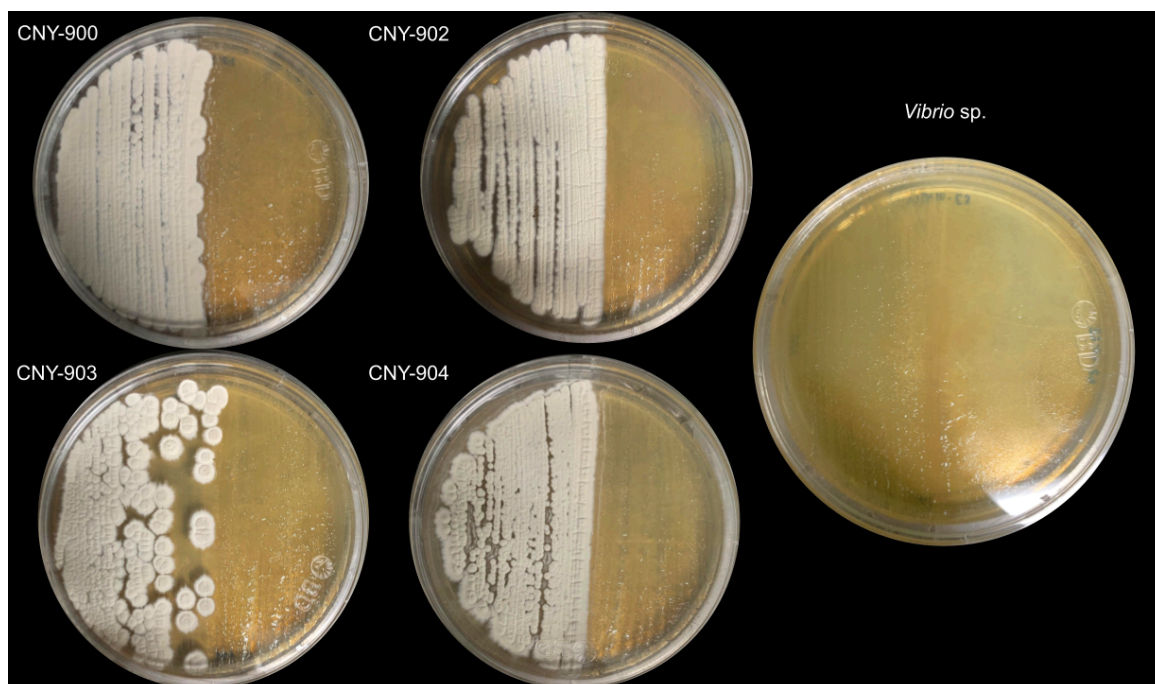


Figura 11. Prueba antagónica *Nocardioopsis* vs *Vibrio* en estriado al día 20 de inóculo de la cepa *Nocardioopsis* y el día 16 del inóculo de *Vibrio harveyi*.

Al igual que en las pruebas antagónicas de estriado, las pruebas antagónicas de gota indican que durante las primeras 24 horas de crecimiento, *Nocardiosis* no inhibió el crecimiento de *V. harveyi*, ya que se observa el mismo crecimiento que en el control de *V. harveyi* (Fig. 12).

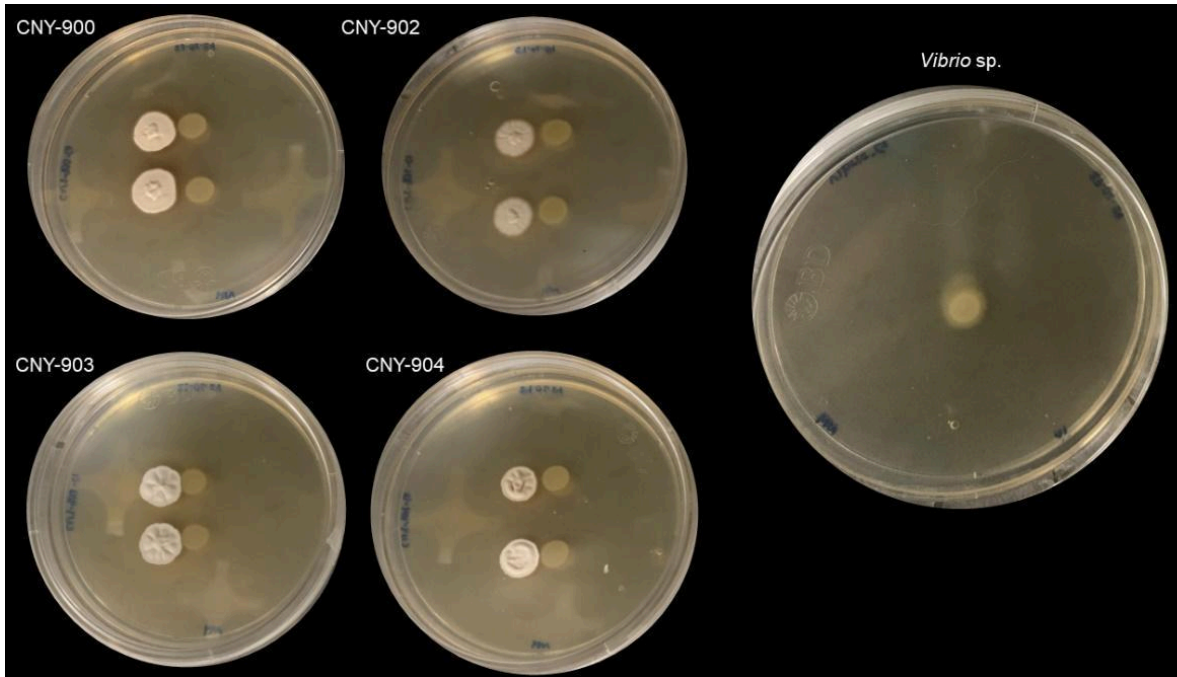


Figura 12. Prueba antagónica *Nocardiosis* vs *Vibrio* en gota a las 24 horas de inóculo de la cepa patógena *Vibrio harveyi*.

Al sexto día, las pruebas en gota indican que en esta prueba se refleja mejor la actividad inhibitoria de las cepas *Nocardiosis*. Las cepas CNY-902, CNY-903 y CNY-904 presentan mayor inhibición que la cepa CNY-900 del crecimiento de *Vibrio harveyi* demostrando que tienen mayor actividad antagónica (Fig. 13). A partir del sexto día del inóculo de *Vibrio harveyi*, las cepas de *Nocardiosis* cambiaron ligeramente la dirección de su crecimiento y esporulación. La cepa CNY-904 comenzó a crecer y esporular sobre *Vibrio harveyi*. En 10 días, la única cepa que no presentó crecimiento sobre *Vibrio harveyi* fue CNY-900. Mientras que CNY-902 presenta mayor inhibición de la cepa patógena. La CNY-904 presenta inhibición de la cepa *Vibrio harveyi* y crecimiento sobre la

misma. Esto se siguió observando durante los 20 días de monitoreo (Fig. 14). De igual manera que en el estriado, los controles en gota de *Vibrio* (Fig. 14) y *Nocardiopsis* crecieron en toda la placa, y las colonias se observan de mayor tamaño que en las placas antagónicas (Fig.S8).

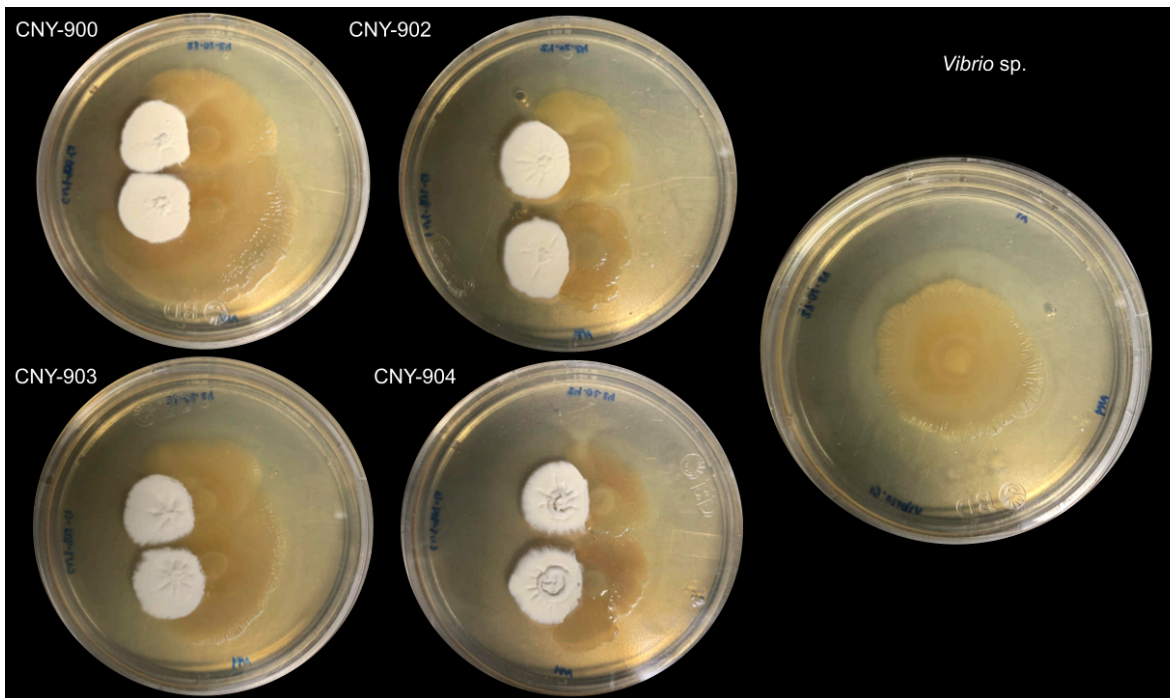


Figura 13. Prueba antagónica *Nocardiopsis* vs *Vibrio* en gota al sexto día de sembrado de la cepa *Vibrio harveyi*.

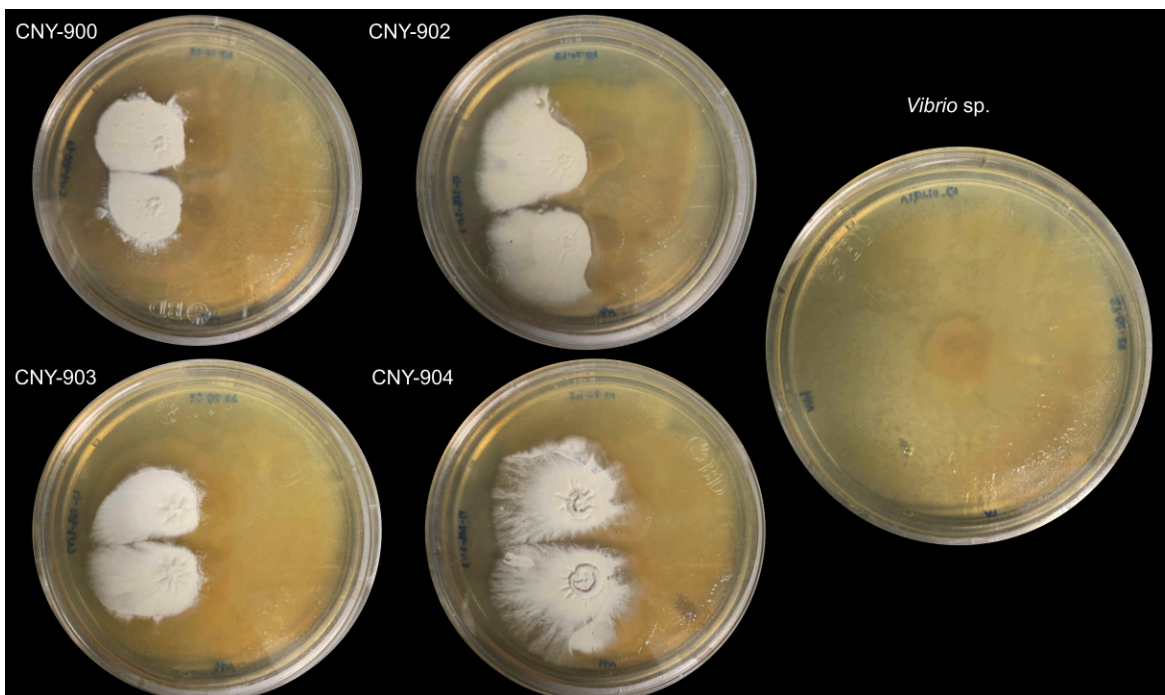


Figura 14. Prueba antagónica *Nocardioopsis* vs *Vibrio* en gota al día 20 de inóculo de la cepa *Nocardioopsis* y el día 16 del inóculo de *Vibrio harveyi*.

7.6. ANÁLISIS GENÓMICOS DE METABOLITOS SECUNDARIOS

El tamaño del genoma en promedio de las cepas de *Nocardioopsis* es de 7,951,946 pb; con un promedio del 6% del genoma enfocado al metabolismo secundario. En el genoma de CNY-903 el 7% está enfocado al metabolismo secundario, mientras que en CNY-904 es el 6%, en CNY-900 y CNY-902 el 5%. El total de grupos de genes biosintéticos, (BGCs por sus siglas en inglés), es de 24 en CNY-900, 29 en CNY-902, 28 en CNY-903 y 27 en CNY-904.

Los tipos de BCGs que predominan en los genomas CNY son los policétidos sintasa (PKS), los péptidos no ribosomales sintetasa (NRPS), síntesis de péptidos ribosomales modificados post-traduccionalmente (RiPP), síntesis de terpenos, síntesis de policétidos del tipo butirolactonas y sideróforos (Fig. 15). Por otra parte, en la cepa tipo *N. dassoivillei* (NCTC10488) predominan los PKS y la de terpenos (Fig. 15). Además, se observan los BCGs compartidos entre genomas y aquellos que son únicos. Por ejemplo, los BCGs que comparten los cuatro genomas de

Nocardiosis son la tioamida-NRPS y RiPP-like (Fig. 15). Por otra parte, los BCGs que se identifican en algunos genomas de las *Nocardiosis* son: de síntesis de betalactona y guanidinotidas en CNY-903 y CNY-904, NRPS-like y PKS de tipo II altamente reductoras (HR-Policétido sintasa tipo II) en CNY-900, CNY-903 y CNY-904 y síntesis de fosfanato en CNY-902, 903 y 904. En cuanto al ladderano sólo se encuentran en el genoma de CNY-900 (Fig. 15).

Los BCGs que la cepa tipo *N. dassonvillei* comparte con los cuatro genomas de este estudio son de síntesis de terpenos, PKs, NRPs, lassopéptidos y lantopéptidos, ectoína y butirolactona. Los casos especiales donde la cepa tipo en y alguna cepa *Nocardiosis* comparten BCGs, son: NRP-metalóforo en la CNY-902 y NI-sideróforo en la CNY-900. La fenazina y las CDPS sólo se identificaron en el genoma de la cepa tipo (Fig. 15).

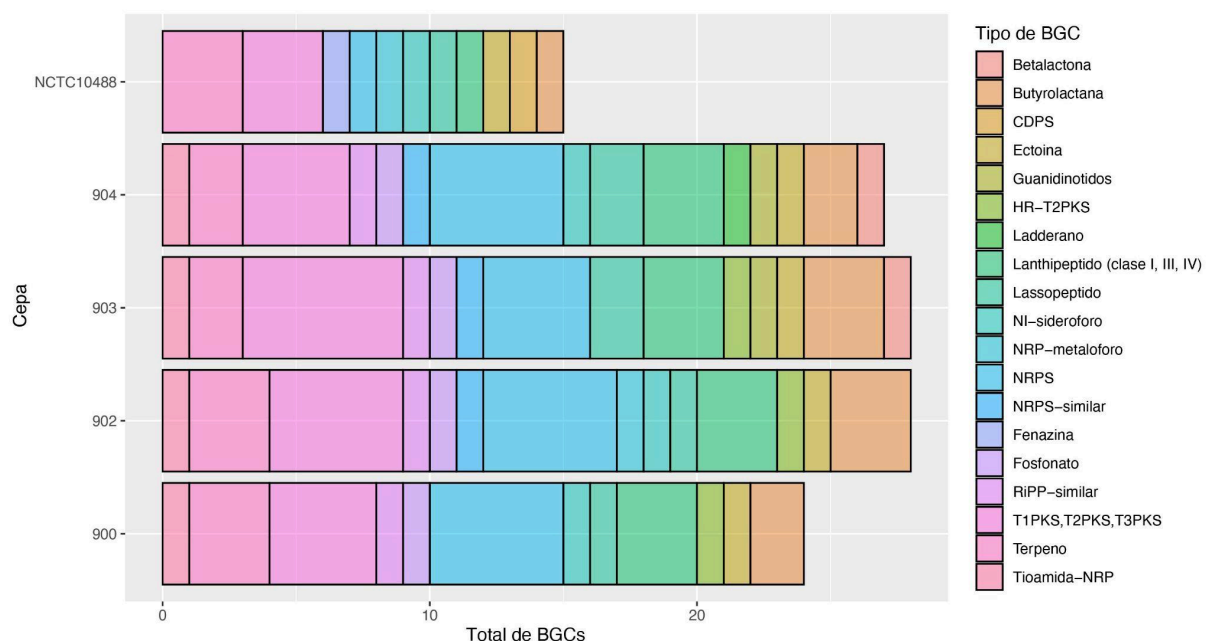


Figura 15. Tipo de biosíntesis de los grupos de genes biosintéticos (BGCs) compartidos por las cepas de *Nocardiosis* con la cepa tipo del género *N. dassonvillei* (NCTC10488).

Los productos de BGCs conocidos o con una similitud mayor al 50% son en promedio el 20% del 6% del genoma enfocado a metabolitos secundarios. Estos

BGCs son la síntesis de deferoxamina E (o desferrioxamina E) (100%) y la ectoína (75%) presentes en todos los incluyendo la cepa tipo, siendo la deferoxamina E el único cluster con una similitud del 100% (Fig. 16). Por otra parte, el isorenierateno también se encuentra en los cinco genomas analizados con diferente porcentaje de similitud: del 100% en la cepa tipo *N. dassonvillei*, del 87% en CNY-904 con y de 75% en los otros tres genomas. Un producto con 60% de similitud con la estreptomomicina se encuentra en las cuatro cepas *Nocardioopsis*. Otro producto, compartido entre CNY-900, CNY-903 y la CNY-904 es 50% similar al producto de piericidina A1. Mientras que un producto en CNY-903 y CNY-904 son 80% similares al producto de guanipiperazina A y B. La fenazina SA, SB y SC (56%), de coelibactina (90%) y de albonoursina (50%) son únicos en la cepa tipo.

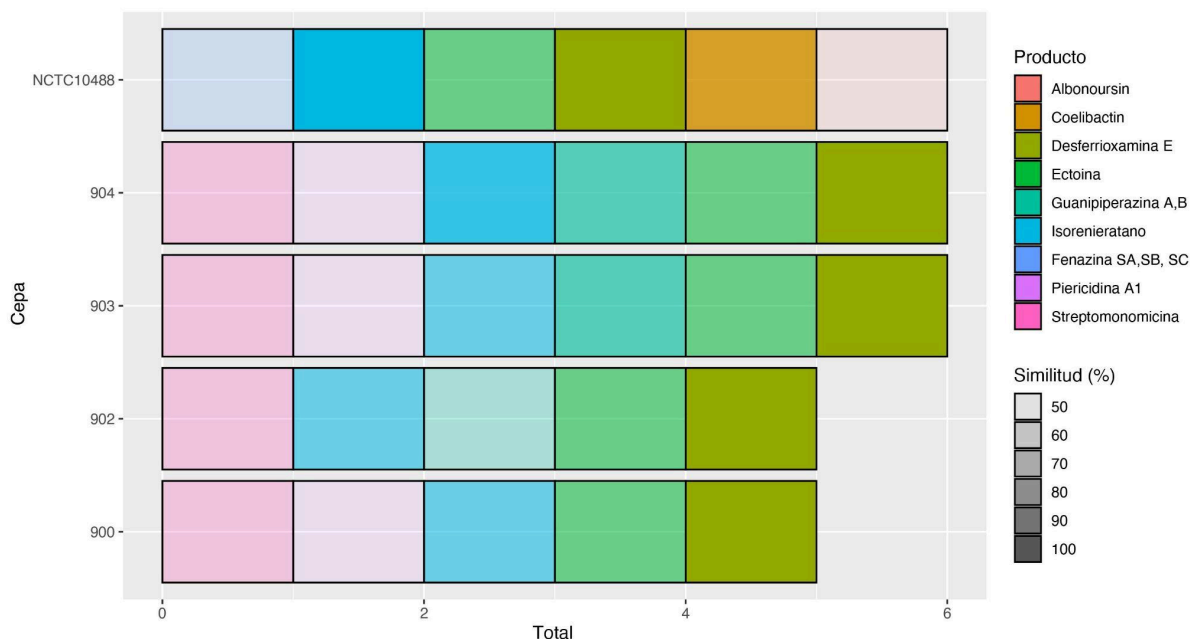


Figura 16. Productos de los grupos de genes biosintéticos (BGCs) compartidos entre las cepas del género *Nocardioopsis* y la cepa tipo *N. dassonvillei* (NCTC10488). Se incluyen BGCs con una similitud de secuencia mayor al 50%.

8. DISCUSIÓN

8.1. AISLAMIENTO BACTERIANO

En los ambientes marinos se han aislado una gran diversidad de actinobacterias. Por ejemplo, Pathom-aree y colaboradores (2006) obtuvieron una muestra de sedimento de una profundidad de 10,898 m proveniente del Abismo Challenger de la Fosa de las Marianas. De esta aislaron 38 actinobacterias que crecieron en condiciones de una atmósfera de presión (1 atm) en medio agar marino Difco 2216, logrando identificar los géneros *Dermacoccus*, *Kocuria*, *Micromonospora*, *Streptomyces*, *Tsukamurella* y *Williamsia*. En comparación con el presente trabajo en donde las cuatro cepas aisladas corresponden únicamente al género *Nocardiopsis*, y no hubo representación de los géneros encontrados por Pathom-aree y colaboradores (2006).

Existen varias posibles razones de la diferencia del número de actinobacterias aisladas por Pathom-aree (2006) y el presente trabajo. Una posible razón es el tipo de medio de cultivo utilizado. El medio A1 se compone de peptona, levadura, almidón y sal marina, mientras que el medio marino Difco 2216 también contiene levadura y peptona, pero contiene más ingredientes como cloruro de magnesio, sulfato sódico, nitrato de amonio, entre otros. Otra posible razón es el método de pretratamiento del sedimento, ya sea del estampado en seco o en diluciones seriadas y se ha documentado que influye en el aislamiento y recuperación de cepas, y en ciertos casos sobreestimar la abundancia de actinobacterias (Becerril-Espinosa *et al.*, 2011).

8.2. CURVA DE CRECIMIENTO

Las curvas de crecimiento de las cuatro cepas *Nocardiopsis* tienen un comportamiento similar, sin embargo, tienen distinciones en las fases de crecimiento. La cepa CNY-900 presenta una pendiente más pronunciada en comparación de las otras tres cepas CNY, alcanzando una mayor absorbancia y por ende, mayor número de células y representado con un tiempo de duplicación

menor (12.5 horas) y el valor más alto de constante de crecimiento (0.55 horas) en comparación con las otras tres cepas CNY. Estos resultados pueden relacionarse con el metabolismo primario, mientras unas cepas producen menor número de células con mayor tamaño, otras cepas producen mayor número de células de menor tamaño. Los resultados de las curvas de crecimiento indican que cada cepa tiene un metabolismo primario diferente, de manera que el que más se destaca es el de la CNY-900.

Estas cuatro curvas de crecimiento de las cepas CNY del género *Nocardiosis* aisladas de la Fosa de las Marianas tienen una curva de crecimiento similar con la cepa *Nocardiosis gilva* (YIM 90087T) aislada de sedimento hipersalino en Xinjiang, China. Dicho estudio de Han y colaboradores (2018) muestran curvas de crecimiento de *N. gilva* a concentraciones de 0% NaCl y 10% NaCl que tienen comportamiento similar a las cepas CNY del género *Nocardiosis*, donde los valores de absorbancia de la fase latencia va desde 0 a 0.5 con duración de 36 horas, y la fase exponencial oscila entre 0.5 y 2 con duración de 36 horas. Como se demuestra en las curvas de crecimiento de las cepas *Nocardiosis* y la realizada por Han y colaboradores (2018) de *N. gilva*, son similares en valores de absorbancia, sin embargo, en tiempos difieren, ya que la fase de latencia y la fase exponencial duran 24 horas, respectivamente (Fig. 6). Las similitudes en los valores de absorbancia de las curvas de crecimiento posiblemente se deban al tipo de medio de cultivo que se utilizó para crecer *N. gilva*, el cual fue medio 2x YT (Yeast Extract Tryptone medium), el cual contiene levadura, triptona y sal, mientras que el utilizado en el presente estudio fue el medio A1 que contiene componentes similares. Sin embargo, las diferencias en el tiempo de las fases de latencia y la exponencial, se podrían explicar que las cepas CNY del género *Nocardiosis* tienen mayor adaptabilidad al medio para reproducirse en menor tiempo, mientras que a *N. gilva* le cuesta más tiempo adaptarse y reproducirse, por lo que alcanza la misma absorbancia en mayor tiempo que nuestras cepas *Nocardiosis*.

8.3. EFECTO ANTIBACTERIANO Y ANTAGONISMO MICROBIANO

En los resultados de los bioensayos antimicrobianos, se observa una ligera inhibición a la cepa patógena de *Vibrio harveyi*. Aunque la inhibición está basada en la concentración del extracto crudo y no en compuestos purificados, lo cual puede subestimar el verdadero potencial de los compuestos químicos producidos por *Nocardiopsis*. Por ello, comparar la inhibición generada por los compuestos crudos con un antibiótico puro, que actualmente se utiliza en la acuicultura para tratar múltiples enfermedades, entre ellas las causadas por *Vibrio* sp., no es una comparación válida. No obstante, existe evidencia de la actividad antibacteriana de *Nocardiopsis* contra *Vibrio* sp. Como lo es en el trabajo de Sunish y colaboradores (2021) con *Nocardiopsis alba* en el cual utilizan acetato de etilo como método de extracción química y a través de métodos de HPLC (cromatografía líquida) y TLC (cromatografía de capa fina) obtuvieron una fracción activa que tiene la actividad biológica contra *Vibrio* sp.

Cabe mencionar que los extractos crudos solamente representan una condición de cultivo, por lo que si variamos las condiciones del medio, se pudieran expresar diferentes rutas de producción a las observadas en medio A1. Es decir, las condiciones de cultivo pueden variar dependiendo su fuente de carbono, nitrógeno, minerales para poder observar un crecimiento bacteriano diferente. Evangelista-Martínez y colaboradores (2008) mencionan que, los microorganismos activan sus rutas de producción de metabolitos secundarios con actividades antagónicas y sinérgicas cuando interactúan con otras poblaciones de microorganismos; también por los factores fisicoquímicos del medio natural en el que habitan. Por ejemplo, Hamilton y colaboradores (2019) analizaron el genoma enfocado en metabolitos secundarios con potencial bioactivo de 20 actinobacterias, utilizando distintos medios de cultivo para estudiar su actividad antimicrobiana. Sin embargo, aunque todas presentan potencial en su genoma, en condiciones de laboratorio sólo algunas de las 20 cepas fueron bioactivas en algunos medios de cultivo, y ninguna cepa fue bioactiva en todos los medios probados. Esto revela que, al cambiar el tipo de medio de cultivo, se cambia la

fuente y proporción de los nutrientes necesarios para las bacterias, generando cierto estrés que dan lugar a la activación de las rutas de producción de los metabolitos secundarios, así como menciona Selvin y colaboradores (2009) que al cambiar la suplementación de fuente de carbono y nitrógeno puede optimizar la producción de compuestos antimicrobianos. Cabe destacar que también las condiciones *in vitro* son completamente diferentes a las condiciones *in situ* de la Fosa de las Marianas, es decir, en condiciones de laboratorio las células estuvieron con los nutrientes necesarios para vivir, crecer y reproducirse, no tuvieron competencia con otras bacterias, y por último, no estuvieron en un ambiente extremo de presión, por lo que no fue necesario activar ciertas rutas metabólicas secundarias para la protección de la estructura celular.

Las pruebas de antagonismo bacteriano demuestran que las cepas *Nocardiopsis* CNY-902, 903 y 904 inhiben el crecimiento de *V. harveyi*, demostrando una interacción de amensalismo microbiana, la cual consiste en que *Nocardiopsis* produce algún compuesto que inhibe el crecimiento de *V. harveyi*. Los resultados de las pruebas antagónicas en estriado y en gota, obtuvieron diferencias, en el método de gota se observa mejor la inhibición generada por *Nocardiopsis*. Esta diferencia podría deberse a que inocular 10 μ L de cultivo de nuestras cepas en un sólo punto, le dio mayor área a la cepa para crecer e inhibir a *V. harveyi*, a diferencia que en el estriado, se puede deducir que hay mayor número de células de las dos cepas, por lo cual hubo menor disponibilidad de nutrientes para que *Nocardiopsis* creciera más que *V. harveyi*.

Relacionando lo que se observa en las pruebas antagonistas y los metabolitos presentes en dichas pruebas, da pauta a seguir estudiando la actividad biológica que tiene la cepa *Nocardiopsis* con otros patógenos. En particular, se buscará realizar una separación de los compuestos químicos de los extractos crudos, para probar los compuestos aislados y observar su verdadero potencial biológico.

8.4. ANÁLISIS GENÓMICO DE METABOLITOS SECUNDARIOS

El filo Actinomycetota ha presentado un gran potencial metabólico enfocado en metabolitos secundarios siendo así que el 45% de los compuestos bioactivos pertenecen a bacterias de este filo (Arulprakasam y Dharumadurai, 2021). Las actinobacterias marinas, en este caso las de ambientes extremos como la Fosa de las Marianas, presentan metabolitos de interés biotecnológico (Zhang *et al.*, 2024). La especie *Nocardiopsis dassolvillei* (NCTC10488), la cual es la cepa tipo de nuestras cepas, tiene un alto potencial de producción de compuestos bioactivos y enzimas extracelulares, las cuales menciona Bhairamkar y colaboradores (2023). Por ejemplo, los BGCs que mencionan dichos autores y que están presentes en este trabajo son los PKS de tipo I, II, y III que biosintetizan diferentes policétidos con actividad antimicrobiana y antibiótica.

Los resultados de antiSMASH muestran una gran diversidad de rutas de metabolismo secundario en cada genoma (Fig. 15). Se muestra mayor cantidad de rutas de PKS, NRPS, RiPP, síntesis de terpenos, de butirrolactonas y de sideróforos. Schorn y colaboradores (2016) realizaron un análisis de las rutas de metabolismo secundario de la especie *Nocardiopsis* proveniente de un ambiente marino, en dicho trabajo se distingue la misma diversidad de BGCs que en el presente trabajo. La principal diferencia con dicho trabajo es la proporción de BGCs de NRPS y RiPP, nuestras cepas de *Nocardiopsis* presentan mayor cantidad de NRPS que RiPP. El 20% de los metabolitos encontrados por antiSMASH tienen similitud de $\geq 50\%$ con BGCs conocidos, por ejemplo para la síntesis de ectoína, deferoxamina E, isorenierateno, estreptomomicina, piericidina A1 y la guanipiperazina A y B (Fig. 16).

BGCs para la síntesis de ectoína, la deferoxamina E, el isorenierateno y la estreptomomicina se comparten entre las cuatro cepas del género *Nocardiopsis* (Fig. 14). Mientras que la cepa tipo sólo presenta el BGC de ectoína, deferoxamina, y del isorenierateno. La ectoína es un compuesto cíclico caracterizado como osmoprotector que se encuentra en los microorganismos. Las

bacterias que habitan en ambientes extremos tienen la capacidad de producir este compuesto para protegerse del estrés salino, cambios de temperatura y otros agentes que desnaturalizan la célula como en este caso, el estrés por la alta presión atmosférica en el Abismo Challenger (Salgado-Herreras, 2023). Por ejemplo, el género *Pseudoalteromonas* es un género de bacterias marinas obligadas que no presentan este compuesto, indican que no habitan ambientes de agua dulce por la falta de un osmoprotector para regular el cambio de concentración de sales en la célula (García-Valero, 2020). La deferoxamina E es un sideróforo con función quelante para capturar hierro que es esencial para funciones vitales de los microorganismos. Además se ha documentado que el grupo de las deferoxaminas tienen aplicaciones clínicas (Yamanaka *et al.*, 2005). El isorenierateno es un carotenoide correspondiente a la familia de los terpenos, este carotenoide lo poseen ciertas bacterias que habitan en ambientes anóxicos y con poca o total ausencia de luz (Van Duin y Damsté, 2002). La estreptomomicina es un lassopéptido de la familia de los RiPPs y se identificó por primera vez en la especie *Streptomonospora alba*. Este compuesto es hidrofóbico con actividad antibiótica contra bacterias Gram positivas (Meteliev *et al.*, 2015).

Los genomas que presentan el BGC de piericidina A1 son CNY-900, CNY-903 y CNY-904 (Fig. 14). Este compuesto es del grupo de las α -piridonas caracterizadas como metabolitos con actividad antibiótica, antifúngicos y antitumorales (Liu *et al.*, 2012); se ha documentado que solamente las actinobacterias producen estos metabolitos (Zhou y Fenical, 2016). La guanipiperazina A y guanipiperazina B son NRPs sin mucho precedente (Shi *et al.*, 2021) y sólo se encuentra en el genoma de CNY-903 y CNY-904.

Como se puede observar en los resultados de antiSMAH, existen BGCs con bioactividad en los cuatro genomas de las cepas CNY del género *Nocardiosis*. Aunque no se haya distinguido la actividad antimicrobiana en los antibiogramas como se esperaba por el potencial de los metabolitos a nivel genómico, no se descarta seguir estudiando en laboratorio estas cepas provenientes de la Fosa de las Marianas.

9. CONCLUSIONES

Las bacterias del género *Nocardiopsis* aisladas de sedimento de la Fosa de las Marianas, presentan una nueva variedad del gen 16S rRNA para el género *Nocardiopsis*, siendo así que a la especie que se encuentran filogenéticamente más cercanas es *Nocardiopsis umidischolae*. Esta variedad en el gen 16S rRNA, invita a realizar más estudios para definir si es una nueva cepa la que habita en el sedimento de la Fosa de las Marianas. Se lograron estandarizar curvas de crecimiento, donde se muestra que la cepa CNY-900 tiene un tiempo menor de duplicación y una mayor cantidad de células con una constante de crecimiento mayor, indicando que cada cepa tiene un metabolismo primario diferente y la manera de crecer y reproducirse difiere entre ellas aunque hayan sido aisladas del mismo lugar. Para la evaluación de la actividad biológica de los extractos crudos, ya sean ensayos antimicrobianos o las pruebas antagónicas, representan una oportunidad para evaluar extractos en diferentes concentraciones y realizar purificación de compuestos para evaluar el verdadero potencial químico de cada producto producido por *Nocardiopsis*. También representan la oportunidad de utilizar otros medios de cultivo y otras condiciones de crecimiento para observar si cambia la producción de compuestos químicos y por ende, la activación de rutas metabólicas secundarias. Para seguir evaluando la actividad antimicrobiana, se espera probar los extractos con las consideraciones mencionadas anteriormente con otros patógenos gram negativos y gram positivos. En cuanto al análisis genómico, se concluye que los cuatro genomas CNY del género *Nocardiopsis* tienen en promedio un 6% de su genoma dedicado a la biosíntesis de diversas rutas metabólicas asociadas al metabolismo secundario, siendo principalmente rutas de tipo PKS, NRPS y RiPPs. De acuerdo al número de rutas encontradas, en promedio sólo el 20% de los metabolitos secundarios encontrados tienen una similitud mayor o igual a 50% comparado con lo reportado en las bases de datos, por lo que el 80% de los metabolitos secundario no se encuentran identificados, ya sea por la ausencia de los genes para completar el BCG o por ser algún nuevo compuesto. Esto representa una gran oportunidad para seguir estudiando el

genoma de estas cuatro cepas aisladas de la Fosa de las Marianas, para describir su potencial a expresar un compuesto con actividad biológica.

Este estudio representa la importancia del estudio de géneros raros de actinobacterias que habitan en lugares extremos, debido a que son especies poco estudiadas y que tienen el potencial genómico para ser utilizado en la farmacología y biotecnología. También abre el interés de la evolución bacteriana y la diversidad filogenética.

10. LITERATURA CITADA

- Abe, F., y Horikoshi, K. (2001). The biotechnological potential of piezophiles. *Trends in Biotechnology*, 19(3), 102–108.
- Abyzov, S. S., Philipova, S. N. y Kuznetsov, V. D. (1983). *Nocardiopsis antarcticus*, a new species of actinomycetes, isolated from the ice sheet of the central Antarctic glacier. *Izv Akad Nauk SSSR Biol* 4, 559–568.
- Adlin Jenifer, J. S. C., Michaelbabu, M., Eswaramoorthy Thirumalaikumar, C. L., Jeraldin Nisha, S. R., Uma, G., y Citarasu, T. (2019). Antimicrobial potential of haloalkaliphilic *Nocardiopsis* sp. AJ1 isolated from solar salterns in India. *Journal of Basic Microbiology*, 59(3), 288-301.
- Álvarez, A., Saez, J. M., Dávila-Costa, J. S., Colin, V. L., Fuentes, M. S., Cuozzo, S. A., Benimeli, C. S., Polti, M. A., y Amoroso, M. J. (2017). Actinobacteria: Current research and perspectives for bioremediation of pesticides and heavy metals. *Chemosphere*, 166, 41–62.
- Amaro, C., Fouz, B., Sanjuán, E., & Romalde, J. L. (2020). Vibriosis. In *Climate change and infectious fish diseases*. Wallingford UK: CABI. 182-210.
- antiSMASH 7.0: new and improved predictions for detection, regulation, chemical structures, and visualisation. Kai Blin, Simon Shaw, Hannah E Augustijn, Zachary L Reitz, Friederike Biermann, Mohammad Alanjary, Artem Fetter, Barbara R Terlouw, William W. Metcalf, Eric JN Helfrich, Gilles P van Wezel, Marnix. H Medema y Tilmann Weber. *Nucleic Acids Research* (2023) doi: 10.1093/nar/gkad344.

- Arulprakasam, K. R., & Dharumadurai, D. (2021). Genome mining of biosynthetic gene clusters intended for secondary metabolites conservation in actinobacteria. *Microbial Pathogenesis*, 161, 105252.
- Becerril-Espinosa, A. (2011). Actinobacterias aisladas del sedimento marino del Golfo de California y de Bahía Todos Santos: diversidad, bioactividad y dominios cetosintetasa. Ensenada, Baja California: *FCM, IIO*, 101.
- Bennur, T., Kumar, A. R., Zinjarde, S., y Javdekar, V. (2015). *Nocardioopsis* species: Incidence, ecological roles and adaptations. *Microbiological Research*, 174, 33–47.
- Bhairamkar, S., Kadam, P., Anjulal, H., Joshi, A., Chaudhari, R., Bagul, D., Javdekar, V. y Zinjarde, S. (2023). Comprehensive updates on the biological features and metabolic potential of the versatile extremophilic actinomycete *Nocardioopsis dassonvillei*. *Research in Microbiology*, 104171.
- BioRender (2024). <https://www.biorender.com/>
- 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.
- Cuéllar-Anjel, J. (2013). Vibriosis. The Center of Food Security & Public Health. *Iowa State University*.
- Evangelista-Martínez, Z., y Moreno-Enríquez, A. (2007). Metabolitos secundarios de importancia farmacéutica producidos por actinomicetos. *Revista BioTecnología*, 11, 37-50.
- García-Valero, R. M. (2020). Redes de señalización implicadas en la regulación del metabolismo de las ectoínas en la bacteria halófila *Chromohalobacter salexigens* y su potencial terapéutico como agente neuroprotector. *Universidad de Sevilla, Facultad de Farmacia, Departamento de microbiología y parasitología*.
- Hamilton, J., Holmes, N. A., Worsley, S. F., Patrick, E. H., Pierce, N. E., Mueller, U. G., Boomsma, J. J., Wilkinson, B. y Hutchings, M. I. (2019). Genome mining of ant-associated bacteria to identify novel secondary metabolites. *University of East Anglia*.

- Han, J., Gao, Q. X., Zhang, Y. G., Li, L., Mohamad, O. A., Rao, M. P. N., ... & Li, W. J. (2018). Transcriptomic and ectoine analysis of halotolerant *Nocardiopsis gilva* YIM 90087T under salt stress. *Frontiers in Microbiology*, 9, 341574.
- Hsui, A. T. y Youngquist, S. (1985). A dynamic model of the curvature of the Mariana Trench. *Nature*, 318(6045), 455-457.
- Ibrahim, A. H., Desoukey, S. Y., Fouad, M. A., Kamel, M. S., Gulder, T. A., y Abdelmohsen, U. R. (2018). Natural product potential of the genus *Nocardiopsis*. *Marine drugs*, 16(5), 147.
- Jayasree, L., Janakiram, P. y Madhavi, R. (2006). Characterization of *Vibrio* spp. associated with diseased shrimp from culture ponds of Andhra Pradesh (India), *J. World Aquacult. Soc.* 37 (4), 523–532.
- Kato, C., Li, L., Nogi, Y., Nakamura, Y., Tamaoka, J., & Horikoshi, K. (1998). Extremely barophilic bacteria isolated from the Mariana Trench, Challenger Deep, at a depth of 11,000 meters. *Applied and environmental microbiology*, 64(4), 1510-1513.
- Lee, Y.K., Lee, J.H., y Lee, H.K. (2001). Microbial symbiosis in marine sponges. *The Journal of Microbiology*, 39 (4), 254–64.
- Li, H. W., Zhi, X. Y., Yao, J. C., Zhou, Y., Tang, S. K., Klenk, H. P., Zhao, J. y Li, W. J. (2013). Comparative Genomic Analysis of the Genus *Nocardiopsis* Provides New Insights into Its Genetic Mechanisms of Environmental Adaptability. *PLoS ONE* 8(4): e61528.
- Liu, Q., Yao, F., Chooi, Y. H., Kang, Q., Xu, W., Li, Y., ... & You, D. (2012). Elucidation of piericidin A1 biosynthetic locus revealed a thioesterase-dependent mechanism of α -pyridone ring formation. *Chemistry & biology*, 19(2), 243-253.
- Maier R, Pepper I, y Gerba C. (2000). Environmental Microbiology. *Academic Press*, 585.
- Manivasagan, P., Venkatesan, J., Sivakumar, K., y Kim, S.-K. (2013). RETRACTED: Marine actinobacterial metabolites: Current status and future perspectives. *Microbiological Research*, 168(6), 311–332.
- Meklat, A., Sabaou, N., Zitouni, A., Mathieu, F., y Lebrihi, A. (2011). Isolation, taxonomy, and antagonistic properties of halophilic actinomycetes in Saharan soils of Algeria. *Applied and Environmental Microbiology*, 77(18), 6710-6714.

- Metelev, M., Tietz, J. I., Melby, J. O., Blair, P. M., Zhu, L., Livnat, I., Severinov, K. y Mitchell, D. A. (2015). Structure, Bioactivity, and Resistance Mechanism of Streptomomicin, an Unusual Lasso Peptide from an Understudied Halophilic Actinomycete. *Chemistry & Biology*, 22(2), 241-250.
- Meyer, J. (1976). *Nocardiosis*, a new genus of the order Actinomycetales. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 26(4), 487-493.
- Olivares-Mendoza, F. I. (2022). Caracterización taxonómica de las bacterias y arqueas planctónicas de la Fosa de Atacama. *Universidad de Concepción, Facultad de Ciencias Naturales y Oceanográficas*, 1-66.
- 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.
- Peng, Q., Li, Y., Deng, L., Fang, J., y Yu, X. (2021). High hydrostatic pressure shapes the development and production of secondary metabolites of Mariana Trench sediment fungi. *Scientific Reports*, 11(1).
- Prieto-Davó, A., Fenical, W., y Jensen, P. R. (2008). Comparative actinomycete diversity in marine sediments. *Aquatic Microbial Ecology*, 52(1), 1-11.
- Ramírez, D. N., Serrano, J. A., y Sandoval, T. H. (2006). Microorganismos extremófilos. Actinomicetos halófilos en México. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*, 37(3), 56-71.
- Ramírez, S. I. (2009). Las fronteras de la vida desde la perspectiva de los extremófilos. *Inventio*, la génesis de la cultura universitaria en Morelos, 6(11), 56-66.
- Salgado-Herreras, P. (2023). Diseño de procesos para la extracción y purificación de ectoína producida por microorganismos.
- Schorn, M. A., Alanjary, M. M., Aguinaldo, K., Korobeynikov, A., Podell, S., Patin, N., ... & Moore, B. S. (2016). Sequencing rare marine actinomycete genomes reveals high density of unique natural product biosynthetic gene clusters. *Microbiology*, 162(12), 2075-2086.
- Schrope, M. (2012). James Cameron returns from the deep. *Nature*, International weekly journal of science.

- Selvin, J., Shanmughapriya, S., Gandhimathi, R., Seghal Kiran, G., Rajeetha Ravji, T., Natarajaseenivasan, K., & Hema, T. A. (2009). Optimization and production of novel antimicrobial agents from sponge associated marine actinomycetes *Nocardioopsis dassonvillei* MAD08. *Applied microbiology and biotechnology*, 83, 435-445.
- Shi, J., Xu, X., Liu, P. Y., Hu, Y. L., Zhang, B., Jiao, R. H., ... & Ge, H. M. (2021). Discovery and biosynthesis of guanipiperazine from a NRPS-like pathway. *Chemical Science*, 12(8), 2925-2930.
- Shi, T., Wang, Y.-F., Wang, H. y Wang, B. (2022). Genus *Nocardioopsis*: A Prolific Producer of Natural Products. *Marine Drugs*, 20, 374.
- Sunish, K. S., Sreedharan, P., Daniel, S., Biji, M., Rosamma, P., Sukumaran, V. y Singh, I. B. (2021). A novel substituted derivative of sterol from marine actinomycetes *Nocardioopsis alba* MCCB 110 antagonistic to the aquaculture pathogen *Vibrio harveyi*. *Microbial Pathogenesis*, 157, 104967.
- Taira K, Kitagawa S, Yamashiro T, Yanagimoto D (2004) Deep and bottom currents in the Challenger Deep, Mariana trench, measured with super-deep current meters. *J Oceanogr*, 60, 919-926.
- Van Duin, A. C., & Damsté, J. S. S. (2003). Computational chemical investigation into isorenieratene cyclisation. *Organic Geochemistry*, 34(4), 515-526.
- Velásquez, A. V., Quintero, M., Jiménez-Vergara, E. Y., Blandón, L. M., y Gómez-León, J. (2018). Microorganismos marinos extremófilos con potencial en bioprospección. *Revista de la Facultad de Ciencias*, 7(2), 9–43.
- Vazquez-Pertejo, M. T. (2022). Pruebas de sensibilidad o antibiogramas. Wellington Regional Medical Center.
- Xu, S., Yan, L., Zhang, X., Wang, C., Feng, G., y Li, J. (2014). *Nocardioopsis fildesensis* sp. nov., an actinomycete isolated from soil. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 64(Pt_1), 174-179.
- Yamanaka, K., Oikawa, H., Ogawa, H. O., Hosono, K., Shinmachi, F., Takano, H., Sakuda, S., Beppu, T. y Ueda, K. (2005). Desferrioxamine E produced by *Streptomyces griseus* stimulates growth and development of *Streptomyces tanashiensis*. *Microbiology*, 151(9), 2899-2905.

- Zamora-Quintero, A. Y., Torres-Beltrán, M., Guillén Matus, D. G., Oroz-Parra, I., & Millán-Aguíñaga, 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.
- Zhang, D., Feng, Y., Li, H., & Zhang, Z. (2024). Bioactive Secondary Metabolites Produced by the Hadal Actinomycete *Streptomyces* sp. SY1414 Isolated from the Mariana Trench-derived Sediment. *The Natural Products Journal*, 14(4), 60-70.
- Zhou, X., & Fenical, W. (2016). The unique chemistry and biology of the piericidins. *The Journal of antibiotics*, 69(8), 582-593.
- Ziemert, N., Alanjary, M., y Weber, T. (2016). The evolution of genome mining in microbes—a review. *Natural product reports*, 33(8), 988-1005.

11. ANEXOS

Tabla 1. Promedio de halos de inhibición generados por el efecto antibacteriano contra *Vibrio* de los extractos químicos con metanol producidos por las cuatro cepas CNY del género *Nocardioopsis*.

Cepa	Halo de inhibición (mm)			
	Medición A	Medición B	Medición C	Medición D
CNY-900	0 ± 0.00	0 ± 0.00	0 ± 0.00	0 ± 0.00
CNY-902	0 ± 0.00	0 ± 0.52	0 ± 0.00	0 ± 0.00
CNY-903	0 ± 0.00	0 ± 0.00	0 ± 0.00	0 ± 0.00
CNY-904	0 ± 0.00	0 ± 0.41	0 ± 0.00	0 ± 0.00

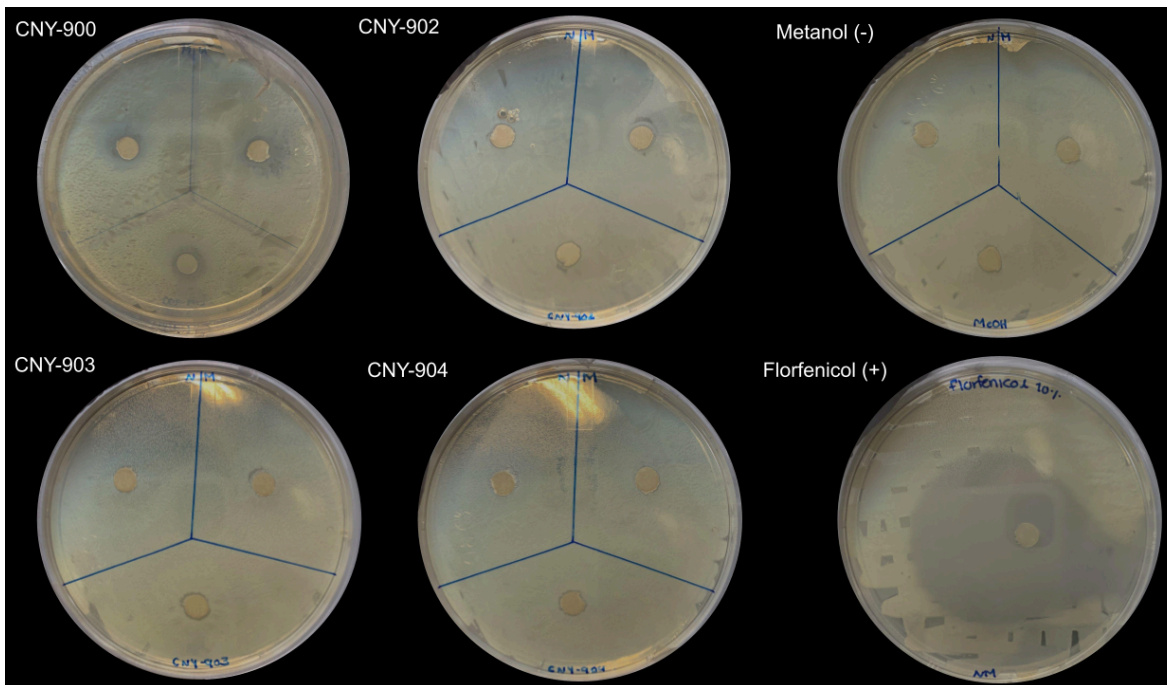


Figura suplementaria 2. Halos de inhibición generados a las .. horas por el efecto antibacteriano contra *Vibrio* de los extractos químicos con metanol producidos por las cuatro cepas CNY del género *Nocardioopsis*.

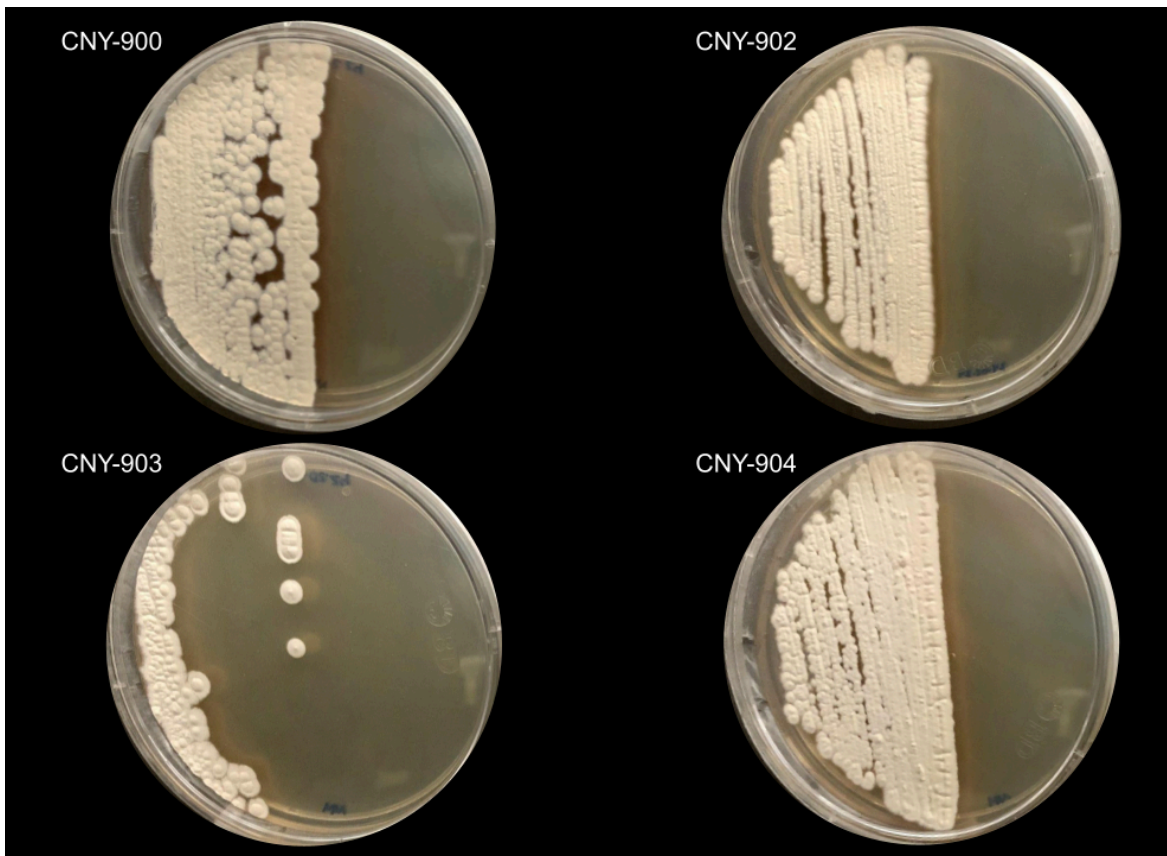


Figura suplementaria 3. Control *Nocardiosis* en estriado a las 24 horas de inóculo de la cepa patógena *Vibrio* de la prueba antagónica.

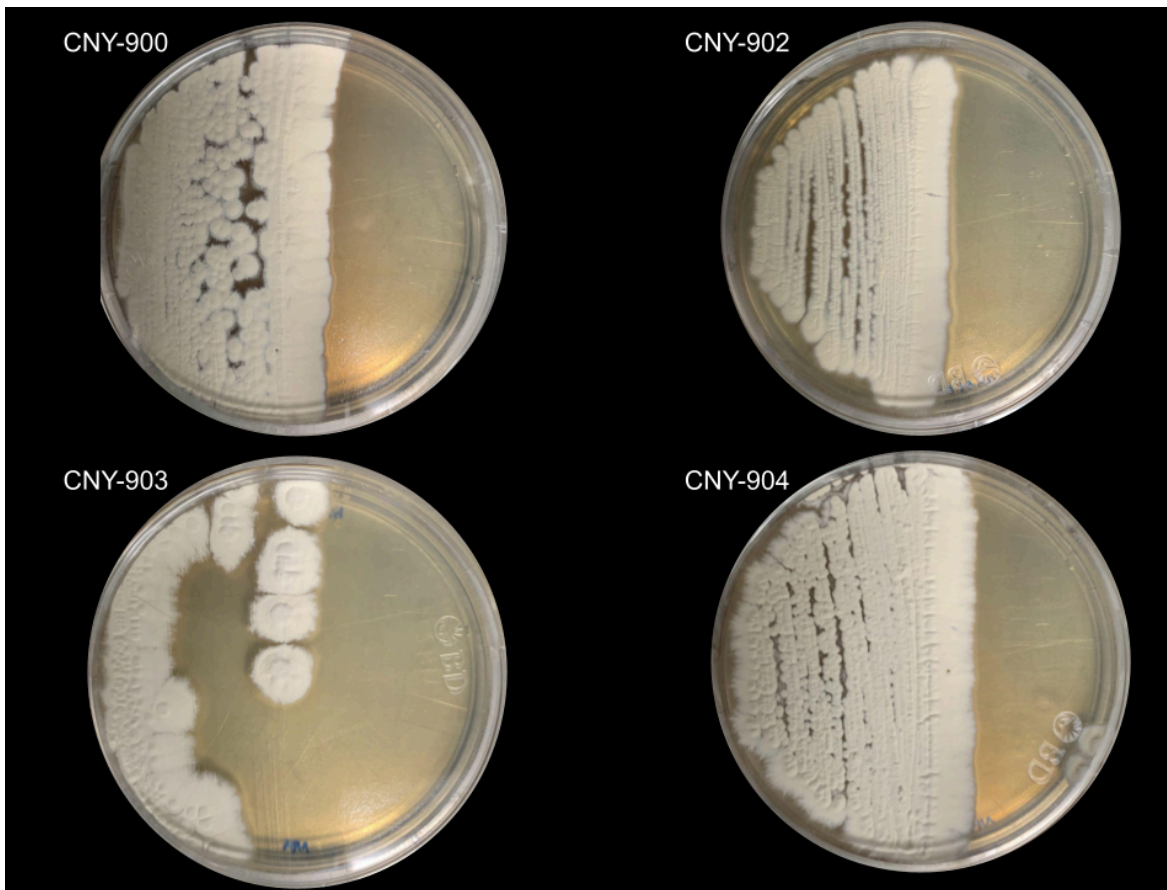


Figura suplementaria 4. Control *Nocardiopsis* en estriado al sexto día de inóculo de la cepa patógena *Vibrio* de la prueba antagónica.

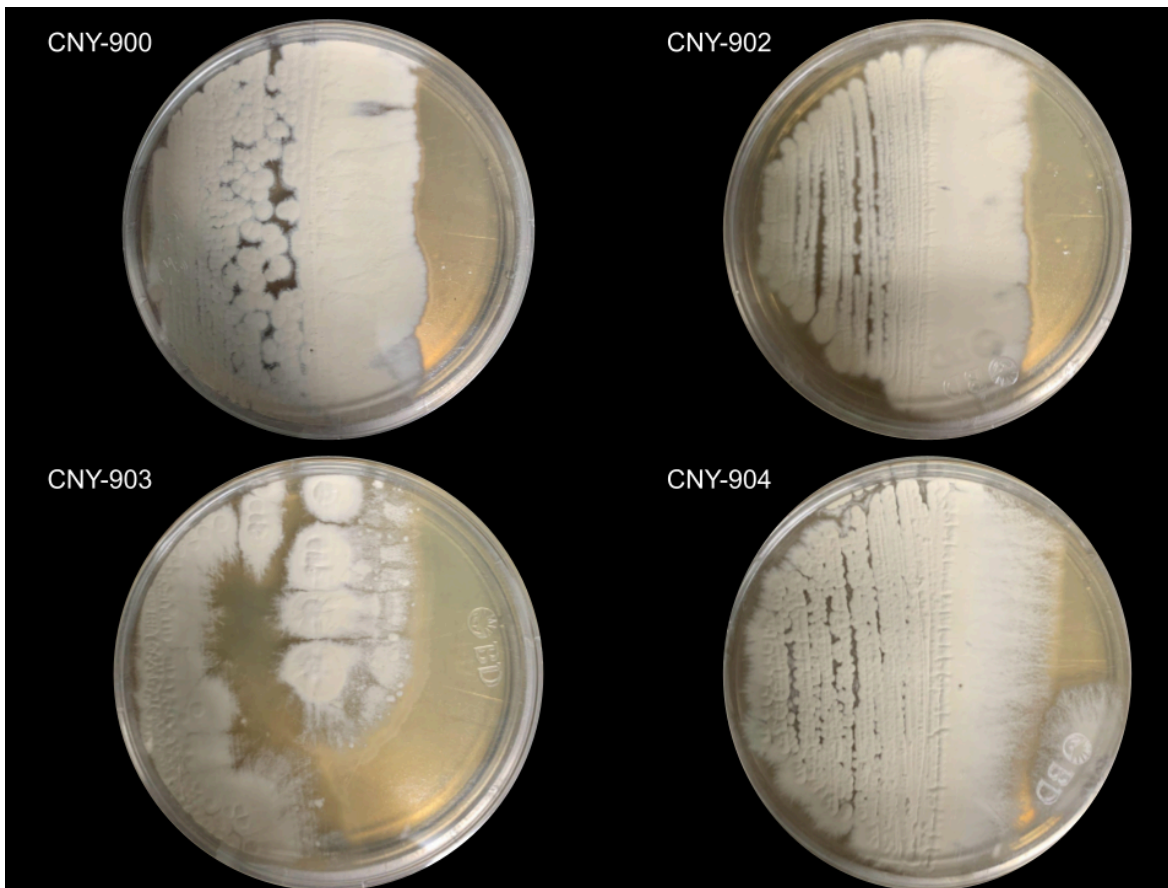


Figura suplementaria 5. Control *Nocardiosis* en estriado al día 20 de inóculo de la cepa patógena *Vibrio* de la prueba antagónica.

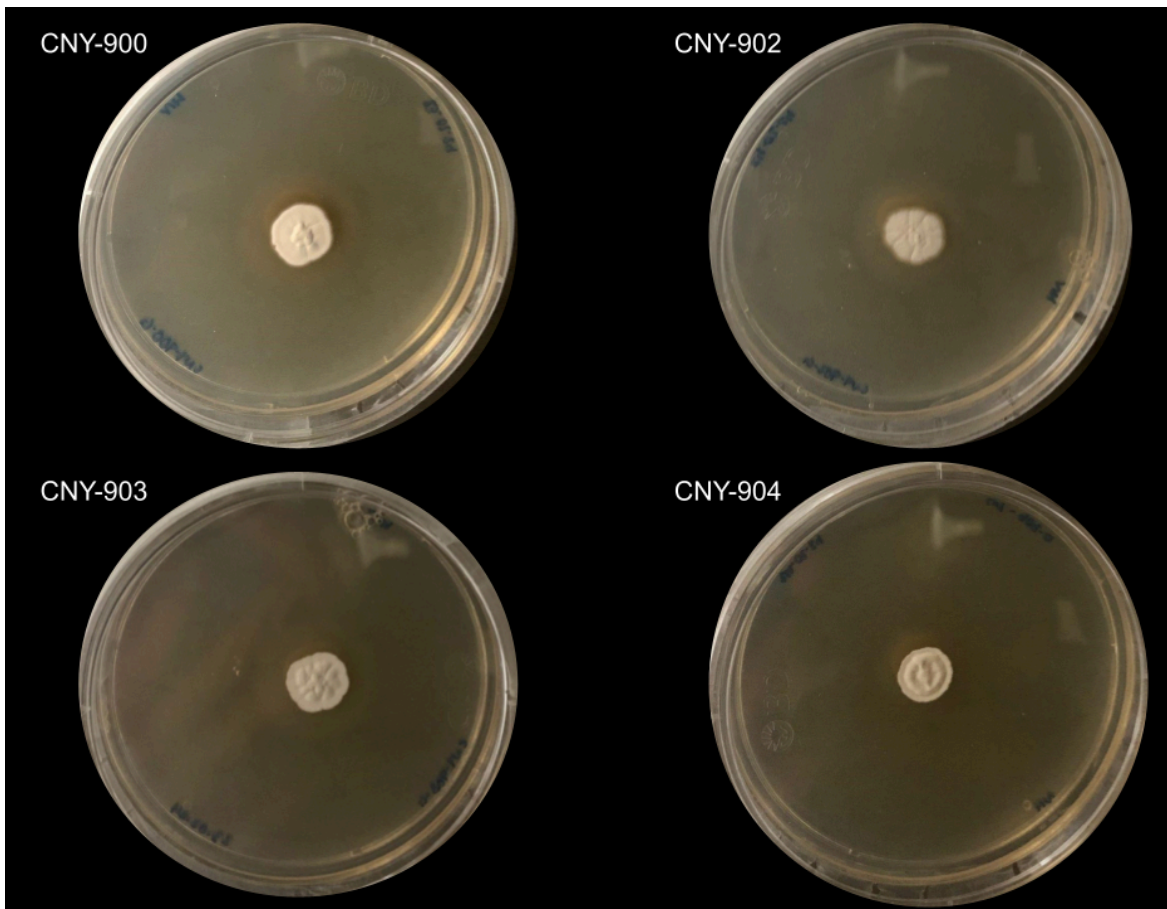


Figura suplementaria 6. Control *Nocardiosis* en gota a las 24 horas de inóculo de la cepa patógena *Vibrio* de la prueba antagónica.

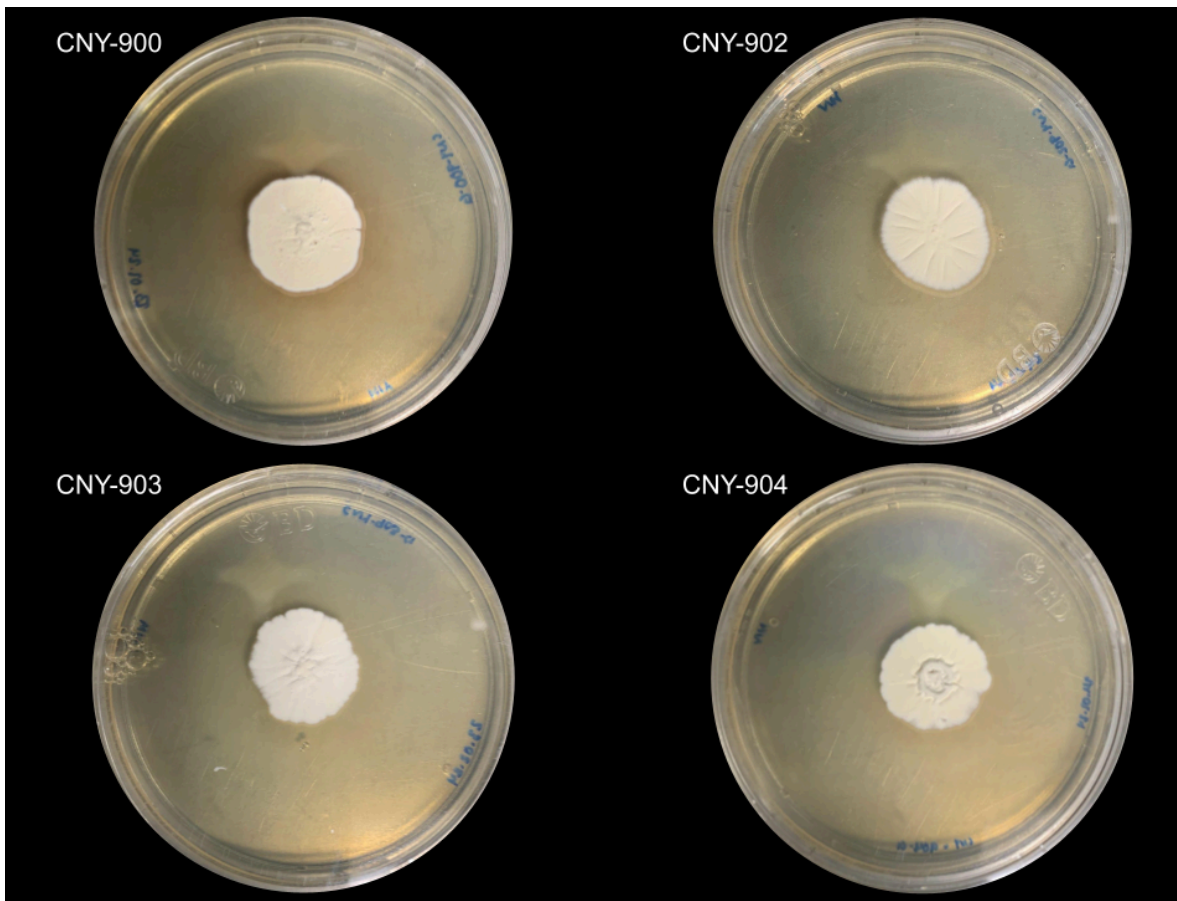


Figura suplementaria 7. Control *Nocardiosis* en gota al sexto día de inóculo de la cepa patógena *Vibrio* de la prueba antagónica.

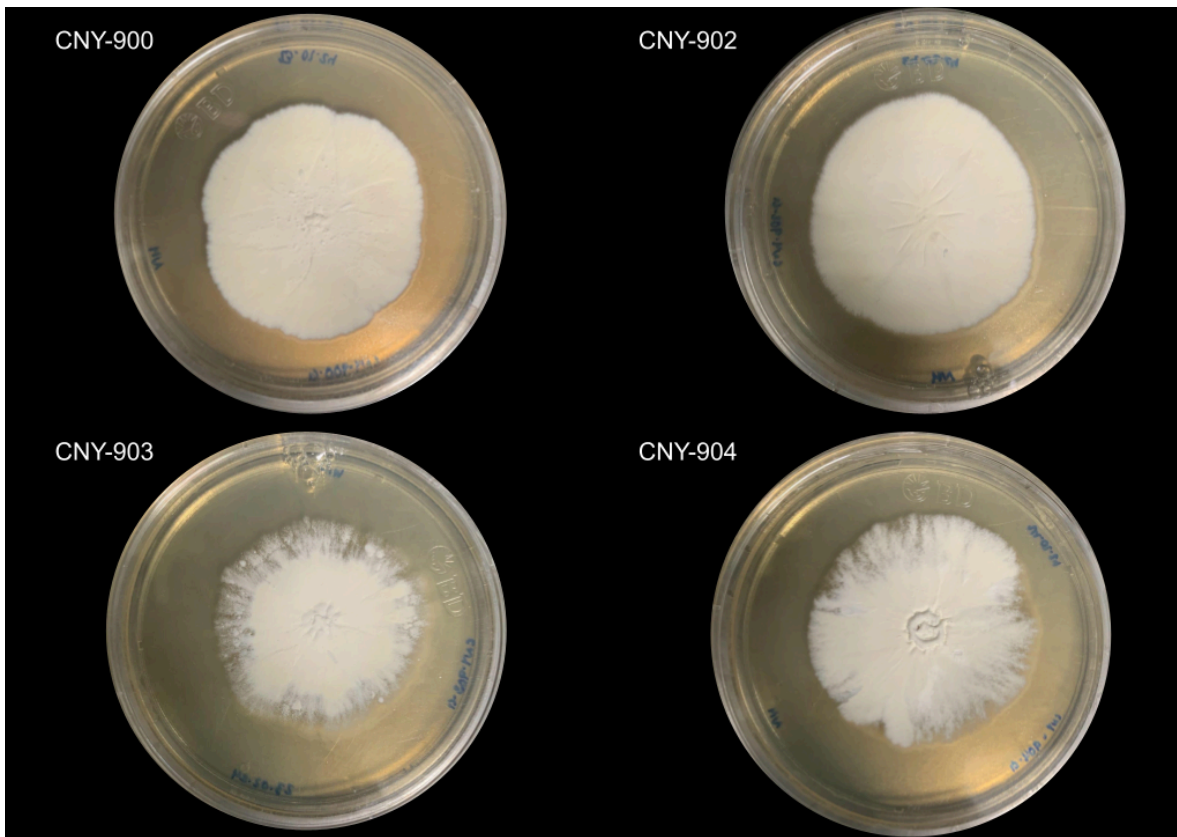


Figura suplementaria 8. Control *Nocardiosis* en gota al día 20 de inóculo de la cepa patógena *Vibrio* de la prueba antagónica.