



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA
FACULTAD DE CIENCIAS MARINAS**



POSGRADO EN CIENCIAS EN OCEANOGRAFÍA COSTERA

T E S I S

**ANÁLISIS GENÓMICO Y POTENCIAL METABÓLICO DE
ACTINOBACTERIAS AISLADAS DE SEDIMENTO MARINO
DE LA LAGUNA OJO DE LIEBRE, MÉXICO.**

Presentada por

CÉSAR OCTAVIO CARREÓN GAXIOLA

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

Ensenada, Baja California, México

Enero 2025

**FACULTAD DE CIENCIAS MARINAS
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES OCEANOLÓGICAS
POSGRADO EN OCEANOGRAFÍA COSTERA**

**ANÁLISIS GENÓMICO Y POTENCIAL METABÓLICO DE
ACTINOBACTERIAS AISLADAS DE SEDIMENTO MARINO DE LA
LAGUNA OJO DE LIEBRE, MÉXICO.**

T E S I S

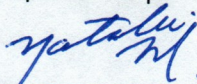
**QUE PARA CUBRIR PARCIALMENTE LOS REQUISITOS NECESARIOS PARA
OBTENER EL GRADO DE**

DOCTOR EN CIENCIAS EN OCEANOGRAFÍA COSTERA

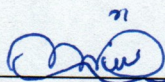
PRESENTA:

CÉSAR OCTAVIO CARREÓN GAXIOLA

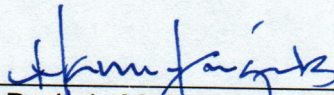
Aprobada por:



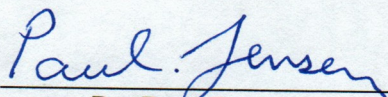
Dra. Natalie Millán Aguiñaga
Directora de tesis



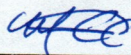
Dra. Mónica Torres Beltrán
Sinodal



Dr. Luis M. Enriquez Paredes
Sinodal



Dr. Paul R. Jensen
Sinodal



Dra. Marlene N. Cardoza Contreras
Sinodal

Asunto: Voto aprobatorio sobre trabajo
de tesis de grado de Doctorado

Dra. Ivone Giffard Mena
Coordinadora de Investigación y
Posgrado, F.C.M.
Presente

Estimada Dra. Giffard:

Me dirijo a usted en mi calidad de **Directora de tesis** encargada de revisar la tesis de Doctorado presentada por el estudiante **Cesar Octavio Carreón Gaxiola**, como parte de los requisitos para obtener el grado de **Doctor en Ciencias en Oceanografía Costera**.

Tras llevar a cabo una revisión minuciosa y exhaustiva del trabajo mencionado, es mi deber informarle que he emitido mi **Voto Aprobatorio** sobre la tesis titulada:

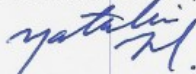
ANÁLISIS GENÓMICO Y POTENCIAL METABÓLICO DE ACTINOBACTERIAS AISLADAS DE SEDIMENTO MARINO DE LA LAGUNA OJO DE LIEBRE, MÉXICO.

He realizado esta revisión con el compromiso de asegurar que el trabajo cumple con los estándares de calidad y excelencia académica requeridos por nuestro programa de posgrado. Después de un análisis detenido, he llegado a la conclusión de que el trabajo de tesis satisface plenamente estos criterios y representa una contribución valiosa al campo de la Oceanografía Costera.

El trabajo exhibe una sólida base teórica, una metodología rigurosa y una presentación coherente de los hallazgos. Las referencias bibliográficas están actualizadas y pertinentes, y las figuras y tablas son claras y respaldan eficazmente los argumentos del texto. La sección de conclusiones proporciona un resumen sólido de los resultados y sus implicaciones, la referencias y citas están actualizadas y son pertinentes.

Ensenada, B. C., 14 de enero de 2025

Atentamente,



Dra. Natalie Millán Aguiñaga
Directora de tesis

c.c.p. Expediente

Asunto: Voto aprobatorio sobre trabajo
de tesis de grado de Doctorado

Dra. Ivone Giffard Mena
Coordinadora de Investigación y
Posgrado, F.C.M.
Presente

Estimada Dra. Giffard:

Me dirijo a usted en mi calidad de **Sinodal** encargada de revisar la tesis de Doctorado presentada por el estudiante **Cesar Octavio Carreón Gaxiola**, como parte de los requisitos para obtener el grado de **Doctor en Ciencias en Oceanografía Costera**.

Tras llevar a cabo una revisión minuciosa y exhaustiva del trabajo mencionado, es mi deber informarle que he emitido mi **Voto Aprobatorio** sobre la tesis titulada:

ANÁLISIS GENÓMICO Y POTENCIAL METABOLICO DE ACTINOBACTERIAS AISLADAS DE SEDIMENTO MARINO DE LA LAGUNA OJO DE LIEBRE, MÉXICO.

He realizado esta revisión con el compromiso de asegurar que el trabajo cumple con los estándares de calidad y excelencia académica requeridos por nuestro programa de posgrado. Después de un análisis detenido, he llegado a la conclusión de que el trabajo de tesis satisface plenamente estos criterios y representa una contribución valiosa al campo de la Oceanografía Costera.

El trabajo exhibe una sólida base teórica, una metodología rigurosa y una presentación coherente de los hallazgos. Las referencias bibliográficas están actualizadas y pertinentes, y las figuras y tablas son claras y respaldan eficazmente los argumentos del texto. La sección de conclusiones proporciona un resumen sólido de los resultados y sus implicaciones, la referencias y citas están actualizadas y son pertinentes.

Ensenada, B. C., 14 de enero de 2025

Atentamente,



Dra. Mónica Torres Beltrán
Sinodal

c.c.p. Expediente

Asunto: Voto aprobatorio sobre trabajo
de tesis de grado de Doctorado

Dra. Ivone Giffard Mena
Coordinadora de Investigación y
Posgrado, F.C.M.
Presente

Estimada Dra. Giffard:

Me dirijo a usted en mi calidad de **Sinodal** encargada de revisar la tesis de Doctorado presentada por el estudiante **Cesar Octavio Carreón Gaxiola**, como parte de los requisitos para obtener el grado de **Doctor en Ciencias en Oceanografía Costera**.

Tras llevar a cabo una revisión minuciosa y exhaustiva del trabajo mencionado, es mi deber informarle que he emitido mi **Voto Aprobatorio** sobre la tesis titulada:

ANÁLISIS GENÓMICO Y POTENCIAL METABÓLICO DE ACTINOBACTERIAS AISLADAS DE SEDIMENTO MARINO DE LA LAGUNA OJO DE LIEBRE, MÉXICO.

He realizado esta revisión con el compromiso de asegurar que el trabajo cumple con los estándares de calidad y excelencia académica requeridos por nuestro programa de posgrado. Después de un análisis detenido, he llegado a la conclusión de que el trabajo de tesis satisface plenamente estos criterios y representa una contribución valiosa al campo de la Oceanografía Costera.

El trabajo exhibe una sólida base teórica, una metodología rigurosa y una presentación coherente de los hallazgos. Las referencias bibliográficas están actualizadas y pertinentes, y las figuras y tablas son claras y respaldan eficazmente los argumentos del texto. La sección de conclusiones proporciona un resumen sólido de los resultados y sus implicaciones, la referencias y citas están actualizadas y son pertinentes.

Ensenada, B. C., 14 de enero de 2025

Atentamente,



Dra. Marlene N. Cardoza Contreras
Sinodal

c.c.p. Expediente

Asunto: Voto aprobatorio sobre trabajo
de tesis de grado de
Doctorado

Dra. Ivone Giffard Mena
Coordinadora de Investigación y
Posgrado, F.C.M.
Presente

Estimada Dra. Giffard:

Me dirijo a usted en mi calidad de **Sinodal** encargado de revisar la tesis de Doctorado presentada por el estudiante **Cesar Octavio Carreón Gaxiola**, como parte de los requisitos para obtener el grado de **Doctor en Ciencias** en Oceanografía Costera.

Tras llevar a cabo una revisión minuciosa y exhaustiva del trabajo mencionado, es mi deber informarle que he emitido mi **Voto Aprobatorio** sobre la tesis titulada:

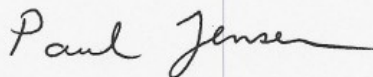
ANÁLISIS GENÓMICO Y POTENCIAL METABÓLICO DE ACTINOBACTERIAS AISLADAS DE SEDIMENTO MARINO DE LA LAGUNA OJO DE LIEBRE, MÉXICO.

He realizado esta revisión con el compromiso de asegurar que el trabajo cumple con los estándares de calidad y excelencia académica requeridos por nuestro programa de posgrado. Después de un análisis detenido, he llegado a la conclusión de que el trabajo de tesis satisface plenamente estos criterios y representa una contribución valiosa al campo de la Oceanografía Costera.

El trabajo exhibe una sólida base teórica, una metodología rigurosa y una presentación coherente de los hallazgos. Las referencias bibliográficas están actualizadas y pertinentes, y las figuras y tablas son claras y respaldan eficazmente los argumentos del texto. La sección de conclusiones proporciona un resumen sólido de los resultados y sus implicaciones, la referencias y citas están actualizadas y son pertinentes.

Ensenada, B. C., 14 de enero de 2025

Atentamente,



Dr. Paul R. Jensen
Sinodal

c.c.p. Expediente

Asunto: Voto aprobatorio sobre trabajo
de tesis de grado de Doctorado

Dra. Ivone Giffard Mena
Coordinadora de Investigación y
Posgrado, F.C.M.
Presente

Estimada Dra. Giffard:

Me dirijo a usted en mi calidad de Sinodal encargado de revisar la tesis de Doctorado presentada por el estudiante **Cesar Octavio Carreón Gaxiola**, como parte de los requisitos para obtener el grado de **Doctor en Ciencias en Oceanografía Costera**.

Tras llevar a cabo una revisión minuciosa y exhaustiva del trabajo mencionado, es mi deber informarle que he emitido mi **Voto Aprobatorio** sobre la tesis titulada:

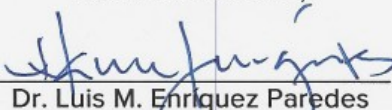
ANÁLISIS GENÓMICO Y POTENCIAL METABÓLICO DE ACTINOBACTERIAS AISLADAS DE SEDIMENTO MARINO DE LA LAGUNA OJO DE LIEBRE, MÉXICO.

He realizado esta revisión con el compromiso de asegurar que el trabajo cumple con los estándares de calidad y excelencia académica requeridos por nuestro programa de posgrado. Después de un análisis detenido, he llegado a la conclusión de que el trabajo de tesis satisface plenamente estos criterios y representa una contribución valiosa al campo de la Oceanografía Costera.

El trabajo exhibe una sólida base teórica, una metodología rigurosa y una presentación coherente de los hallazgos. Las referencias bibliográficas están actualizadas y pertinentes, y las figuras y tablas son claras y respaldan eficazmente los argumentos del texto. La sección de conclusiones proporciona un resumen sólido de los resultados y sus implicaciones, la referencias y citas están actualizadas y son pertinentes.

Ensenada, B. C., 14 de enero de 2025

Atentamente,


Dr. Luis M. Enriquez Paredes
Sinodal

c.c.p. Expediente

Índice

Agradecimientos.....	11
Resumen.....	15
Abstract.....	16
Capítulo 1. Introducción General.....	17
1.1. Generalidades del filo Actinomycetota.....	17
1.2. Taxonomía de Actinomycetota.....	18
1.3. Secuenciación de genomas de actinobacterias.....	19
1.4. Uso de las secuencias genómicas: identificación y clasificación de actinobacterias.....	20
1.5. Metabolismo secundario: Minería Genómica.....	22
1.6. Genes de estrés y adaptación al ambiente marino.....	25
Referencias.....	28
Capítulo 2. Análisis filogenómico de actinobacterias aisladas de sedimento de la Laguna Ojo de Liebre, México.....	40
Capítulo 3. Minería genómica de actinobacterias aisladas de sedimento de la Laguna Ojo de Liebre, México.....	40
ABSTRACT.....	41
RESUMEN.....	42
1. INTRODUCCIÓN.....	42
2. METODOLOGÍA.....	45
2.1. Selección de cepas de actinobacterias, extracción de ADN y secuenciación.....	45
2.2. Análisis bioinformático de los genomas de actinobacterias.....	45
2.3. Análisis filogenómico.....	45
2.4. Minería genómica.....	46
2.5. Comparación de rutas biosintéticas.....	46
2.6. Números de acceso.....	46
3. RESULTADOS.....	47
3.1. Identificación filogenética de los genomas.....	47
3.2. Minería genómica de rutas de genes biosintéticos.....	48
4. DISCUSIÓN.....	56
5. CONCLUSIÓN.....	60
AGRADECIMIENTOS.....	60
CONTRIBUCIÓN DE LOS AUTORES.....	60
CONFLICTO DE INTERESES.....	60
REFERENCIAS.....	61
MATERIAL SUPLEMENTARIO.....	74
Capítulo 4.- Genes de estrés y genes de adaptación al medio marino.....	76
1. Introducción.....	76

2. Objetivo.....	77
3. Metodología.....	77
3.1. Selección de genes relacionados con el estrés y adaptación al ambiente marino	77
3.2. Evaluación de la presencia de genes de estrés y adaptación al ambiente marino en los genomas de actinobacterias.....	73
4. Resultados.....	79
4.1. Comparación de los genes en los 12 genomas de actinobacterias.....	79
4.2. Distribución de los genomas y genes de estrés en la Laguna Ojo de Liebre, BCS, México.....	82
5. Discusión.....	83
6. Conclusión.....	91
7. Referencias.....	92
Capítulo 5. Conclusiones generales.....	101

Índice de tablas y figuras

Capítulo 2. Análisis filogenómico de actinobacterias aisladas de sedimento de la Laguna Ojo de Liebre, México.....	40
Capítulo 3. Minería genómica de actinobacterias aisladas de sedimento de la Laguna Ojo de Liebre, México.....	40
Tabla 1. Características generales de los 12 genomas de actinobacterias aisladas de sedimento marino.....	47
Fig. 1. Árbol filogenético de máxima verosimilitud basado en 100 genes constitutivos utilizando la herramienta autoMLST.....	49
Fig. 2. Mapa de calor de las comparaciones de los valores por arriba del 90% de ANI de los genomas.....	50
Fig. 3. Diversidad de BGC en los 12 genomas de estudio, ordenado por mayor abundancia de ruta metabólica.....	51
Fig. 4. Diversidad de BGC en los 12 genomas de estudio, ordenado por menor abundancia.....	52
Fig. 5. Presencia/ausencia de GCFs en los géneros <i>Micromonospora</i> , <i>Actinomadura</i> , <i>Nocardiopsis</i>	54
Fig. 6. Mapa de calor de comparaciones de GCFs entre géneros de actinobacterias...55	
Capítulo 4.- Genes de estrés y genes de adaptación al medio marino.....	76
Tabla I. Listado de genes de estrés y genes de adaptación al ambiente marino.....	78
Figura 1. Matriz de ausencia/presencia de genes de estrés, genes de adaptación al ambiente marino y partes de aislamiento dentro de la laguna Ojo de Liebre.....	80
Figura. 2. Distribución de genes de estrés y adaptación al medio marino en la Laguna Ojo de Liebre, BCS, México.....	83

Agradecimientos

Quiero expresar mi más profundo agradecimiento a mi directora de tesis, Dra. Natalie Millán Aguiñaga, por su invaluable guía, apoyo y paciencia (sobre todo) a lo largo de este proceso. Su conocimiento, experiencia y dedicación han sido fundamentales para el desarrollo y culminación de este trabajo. Gracias por sus valiosos comentarios, sugerencias y por siempre estar disponible para resolver mis dudas y ofrecer su orientación. Como le he mencionado su compromiso y pasión por la investigación han sido, es y será una fuente constante de inspiración y motivación. Agradezco enormemente la confianza que deposito en mí desde un principio y su constantes palabras, regaños, llamados de atención, todo con la mejor intención para superar los desafíos tanto profesionales y personales que se presentaron durante este camino. Además de su orientación académica, agradezco enormemente los consejos personales que me brindó en momentos de duda y desafío. Su disponibilidad para escucharme y ofrecerme su apoyo emocional ha sido una fuente constante de aliento y motivación. Gracias por estar siempre presente y por ayudarme a encontrar el camino cuando me sentía perdido. Su dedicación, paciencia y comprensión han hecho de esta experiencia no solo un logro académico, sino también un crecimiento personal. Estoy profundamente agradecido por todo lo que ha hecho por mí. Sin su apoyo, este proyecto no hubiera sido posible. Se que personalmente siempre como la considerare como mi mentora y modelo a seguir, pero sobre todo se que me llevo una gran amistad con la que podre confiar siempre.

Quiero agradecer a la Dra. Mónica Torres Beltrán por su inestimable contribución a este trabajo. Gracias a sus constantes revisiones de la tesis, su meticulosa atención al detalle y sus valiosos comentarios, este proyecto ha alcanzado un nivel de calidad que no hubiera sido posible sin su intervención. Además, su ayuda en la creación de las figuras ha sido fundamental para ilustrar y comunicar de manera efectiva los resultados y conceptos presentados en esta tesis. Su habilidad para visualizar y representar la información de manera clara y precisa ha enriquecido enormemente este trabajo. Por último, pero no menos importante, agradezco profundamente a la Dra. Mónica por su capacidad para ayudarme a pensar más allá de lo evidente, desafiándome a explorar nuevas ideas y perspectivas. Su enfoque crítico y su visión amplia han sido una fuente constante de inspiración y crecimiento intelectual. Me llevo su amistad, siga así Dra. Mónica es una excelente persona.

Quiero expresar mi más sincero agradecimiento al sínodo integrado por el Dr. Luis Enríquez Paredes, el Dr. Paul R. Jensen y la Dra. Marlene Nohemí Cardoza Contreras por su valiosa contribución y apoyo durante el desarrollo de esta tesis. Al Dr. Luis Enríquez Paredes, agradezco su profundo conocimiento y sus perspicaces comentarios, que han enriquecido significativamente este trabajo. Su experiencia y sabiduría han sido una guía invaluable en este proceso. Al Dr. Paul R. Jensen, le estoy profundamente agradecido por su meticulosa revisión, sugerencias constructivas y por integrarme al journal club de su

laboratorio y compartir con sus alumnos, Thanks so much Paul, for everything. Su enfoque crítico y su dedicación han sido fundamentales para mejorar la calidad de esta investigación. A la Dra. Marlene Nohemí Cardoza Contreras, quiero expresar mi gratitud por su apoyo constante y sus valiosos consejos. Su compromiso y su disposición para ayudarme han sido una fuente de motivación y aliento. A todos ustedes, gracias por su tiempo, su paciencia y su inestimable contribución. Este trabajo no hubiera sido posible sin su valiosa colaboración y apoyo.

Al CONAHCYT, por el apoyo económico, que sin el no hubiera sido posible terminar este proyecto.

A la Facultad de Ciencias Marinas por aceptarme en el programa de Doctorado en Oceanografía Costera por darme un lugar en y brindarme las herramientas y conocimientos para poder concluir este proyecto.

A mis hermosos y maravillosos padres, Flerida Gaxiola M. y César O. Carreón P. Gracias por su amor incondicional, su apoyo constante y su comprensión durante todas las etapas de mi vida, especialmente durante este proceso de tesis. A lo largo de este tiempo, hubo muchas ocasiones en las que estuve ausente, pero siempre sentí su presencia y su aliento. No tengo palabras suficientes para agradecerles por la vida que me han dado, la educación que me han proporcionado y el apoyo inquebrantable que siempre me han brindado. Los amo muchísimo y siempre estaré agradecido con ustedes por todo. Espero que la vida me dé muchísimo tiempo para disfrutarlo a su lado y poder devolverles, aunque sea una pequeña parte, de todo lo que han hecho por mí.

A mis hermanas, Frida Sophia y María Fernanda. Su amor, apoyo y comprensión han sido una fuente constante de motivación y aliento durante todo este proceso. Frida Sophia y María Fernanda, gracias por estar siempre a mi lado, por sus palabras de ánimo y por su paciencia en los momentos en que estuve más ocupado y menos disponible. Su cariño y su fe en mí han sido fundamentales para que pudiera llegar hasta aquí. Las quiero muchísimo y estoy profundamente agradecido por todo lo que han hecho por mí. Espero que la vida nos dé muchas más oportunidades para compartir y disfrutar juntos. La neta que son todo para mí. Las extraño muchísimo.

A mis suegros y a mi cuñada por su invaluable apoyo y comprensión durante todo este proceso. A mis suegros, gracias por su cariño, su paciencia y su constante apoyo en todos los sentidos. Su apoyo ha sido una fuente de motivación y su comprensión ha sido fundamental en momentos de estrés y desafío. Valoro enormemente la manera en que me han acogido y apoyado, no solo en este proyecto, sino en todas las etapas de mi vida, los respeto, los quiero y amo mucho. A mi cuñada Wendy, gracias por tu amistad, tu apoyo y tus palabras de ánimo. Tu presencia, tu compañía y risas han sido un gran consuelo y una fuente de alegría. Agradezco profundamente tu comprensión y tu

disposición para ayudarme en todo momento. A todos ustedes, gracias por ser parte de mi vida y por su incondicional apoyo. Espero que podamos seguir compartiendo muchos momentos felices juntos.

a mis tíos, Aldo Gaxiola y Roger Pineda. Los amo muchísimo y su apoyo durante todos estos años viviendo en Baja California ha sido invaluable para mí. Gracias a la vida por haberme permitido volver a cruzarme con ustedes y convivir durante la pandemia y el día a día. Su presencia, cariño y apoyo han sido una fuente constante de motivación y aliento. Su generosidad y comprensión han hecho que esta etapa de mi vida sea mucho más llevadera y significativa. Su amor y apoyo serán siempre invaluablees para mí, y estoy profundamente agradecido por todo lo que han hecho. Espero que podamos seguir compartiendo muchos momentos felices juntos. Las palabras jamás me alcanzaran para agradecerles por todo!!

A mis amigos del alma: Alejandro, Luis, Yamilt, Evelyn, América, Celina, Koki, Jaime y Jessica. Su amistad, apoyo y compañía han sido fundamentales para mí durante todo este proceso. Gracias por estar siempre presentes, por sus palabras de ánimo, por sus risas y por los momentos compartidos que han hecho este camino mucho más llevadero y significativo. Su amistad ha sido una fuente constante de motivación y aliento, y valoro enormemente cada uno de ustedes. A todos los que me faltan por mencionar, también les agradezco de corazón. Cada uno de ustedes ha dejado una huella especial en mi vida y ha contribuido de manera única a mi crecimiento personal y profesional. Espero que la vida nos dé muchas más oportunidades para seguir compartiendo y creando recuerdos juntos. Con gratitud, cariño y amor.

Quiero expresar mi más sincero agradecimiento a mis amigos de Ensenada, quienes en poco tiempo se han convertido en un gran apoyo para mí: Joaquín, Mayela, Alan, Gustavo, Sebastián, Angelica, David, Karla, Blanca, Dámaso, Alicia, Aaron y Selene. Su amistad, compañía y apoyo han sido invaluablees a lo largo y ancho de estos años. Gracias por su generosidad, sus palabras de aliento y por los momentos compartidos que han hecho este camino mucho más llevadero y significativo. Su presencia ha sido una fuente constante de motivación y su amistad ha enriquecido enormemente mi experiencia. También quiero agradecer a todos mis compañeros del posgrado. Su compañerismo, colaboración y apoyo mutuo han sido fundamentales para superar los desafíos académicos y personales que hemos enfrentado juntos. Valoro enormemente la comunidad que hemos formado y las experiencias compartidas. A todos ustedes, gracias por ser parte de esta etapa tan importante de mi vida. Espero que podamos seguir compartiendo y creando recuerdos juntos en el futuro.

Quiero dedicar un espacio especial para recordar a mis abuelos, Juan de Dios y Florentina, quienes se me adelantaron y no lograron ver este producto final. Aunque no están físicamente conmigo, sé que están cuidándome desde el cielo y que su amor y apoyo siempre estarán presentes en mi vida. Abuelos, su legado y sus enseñanzas han

sido una guía constante para mí. Su recuerdo me inspira a seguir adelante y a esforzarme por alcanzar mis metas. Aunque no puedan ver este logro, sé que están orgullosos de mí y que su espíritu me acompaña en cada paso que doy. Gracias por todo lo que me enseñaron y por el amor incondicional que siempre me brindaron. Los llevo en mi corazón y su memoria vivirá siempre en mí.

Por último, pero no menos importante, quiero expresar mi más profundo agradecimiento a mi esposa, Paloma S. Almeida Luna. Eres todo para mí, mi mayor anhelo, mi cochi, mi motor en la vida. Paloma, tu amor, apoyo y comprensión han sido fundamentales para que pudiera llegar hasta aquí. Gracias por estar siempre a mi lado, por tus palabras de ánimo y por tu paciencia en los momentos más desafiantes. Tu presencia y tu fe en mí han sido lo mejor que me ha pasado en la vida entera. Este producto es también tuyo, porque sin ti, simplemente no hubiera sido posible. Eres mi compañera, mi confidente y mi mayor inspiración. Estoy profundamente agradecido por todo lo que has hecho por mí y espero que podamos seguir construyendo juntos un futuro lleno de amor y éxitos. Te amo y gracias por compartir esta etapa.

Resumen

Este estudio se centra en el análisis filogenómico y del metabolismo secundario de 12 actinobacterias aisladas de sedimentos marinos de la Laguna Ojo de Liebre, México. Esta laguna hipersalina, un hábitat esencial para especies migratorias, representa un ambiente único poco explorado en términos de su diversidad microbiana. Mediante secuenciación y análisis genómico, se caracterizaron las relaciones filogenéticas y la capacidad biosintética de estas cepas, así como sus mecanismos de adaptación a este ecosistema. El análisis filogenómico, basado en el gen 16S ARNr, MLSA, ANI y dDDH, reveló la presencia de tres géneros: *Actinomadura*, *Nocardiopsis* y *Micromonospora*, y sugirió la existencia de cinco cepas candidatas a nuevas especies dentro del género *Micromonospora*. La minería genómica, empleando herramientas como antiSMASH y BiG-SCAPE, identificó 314 Grupos de Genes Biosintéticos (BGCs), principalmente terpenos, T1PKS, NRPS y RiPPs. La baja similitud de los GCFs con las bases de datos de referencia, junto con la actividad anticancerígena reportada previamente en estas cepas, resalta su potencial biotecnológico para la producción de nuevos compuestos. Además, la identificación de genes relacionados con la respuesta al estrés oxidativo, estrés osmótico, choque térmico y la adaptación a la limitación de nutrientes, evidencia la capacidad de estas actinobacterias para prosperar en las condiciones desafiantes de la Laguna Ojo de Liebre. Este estudio no solo amplía el conocimiento sobre la diversidad actinobacteriana, sino que también destaca su potencial para el descubrimiento de nuevos fármacos y aplicaciones biotecnológicas.

Abstract

This research investigates the phylogenomic characteristics and secondary metabolism of 12 actinobacteria isolated from marine sediments in the Ojo de Liebre Lagoon, Mexico. This hypersaline lagoon serves as a crucial habitat for migratory species and is a unique environment that remains largely unexplored regarding its microbial diversity. Through genomic sequencing and analysis, the study characterized the phylogenetic relationships and biosynthetic capabilities of these strains, as well as their adaptive mechanisms to this ecosystem. The phylogenomic assessment, utilizing the 16S rRNA gene, MLSA, ANI, and dDDH methods, identified three genera: *Actinomadura*, *Nocardiopsis*, and *Micromonospora*, and indicated the presence of five candidate strains for new species within the *Micromonospora* genus. Genomic mining techniques, including antiSMASH and BiG-SCAPE, uncovered 314 Biosynthetic Gene Clusters (BGCs), predominantly consisting of terpenes, T1PKS, NRPS, and RiPPs. The low similarity of the identified GCFs with reference databases, combined with previously documented anticancer activity in these strains, underscores their biotechnological potential for generating new compounds. Additionally, the discovery of genes associated with responses to oxidative stress, osmotic stress, heat shock, and nutrient limitation illustrates the ability of these actinobacteria to flourish under the challenging conditions present in the Ojo de Liebre Lagoon. This study not only enhances our understanding of actinobacterial diversity but also highlights their promising potential for drug discovery and biotechnological innovations.

Capítulo 1. Introducción General

1.1. Generalidades del filo Actinomycetota

El filo Actinomycetota (antes conocido como Actinobacteria) es uno de los linajes más diversos del dominio Bacteria. Los miembros de este filo son bacterias Gram-positivas, ubicuas, las cuales desempeñan papeles importantes en la descomposición de materia orgánica, fijación de nitrógeno y la producción de antibióticos (He et al., 2023; Barka et al., 2016; van der Meij et al., 2017). Una de las características distintivas de este filo es su pared celular única de peptidoglicano, que proporciona soporte estructural y juega un papel en la división celular. Los miembros este grupo a menudo muestran ciclos de vida complejos que involucran etapas múltiples, como micelio y esporas, lo que les permite adaptarse a cambios en las condiciones ambientales (Claessen *et al.*, 2014; Lewin *et al.*, 2016; van de Meij *et al.*, 2017). Entre otras de sus características destacan también es su alto contenido de G+C y tamaños de genoma de 0.5 hasta 15.0 Mbp (Seshadri et al., 2022).

Los miembros del filo Actinomycetota sobresalen por su capacidad para producir enzimas y otros compuestos bioactivos extracelulares, como antibióticos, lo que les permite sobrevivir y prosperar en entornos competitivos (Olanrewaju y Babalola, 2019). Estos microorganismos son particularmente abundantes en ecosistemas acuáticos, donde los sedimentos marinos representan una de las principales reservas de diversidad de Actinomycetota (Stincone y Brandelli, 2020; Subramani y Aalbersberg, 2012). Esta diversidad no solo contribuye a la riqueza biológica de estos entornos, sino que también ofrece un potencial significativo para el descubrimiento de nuevos compuestos bioactivos con aplicaciones en la medicina y la biotecnología.

1.2. Taxonomía de Actinomycetota

La taxonomía y filogenia del filo Actinomycetota se encuentra en constante cambio con la llegada de nuevas técnicas moleculares y genómicas, lo que ha llevado a la propuesta de una nueva nomenclatura para este filo, cambiando de Actinobacteria a Actinomycetota, y a la demostración de una relación evolutiva más compleja con los filos Proteobacteria y Chlorobi de lo que se pensaba anteriormente (Gupta y Khadka, 2015; Nouiou et al., 2018; Oren y Garrity, 2021; Panda *et al.*, 2022). Por ejemplo, basándose en la secuenciación del

gen 16S ARNr, el filo Actinomycetota se divide actualmente en seis clases: Acidimicrobiia, Coriobacteriia, Thermoleophilia, Rubrobacteria, Nitriliruptoria, Actinobacteria (Salam *et al.*, 2020). A su vez, estas incluyen varios órdenes, entre los que se encuentran Actinomycetales, Bifidobacteriales, Corynebacteriales, Micrococcales, Propionibacteriales y Pseudonocardiales.

Especialmente, el orden Actinomycetales es conocido por su capacidad para producir una gran variedad de compuestos bioactivos, como antibióticos, antifúngicos y anticancerígenos. Este orden incluye el género *Streptomyces*, que es el grupo de actinobacterias más frecuentemente aislado y por ende mayor estudiado (Aryal *et al.*, 2020; Kemung *et al.*, 2018; Quinn *et al.*, 2020). Aunque el género *Streptomyces* es el más estudiado y conocido por su capacidad para producir compuestos naturales, estudios recientes han demostrado que hay muchas otras actinobacterias que no pertenecen a este género ("actinobacterias raras"), especialmente aquellas aisladas de ambientes extremos, pero que también tienen un potencial grande para la producción de nuevos compuestos naturales (Hu *et al.*, 2020; Hui *et al.*, 2021; Subramani y Sipkema, 2019). Sin embargo, éstas siguen siendo relativamente poco estudiadas en comparación con el género *Streptomyces* y con otros grupos bacterianos (Doroghazi y Metcalf, 2013; Millán-Aguíñaga *et al.*, 2019; Parra *et al.*, 2023). El potencial de algunas actinobacterias raras como fuente de compuestos bioactivos ha sido evaluado principalmente en los géneros *Micromonospora*, *Amycolaptosis*, *Saccharopolyspora* y *Salinispora* (Amin *et al.*, 2020; Ding *et al.*, 2019; Lazzarini *et al.*, 2000; Seipke *et al.*, 2013). Actualmente, la mayoría de los estudios se han centrado en *Micromonospora*, el segundo género con más compuestos naturales descubiertos, como antimicrobianos (Parra *et al.*, 2023). El estudio de este tipo de géneros raros o poco representados, un género con gran potencial biotecnológico y poco explorado, podría brindar valiosos conocimientos taxonómicos, filogenéticos y biotecnológicos, abriendo nuevas posibilidades para el descubrimiento de compuestos bioactivos y una mejor comprensión de la diversidad microbiana.

Por otro lado, la taxonomía y filogenia de las actinobacterias se encuentra en constante evolución (Nouiou *et al.*, 2018; Oren y Garrity, 2021; Salam *et al.*, 2020), y resulta relevante destacar el papel fundamental que desempeñan las herramientas moleculares en estas disciplinas. Ejemplos de ello son el uso de la secuenciación del genoma completo y la genómica comparativa, así como el uso de genes marcadores, como el gen 16S ARNr, que han permitido obtener más resolución en la taxonomía de este filo y

comprender mejor las relaciones evolutivas entre las actinobacterias (Amin *et al.*, 2020; Barka *et al.*, 2016; Panda *et al.*, 2022). Por ejemplo, Ramírez-Durán *et al.* (2021) lograron caracterizar a las especies y detectar un evento reciente de especiación, utilizando un enfoque de taxogenómica y genómica comparativa en el género *Saccharomonospora*.

1.3. Secuenciación de genomas de actinobacterias

La secuenciación de actinobacterias se realiza no solo con el propósito de caracterizarlas para su identificación taxonómica, sino para conocer la diversidad genética y reconocer las adaptaciones que potencian la detección de genes responsables de la producción de metabolitos secundarios (MS) (van Bergeijk *et al.*, 2020), particularmente de aquellos con funciones previamente no estudiadas y que han abierto paso a nuevas aplicaciones en áreas como la medicina, la agricultura y la biotecnología (Amin *et al.*, 2020; Blunt *et al.*, 2017; Salwan y Sharma, 2020). Por ejemplo, en un estudio reciente de De Rop *et al.* (2021), quienes utilizaron la secuenciación de genomas y herramientas de biología sintética, se identificaron 12 nuevas clases de alcaloides derivados de actinobacterias marinas.

La secuenciación de genomas también, ha permitido investigar los mecanismos que permiten a las actinobacterias adaptarse a su entorno y sobrevivir en ambientes con condiciones extremas como desiertos, aguas termales, lagos salados o respiraderos hidrotermales marinos (Gurunathan *et al.*, 2021; Hussein *et al.*, 2018; Mohammadipanah y Wink, 2015; Zamora-Quintero *et al.*, 2022). En particular, su aplicación en la caracterización de genomas de actinobacterias raras aisladas de estos ambientes puede ejemplificarse con el estudio realizado por López-Pérez *et al.* (2020), en el cual identificaron una isla genómica flexible conservada exclusivamente en una subclase de actinobacterias marinas definidas como “candidatas Actinomarinales”. Este hallazgo ha permitido profundizar en el estudio la evolución y la fisiología de estos microorganismos, caracterizando e identificando genes, así como vías metabólicas secundarias desconocidas (Amin *et al.*, 2020; Burkovski, 2024; Land *et al.*, 2015; Qin *et al.*, 2019; Turrone *et al.*, 2021; Ventura *et al.*, 2007).

No obstante, pese al incremento actual en la publicación de genomas de actinobacterias en bases de datos, incluyendo aislados públicos y genomas ensamblados por metagenomas (MAGs), se estima que estos representan tan solo entre un 30% y un 50% de los taxones de actinobacterias proyectados. Con base en lo anterior sugiere que aún quedan una cantidad importante de representantes de este filo por descubrir y estudiar en

cuanto a su diversidad y potencial biotecnológico (Kalkreuter *et al.*, 2020; Seshadri *et al.*, 2022). Es por ello que, en la actualidad los esfuerzos de aislamiento se enfocan en la recuperación de actinobacterias raras y la secuenciación de sus genomas, con lo que se busca incrementar la probabilidad del descubrir de nuevos metabolitos secundarios que contribuyan con el conocimiento de las funciones ecológicas de éstos en el medio ambiente, pero también aquellos con potencial biotecnológico (van Bergeijk *et al.*, 2020).

1.4. Uso de las secuencias genómicas: identificación y clasificación de actinobacterias

La identificación y clasificación de las actinobacterias a nivel de género ha dependido tradicionalmente de una combinación de métodos fenotípicos y genotípicos. Entre los métodos fenotípicos se incluyen la morfología y las características fisiológicas, mientras que entre los genotípicos se encuentra la secuenciación del gen 16S rRNA. Sin embargo, debido a la gran diversidad y complejidad de este filo, estos enfoques han resultado insuficientes para garantizar una clasificación precisa y confiable. Por lo tanto, se han desarrollado y aplicado nuevas técnicas moleculares y genómicas para mejorar la identificación y clasificación de estos microorganismos, lo que ha permitido una comprensión más profunda de la diversidad.

En los últimos años, ha ganado popularidad en la investigación de actinobacterias el uso de un único par de genes o de una sola copia de un gen como marcador molecular para la identificación y clasificación a nivel de género, *i.e.* el gen 16S ARNr, uno de los genes más implementados en la taxonomía de bacterias (Nouiou *et al.*, 2018). También, se utilizan otros genes como, el gen *rpoB*, que codifica la subunidad beta de la ARN polimerasa, o el gen *recA*, que codifica una recombinasa del ADN implicada en la reparación y recombinación del ADN. Se ha demostrado que estos genes están conservados entre las especies de actinobacterias, y sus secuencias pueden utilizarse para inferir relaciones evolutivas y distinguir entre especies y géneros estrechamente relacionados (Lalucat *et al.*, 2020). El uso de un par de genes o de un gen único para la taxonomía de actinobacterias presenta varias ventajas sobre los métodos tradicionales, y hoy en día se sigue utilizado para identificar diferentes géneros de actinobacterias, como *Streptomyces*, *Salinispora*, *Micromonospora*, *Saccharopolyspora*, *Saccharomonospora*, *Stackebrandtia*, *Actinopolymorpha*, *Actinomadura*, *Nocardiosis*, y *Verrucosisspora* (Román-Ponce *et al.*, 2020; Pinto-Almeida *et al.*, 2021; Said Hassane *et al.*, 2020). Por lo tanto, el análisis de estos genes es considerado más objetivo y reproducible, ya que se

basa en el análisis de secuencias genéticas específicas en lugar de en características morfológicas o fisiológicas. Además, permite la identificación de nuevas especies y géneros, así como la reclasificación de taxones existentes en función de sus relaciones evolutivas (Nouiou *et al.*, 2018).

El uso simultáneo de varios genes constitutivos, como el análisis de secuencias multilocus (MLSA), ha surgido como una alternativa más sólida y fiable para la taxonomía de actinobacterias (Adamek *et al.*, 2018; Alanjary *et al.*, 2019; Lalucat *et al.*, 2020). El MLSA implica el análisis simultáneo de varios genes de mantenimiento conservados a nivel de especie o género. Estos genes suelen estar implicados en funciones celulares básicas y, por lo tanto, es menos probable que se vean afectados por la transferencia horizontal de genes u otros acontecimientos evolutivos que pueden influir en el análisis filogenético (Chun *et al.*, 2018; Kim *et al.*, 2022). Por ejemplo, en un estudio realizado por Komaki y Tamura (2021) mediante el uso de MLSA se logró reclasificar cuatro subespecies del género *Streptomyces* a nivel de especies. También, Nouiou *et al.* (2018) utilizaron un muestreo exhaustivo de secuencias de genoma completo de cepas tipo de actinobacterias con las cuales construyeron árboles filogenéticos mediante MLSA a escala genómica y de esta manera hacer una reclasificación de este filo.

Recientemente, han surgido métodos *in-silico* como la identidad nucleotídica media (ANI) y la hibridación digital ADN-ADN (dDDH), que resultan herramientas incluso más precisas y fiables para la taxonomía de actinobacterias que el MLSA (Muller & Epstein, 2012; Raina *et al.*, 2019). El ANI es una medida de la similitud global entre dos genomas basada en la identidad nucleotídica media de todos los genes compartidos. Proporciona una comparación más exhaustiva de la similitud utilizando todo el genoma entre dos cepas, a diferencia del MLSA, que solo tiene en cuenta un número limitado de genes. Los valores de ANI pueden utilizarse para definir los límites de las especies, aceptándose generalmente un rango de 95-96% (Stackebrandt y Ebers, 2006). Por otro lado, el dDDH es un método que compara la similitud genómica de dos cepas calculando el grado de hibridación ADN-ADN entre sus genomas y se considera el estándar para la delimitación de especies bacterianas. El dDDH permite llevar a cabo el análisis utilizando exclusivamente datos genómicos, sin la necesidad de realizar experimentos en el laboratorio, mejorando significativamente la eficiencia y la accesibilidad del proceso de comparación de genomas, al tiempo que ha reducido los costos y el tiempo necesarios para obtener resultados precisos (Auch *et al.*, 2010).

Se ha observado una tendencia en la última década hacia la adopción de comparaciones *in-silico* debido a su capacidad para realizar predicciones más precisas en comparación con los datos experimentales (Katsonis *et al.*, 2022). Estudios han demostrado una correlación entre los valores de ANI y DDH, estableciendo umbrales que permiten la delimitación de especies. En particular, se ha propuesto que un valor de ANI superior a 95% corresponde aproximadamente a un 70% de DDH (Goris *et al.*, 2007; Muller y Epstein, 2012). Debido a esta relación diversos grupos de investigación han adoptado y combinado estos enfoques para identificar y clasificar con precisión nuevas especies bacterianas (Chun *et al.*, 2018; Millán-Aguiñaga *et al.*, 2017; Parks *et al.*, 2021). En el estudio de Riesco y Trujillo (2024) actualizaron las directrices publicadas por Chun *et al.* (2018), en su trabajo describen los nuevos requerimientos para el uso de estas herramientas *in-silico* con fines taxonómicos. Por otro lado, en un estudio, realizado por Millán-Aguiñaga *et al.* (2017) que integró la herramienta ANI en su metodología, proporcionó una nueva visión sobre la diversidad del género *Salinispora* y derivó en el descubrimiento de siete especies. También, en un estudio hecho por Bouznada *et al.* (2023), utilizaron enfoques basados en el genoma para investigar aún más la relación taxonómica entre *Kitasatospora cineracea* DSM 44780T y *Kitasatospora niigatensis* DSM 44781T, dos especies que fueron descritas previamente por Tajima *et al.* (2001) utilizando DDH y comparaciones de características fisiológicas. Se calcularon los valores de dDDH y ANI entre los genomas de las dos cepas tipo y los valores de similitud excedieron los límites para la delimitación de especies, sugiriendo que ambas cepas comparten la misma posición taxonómica. Esto evidencia que estas herramientas de comparación genómica son de gran utilidad y subraya su eficacia durante la delimitación de especies bacterianas. Por lo que es importante integrarlas a los esquemas de trabajo de genómica comparativa.

1.5. Metabolismo secundario: Minería Genómica

Otra de las aplicaciones de la secuenciación es la minería genómica, la cual usa secuencias genómicas para identificar genes y vías metabólicas involucradas en la producción de metabolitos secundarios (MS). Los MS son pequeñas moléculas producidas por microorganismos que no son esenciales para su crecimiento o supervivencia, pero que pueden proporcionarles una ventaja competitiva en su entorno (van Bergeijk *et al.*, 2020). Se sabe que las actinobacterias son prolíficas productoras de MS, muchos de los cuales tienen importantes aplicaciones farmacológicas e industriales (Bream *et al.*, 2001; Gong *et al.*, 2018; Jakubiec-Krzesniak *et al.*, 2018; Tao *et al.*, 2019). Sin embargo, los métodos tradicionales para descubrir nuevos metabolitos secundarios

requieren mucho tiempo y trabajo (Awan *et al.*, 2016; Baral *et al.*, 2018). La minería genómica ha revolucionado la forma en que se descubren y predicen los metabolitos secundarios en las actinobacterias. La minería genómica utiliza secuencias genómicas para identificar genes y vías metabólicas involucrados en la producción de MS (Baral *et al.*, 2018). En particular, esta herramienta ha permitido descubrir numerosos MS de actinobacterias, muchos de los cuales tienen aplicaciones potenciales en medicina y agricultura. Por ejemplo, en un estudio realizado por Hover *et al.* (2018), se utilizó la minería genómica para identificar una nueva clase de antibióticos, denominados malacidinas, a partir de ADN de muestras ambientales. También, en un estudio realizado por Hossain *et al.* (2023), se exploró el potencial del género *Salinispora* como fuente de productos naturales para la industria farmacéutica. A través de minería genómica, se identificaron 686 clústeres biosintéticos, incluyendo no solo grupos de genes biosintéticos (BGCs) conocidos, sino otros exclusivos del género, lo que sugiere un potencial adicional para el desarrollo de fármacos. Además, se analizaron genes relacionados con enzimas activas en carbohidratos, destacando la relevancia de esta investigación en la producción de compuestos bioactivos innovadores para la biotecnología. Además, en un estudio de minería genómica realizado por França *et al.* (2023), se encontraron un total de 24 BGCs en una cepa de *Streptomyces albidoflavus* aislada de un tunicado *Salpa* sp. en el Antártico. Se encontró que la variación en los medios de cultivo y métodos de extracción puede mejorar la expresión y recuperación de estos compuestos naturales, lo que sugiere una estrategia prometedora para intensificar la producción de metabolitos bioactivos.

Existen varias herramientas bioinformáticas y bases de datos, como antiSMASH, BiG-SCAPE, PRISM, ClusterFinder, por mencionar algunas, que utilizan una combinación de búsquedas de similitud de secuencias, análisis de clústeres de genes y algoritmos de aprendizaje automático para identificar posibles BGCs y predecir las estructuras de los MS correspondientes (Blin *et al.*, 2023; Cimermanic *et al.*, 2014; Manikkam *et al.*, 2019; Navarro-Muñoz *et al.*, 2020; Skinnider *et al.*, 2020; Zhang *et al.*, 2020). Los MS se encuentran codificados y organizados en BGC, los cuales también codifican la maquinaria modular enzimática necesaria para su síntesis. Tal es el caso de las policétido sintetasas (PKS), sintetasas peptídicas no ribosómicas (NRPS), péptidos sintetizados ribosomalmente y modificados postraduccionalmente (RiPPs), terpenos, sacáridos, entre otros (Arulprakasam & Dharumadurai, 2021; Naughton *et al.*, 2017). Sin embargo, a medida que se descubren y analizan más BGCs, queda claro que aún hay mucho por aprender sobre los mecanismos que llevan a su diversificación. En la actualidad es de

particular interés el poder caracterizar BGC “ocultos” con el fin de evaluar la biosíntesis de MS que no se expresan en condiciones normales de laboratorio (Dat *et al.*, 2022; Siro *et al.*, 2022). La información obtenida de la caracterización de los BGC puede ser utilizada en estudios posteriores para el aislamiento y purificación de los MS en condiciones de laboratorio, así como para predecir las estructuras de los nuevos MS (van Bergeijk *et al.*, 2020), lo que podría tener implicaciones importantes en la búsqueda de nuevos medicamentos y otras aplicaciones biotecnológicas.

La producción de MS en actinobacterias es un proceso complejo que implica la expresión coordinada de varios genes y en el que influyen diversos factores, como la diversidad genética y las condiciones ambientales, así como el tipo y la disponibilidad de nutrientes (Al-Shaibani *et al.*, 2021; Faddetta *et al.*, 2023; Hoskinsson y Fernández-Martínez, 2018; Ngamcharungchit *et al.*, 2023). La disponibilidad de nutrientes, es uno de los factores que más influyen en la producción de metabolitos secundarios en las actinobacterias (Hoskinsson y Fernández-Martínez, 2018); muchas actinobacterias son organismos saprófitos que habitan en entornos ricos en nutrientes, como el suelo y los sedimentos. Además, este grupo de bacterias ha evolucionado produciendo metabolitos secundarios, los cuales les permiten competir de manera eficiente con otros microorganismos por los recursos disponibles (Barka *et al.*, 2016). Esto ha hecho que se implemente el uso de co-cultivos con otros microorganismos (principalmente patógenos) en los cuales se ha evidenciado la síntesis de compuestos con actividades antimicrobianas y antihelmínticas. Por ejemplo, la cepa de *Streptomyces cuspidosporus* SA4, tuvo efectos antimicrobianos y antihelmínticos frente diferentes tipos de patógenos incluyendo *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumonia*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhi*, *Bacillus subtilis*, *Proteus vulgaris*, *Shigella flexneri*, *Candida albicans* y *Fusarium* sp. (Sholkamy *et al.*, 2020). Esto pone en perspectiva, la necesidad de estudiar tanto los factores bióticos como abióticos de las condiciones de cultivo de aquellas actinobacterias con la finalidad de optimizarlas, para obtener compuestos novedosos que puedan tener aplicaciones biotecnológicas en diferentes campos.

La producción de MS también depende de manera importante de las condiciones ambientales, estas pueden ser diversas, las cuales pueden ser diversas si se toma en consideración el carácter ubicuo de las actinobacterias, incluso extremas o desfavorables para la supervivencia de otros organismos (Millán-Aguíñaga *et al.*, 2019; Selim *et al.*, 2021; Soldatou *et al.*, 2021). Por ejemplo, los ambientes hipersalinos, donde las

concentraciones de sales superiores al 10%, representan oportunidades únicas para el estudio de la evolución y la adaptación de la vida en condiciones ambientales que pueden promover la producción de diversos MS cuyas aplicaciones potenciales no se conocen hasta el momento. (Hui *et al.*, 2021; Shivilata & Satyanarayana, 2015). Actualmente, el aislamiento e identificación de actinobacterias raras procedentes de ambientes extremos ha cobrado más relevancia e interés en la comunidad científica, al representar una fuente potencial de adaptaciones evolutivas que se desarrollan permitiendo la sobrevivencia en condiciones ambientales únicas, lo que probablemente resulta en una ventaja competitiva frente a otros microorganismos (Qin *et al.*, 2019). Lo anterior sugiere que la adaptación a ambientes extremos es un factor que puede influir en la producción de nuevos MS en actinobacterias y los convierte en una fuente prometedora para el descubrimiento de nuevos fármacos y la diversificación de la investigación en el campo de la biotecnología (Hui *et al.*, 2021; Jagannathan *et al.*, 2021; Millán-Aguiñaga *et al.*, 2019; Shivilata & Satyanarayana, 2015; Soldatou *et al.*, 2021). Estudios recientes han destacado el descubrimiento de nuevos MS derivados de géneros de actinobacterias raras, como el diketopiperazine con actividad antibacteriana y antiproliferativa, aislado de *Nocardiopsis* sp. SCA30 en sedimentos marinos en la India, y siete angluciclinas (kumemicinones A-G) con propiedades citotóxicas, aisladas de *Actinomadura* sp. KD439 del fondo marino en India. Estos descubrimientos pueden proporcionar información valiosa sobre los mecanismos de adaptación de las actinobacterias a ambientes extremos y conducir al descubrimiento de nuevos compuestos bioactivos, favoreciendo la disminución de la tasa de redescubrimiento de MS que ocurre actualmente (Siddharth *et al.*, 2021; Zhang *et al.*, 2019; Zhang *et al.*, 2021).

1.6. Genes de estrés y adaptación al ambiente marino

Las actinobacterias se han adaptado a diferentes ambientes mediante mecanismos de respuesta y adaptación al estrés. Definiendo que es el estrés ambiental en bacterias, se refiere a las condiciones adversas que ponen a prueba su capacidad de supervivencia y adaptación, afectando tanto sus respuestas fisiológicas como genéticas. Estas tensiones pueden ser de naturaleza química, como la exposición a contaminantes, o física como los cambios de temperatura y salinidad. Los estresantes químicos, como los antibióticos y los metales pesados, pueden provocar mutaciones que llevan a la resistencia de los antibióticos, especialmente en condiciones subletales (Wang *et al.*, 2022). Los estresores físicos, como el calor, la presión osmótica y las fluctuaciones del pH, activan la respuesta general al estrés (GSR), desencadenando numerosos genes protectores (Bonilla, 2020).

Estos genes de respuesta al estrés son importantes para comprender cómo se han adaptado a distintos entornos y cómo producen MS. En términos de mecanismos de adaptación, el estrés ambiental puede llevar a la pérdida de genes no esenciales, lo que potencia la supervivencia de las bacterias al retener genes multifuncionales cruciales para la adaptación (Simonsen, 2021). Inclusive las condiciones de estrés pueden aumentar las mutaciones de resistencia, lo que plantea riesgos tanto para los ecosistemas como para la salud humana (Wang *et al.*, 2022).

Las actinobacterias, en particular, presentan una diversidad alta de genes y redes reguladoras complejas que no solo controlan la producción de metabolitos secundarios (van der Meij *et al.*, 2017), sino que también se encuentran involucrados en la síntesis de osmoprotectores. Por ejemplo, la síntesis de trehalosa que esta presente en los glucolípidos de la pared celular y que es considerada como molécula de respuesta al estrés universal que actúa como regulador del equilibrio osmótico interno principalmente en ambientes marinos (Ameur *et al.*, 2011; Avonce *et al.*, 2006; Reina-Bueno *et al.*, 2012). También, se han identificado sistemas de reparación de ADN y la expresión de proteínas antioxidantes, lo que sugiere estrategias adaptativas para contrarrestar el estrés oxidativo inducido por factores abióticos (von Rosen *et al.*, 2021). Tal es el caso de la regulación ejercida por el segundo mensajero guanosina pentafofato (p)ppGpp, que desempeña un papel importante en la regulación del ciclo de vida de las actinobacterias. La acumulación de (p)ppGpp induce una respuesta al estrés nutricional, regulando procesos, como la biosíntesis de aminoácidos, la síntesis de ARNr y ARNt, la resistencia a antibióticos, la virulencia de patógenos, su persistencia a largo plazo, la competencia y la formación de biopelículas. Además, se ha encontrado que la (p)ppGpp tiene efectos reguladores sobre la biosíntesis de antibióticos en las actinobacterias del género *Saccharopolyspora* (van der Meij *et al.*, 2017; Xu *et al.*, 2018). En este sentido, comprender la función y mecanismos de los genes del estrés y de adaptación marina en actinobacterias es crucial para identificar las estrategias de supervivencia y su potencial en la producción de metabolitos secundarios, así como para desarrollar estrategias eficaces de biotecnología y remediación ambiental (Bahera y Das, 2023). Por ejemplo, el estudio de genes de estrés y sus funciones asociadas provenientes de actinobacterias marinas, podría conducir al desarrollo de métodos novedosos para proteger los cultivos de factores de estrés a la salinidad, la sequía y las temperaturas extremas (Rangseekaew *et al.*, 2021; Rangseekaew *et al.*, 2022).

Estudios realizados por Fernández-López *et al.* (2022) y Zamora-Quintero *et al.* (2022) identificaron una amplia variedad de genes de PKS I que, en conjunto con los NRPS, constituyen las principales categorías de genes biosintéticos responsables de la producción de la mayoría de los antibióticos y antifúngicos conocidos (Cragg y Newman, 2013). En particular, Fernández-López *et al.* (2022) detectaron estos genes en actinobacterias de sedimentos marinos del Golfo de México, mientras que Zamora-Quintero *et al.* (2022) en sedimentos de la laguna hipersalina Ojo de Liebre en México, lo que sugirió la presencia potencial de nuevas especies de actinobacterias y la relevancia de los ambientes hipersalinos como una fuente prometedora para descubrir nuevas rutas biosintéticas de metabolitos secundarios.

Con base en lo anterior, es fundamental resaltar la importancia de explorar ambientes extremos y poco investigados para identificar especies nuevas de actinobacterias y evaluar su potencial biotecnológico. El análisis de sus genomas y metabolismo secundario, contribuirá a comprender de mejor forma el papel que desempeñan este grupo de bacterias en los ecosistemas y profundizar en el conocimiento sobre sus adaptaciones únicas. Además, permitirá entender los mecanismos moleculares y fisiológicos que utilizan para sobrevivir en condiciones desafiantes y proporcionar información valiosa sobre su biología y su potencial en diversas aplicaciones. En este contexto, el presente trabajo de tesis tiene como objetivo identificar las rutas metabólicas asociadas a la producción de metabolitos secundarios e identificar los genes relacionados con el estrés y la adaptación al ambiente marino en 12 genomas de actinobacterias marinas previamente aisladas de sedimentos de la Laguna Ojo de Liebre y para las que se ha evidenciado actividad citotóxica. Para ello se hará uso de herramientas bioinformáticas de vanguardia, entre las que se incluyen el análisis filogenómico y la minería genómica.

Referencias

1. Adamek, M., Alanjary, M., Sales-Ortells, H., Goodfellow, M., Bull, A. T., Winkler, A., Wibberg, D., Kalinowski, J., & Ziemert, N. (2018). Comparative genomics reveals phylogenetic distribution patterns of secondary metabolites in *Amycolatopsis* species. *BMC Genomics*, 19(1), 426. <https://doi.org/10.1186/s12864-018-4809-4>
2. Alanjary, M., Steinke, K., & Ziemert, N. (2019). AutoMLST: An automated web server for generating multi-locus species trees highlighting natural product potential. *Nucleic Acids Research*, 47(W1), W276-W282. <https://doi.org/10.1093/nar/gkz282>
3. Al-shaibani, M. M., Radin Mohamed, R. M. S., Sidik, N. M., Enshasy, H. A. E., Al-Gheethi, A., Noman, E., Al-Mekhlafi, N. A., & Zin, N. M. (2021). Biodiversity of Secondary Metabolites Compounds Isolated from Phylum Actinobacteria and Its Therapeutic Applications. *Molecules*, 26(15), 4504. <https://doi.org/10.3390/molecules26154504>
4. Ameer, H., Ghoul, M., & Selvin, J. (2011). The osmoprotective effect of some organic solutes on *Streptomyces* sp. Mado2 and *nocardiopsis* sp. Mado3 growth. *Brazilian Journal of Microbiology*, 42(2), 543-553. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822011000200019>
5. Amin, D. H., Abdallah, N. A., Abolmaaty, A., Tolba, S., & Wellington, E. M. H. (2020). Microbiological and molecular insights on rare Actinobacteria harboring bioactive prospective. *Bulletin of the National Research Centre*, 44(1), 5. <https://doi.org/10.1186/s42269-019-0266-8>
6. Arulprakasam, K. R., & Dharumadurai, D. (2021). Genome mining of biosynthetic gene clusters intended for secondary metabolites conservation in actinobacteria. *Microbial Pathogenesis*, 161, 105252. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2021.105252>
7. Aryal, S., Neupane, L., Adhikari, R., Regmi, B., Koirala, N., & Joshi, D. R. (2021). Novel *Streptomyces* Sp. Reported in 2018: A Meta-Analysis. *Anti-Infective Agents*, 19(5), 3-14. <https://doi.org/10.2174/2211352518666200423083354>
8. Auch, A. F. (s. f.). Digital DNA-DNA hybridization.
9. Avonce, N., Mendoza-Vargas, A., Morett, E., & Iturriaga, G. (2006). Insights on the evolution of trehalose biosynthesis. *BMC Evolutionary Biology*, 6(1), 109. <https://doi.org/10.1186/1471-2148-6-109>
10. Awan, A. R., Shaw, W. M., & Ellis, T. (2016). Biosynthesis of therapeutic natural products using synthetic biology. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 105, 96-106. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2016.04.010>

11. Baral, B., Akhgari, A., & Metsä-Ketelä, M. (2018). Activation of microbial secondary metabolic pathways: Avenues and challenges. *Synthetic and Systems Biotechnology*, 3(3), 163-178. <https://doi.org/10.1016/j.synbio.2018.09.001>
12. Barka, E. A., Vatsa, P., Sanchez, L., Gaveau-Vaillant, N., Jacquard, C., Klenk, H.-P., Clément, C., Ouhdouch, Y., & Van Wezel, G. P. (2016). Taxonomy, Physiology, and Natural Products of Actinobacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 80(1), 1-43. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00019-15>
13. Behera, S., & Das, S. (2023a). Potential and prospects of Actinobacteria in the bioremediation of environmental pollutants: Cellular mechanisms and genetic regulations. *Microbiological Research*, 273, 127399. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2023.127399>
14. Behera, S., & Das, S. (2023b). Potential and prospects of Actinobacteria in the bioremediation of environmental pollutants: Cellular mechanisms and genetic regulations. *Microbiological Research*, 273, 127399. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2023.127399>
15. Blin, K., Shaw, S., Kloosterman, A. M., Charlop-Powers, Z., van Wezel, G. P., Medema, M. H., & Weber, T. (2021). antiSMASH 6.0: Improving cluster detection and comparison capabilities. *Nucleic Acids Research*, 49(W1), W29-W35. <https://doi.org/10.1093/nar/gkab335>
16. Bonilla, C. Y. (2020). Generally Stressed Out Bacteria: Environmental Stress Response Mechanisms in Gram-Positive Bacteria. *Integrative and Comparative Biology*, 60(1), 126-133. <https://doi.org/10.1093/icb/icaa002>
17. Bouznada, K., Belaouni, H. A., & Meklat, A. (2023). Genome-based reclassification of *Kitasatospora niigatensis* as a later heterotypic synonym of *Kitasatospora cineracea* Tajima et al. (2001). *Antonie van Leeuwenhoek*, 116(12), 1327-1335. <https://doi.org/10.1007/s10482-023-01884-3>
18. Bream, A. S., Ghazal, S. A., El-Aziz, Z. K. A., & Ibrahim, S. Y. (2001). Insecticidal activity of selected actinomycetes strains against the Egyptian cotton leaf worm *Spodoptera littoralis* (Lepidoptera: Noctuidae). *Mededelingen Faculteit Landbouwkundige en Toegepaste Biologische Wetenschappen Universiteit Gent*, 66(2a), 503-544.
19. Burkovski, A. (2023). Proteomics of Toxigenic *Corynebacteria*. *Proteomes*, 12(1), 2. <https://doi.org/10.3390/proteomes12010002>
20. Chun, J., Oren, A., Ventosa, A., Christensen, H., Arahal, D. R., Da Costa, M. S., Rooney, A. P., Yi, H., Xu, X.-W., De Meyer, S., & Trujillo, M. E. (2018). Proposed

- minimal standards for the use of genome data for the taxonomy of prokaryotes. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 68(1), 461-466. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.002516>
21. Cimermancic, P., Medema, M. H., Claesen, J., Kurita, K., Wieland Brown, L. C., Mavrommatis, K., Pati, A., Godfrey, P. A., Koehrsen, M., Clardy, J., Birren, B. W., Takano, E., Sali, A., Linington, R. G., & Fischbach, M. A. (2014). Insights into Secondary Metabolism from a Global Analysis of Prokaryotic Biosynthetic Gene Clusters. *Cell*, 158(2), 412-421. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.06.034>
 22. Claessen, D., Rozen, D. E., Kuipers, O. P., Søgaard-Andersen, L., & Van Wezel, G. P. (2014). Bacterial solutions to multicellularity: A tale of biofilms, filaments and fruiting bodies. *Nature Reviews Microbiology*, 12(2), 115-124. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3178>
 23. Cragg, G. M., & Newman, D. J. (2013). Natural products: A continuing source of novel drug leads. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 1830(6), 3670-3695. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2013.02.008>
 24. Dat, T. T. H., Steinert, G., Cuc, N. T. K., Cuong, P. V., Smidt, H., & Sipkema, D. (2022). Diversity of Bacterial Secondary Metabolite Biosynthetic Gene Clusters in Three Vietnamese Sponges. *Marine Drugs*, 21(1), 29. <https://doi.org/10.3390/md21010029>
 25. De Rop, A.-S., Rombaut, J., Willems, T., De Graeve, M., Vanhaecke, L., Hulpiau, P., De Maeseneire, S. L., De Mol, M. L., & Soetaert, W. K. (2021). Novel Alkaloids from Marine Actinobacteria: Discovery and Characterization. *Marine Drugs*, 20(1), 6. <https://doi.org/10.3390/md20010006>
 26. Ding, T., Yang, L.-J., Zhang, W.-D., & Shen, Y.-H. (2019). The secondary metabolites of rare actinomycetes: Chemistry and bioactivity. *RSC Advances*, 9(38), 21964-21988. <https://doi.org/10.1039/C9RA03579F>
 27. Doroghazi, J. R., & Metcalf, W. W. (2013). Comparative genomics of actinomycetes with a focus on natural product biosynthetic genes. *BMC Genomics*, 14(1), 611. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-14-611>
 28. Faddetta, T., Polito, G., Abbate, L., Alibrandi, P., Zerbo, M., Caldiero, C., Reina, C., Puccio, G., Vaccaro, E., Abenavoli, M. R., Cavalieri, V., Mercati, F., Palumbo Piccionello, A., & Gallo, G. (2023). Bioactive Metabolite Survey of Actinobacteria Showing Plant Growth Promoting Traits to Develop Novel Biofertilizers. *Metabolites*, 13(3), 374. <https://doi.org/10.3390/metabo13030374>

29. Fernández-López, M., Sánchez-Reyes, A., Barcelos, C., Sidón-Ceseña, K., Leite, R. B., & Lago-Lestón, A. (2022). Deep-Sea Sediments from the Southern Gulf of Mexico Harbor a Wide Diversity of PKS I Genes. *Antibiotics*, 11(7), 887. <https://doi.org/10.3390/antibiotics11070887>
30. França, P. D., Costa, J., Fill, T., Lancelotti, M., Ruiz, A., & Fantinatti-Garboggini, F. (2020). Genome Mining Reveals Secondary Metabolites of Antarctic Bacterium *Streptomyces Albidoflavus* ANT_B131 Related to Antimicrobial and Antiproliferative Activities. In Review. <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-123886/v1>
31. Goris, J., Konstantinidis, K. T., Klappenbach, J. A., Coenye, T., Vandamme, P., & Tiedje, J. M. (2007). DNA–DNA hybridization values and their relationship to whole-genome sequence similarities. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 57(1), 81-91. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.64483-0>
32. Gupta, R. S., & Khadka, B. (2016). Evidence for the presence of key chlorophyll-biosynthesis-related proteins in the genus *Rubrobacter* (Phylum Actinobacteria) and its implications for the evolution and origin of photosynthesis. *Photosynthesis Research*, 127(2), 201-218. <https://doi.org/10.1007/s11120-015-0177-y>
33. Gurunathan, R., Rathinam, A. J., Hwang, J.-S., & Dahms, H.-U. (2021). Shallow Hydrothermal Vent Bacteria and Their Secondary Metabolites with a Particular Focus on *Bacillus*. *Marine Drugs*, 19(12), 681. <https://doi.org/10.3390/md19120681>
34. Hoskisson, P. A., & Fernández-Martínez, L. T. (2018). Regulation of specialised metabolites in Actinobacteria – expanding the paradigms. *Environmental Microbiology Reports*, 10(3), 231-238. <https://doi.org/10.1111/1758-2229.12629>
35. Hossain, S., Islam, T., Rahman, H., & Zubaer, A. A. (s. f.). Genome Mining of *Salinispora* Uncovers a Repertoire of Secondary Metabolites and Carbohydrate-Active Enzymes.
36. Hover, B. M., Kim, S.-H., Katz, M., Charlop-Powers, Z., Owen, J. G., Ternei, M. A., Maniko, J., Estrela, A. B., Molina, H., Park, S., Perlin, D. S., & Brady, S. F. (2018). Culture-independent discovery of the malacidins as calcium-dependent antibiotics with activity against multidrug-resistant Gram-positive pathogens. *Nature Microbiology*, 3(4), 415-422. <https://doi.org/10.1038/s41564-018-0110-1>
37. Hu, D., Sun, C., Jin, T., Fan, G., Mok, K. M., Li, K., & Lee, S. M.-Y. (2020). Exploring the Potential of Antibiotic Production From Rare Actinobacteria by Whole-Genome Sequencing and Guided MS/MS Analysis. *Frontiers in Microbiology*, 11, 1540. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01540>

38. Hui, M. L.-Y., Tan, L. T.-H., Letchumanan, V., He, Y.-W., Fang, C.-M., Chan, K.-G., Law, J. W.-F., & Lee, L.-H. (2021). The Extremophilic Actinobacteria: From Microbes to Medicine. *Antibiotics*, 10(6), 682. <https://doi.org/10.3390/antibiotics10060682>
39. Hussein, E. I., Jacob, J. H., Shakhathreh, M. A. K., Al-Razaq, M. A. A., Juhmani, A.-S. F., & Cornelison, C. T. (2018). Detection of antibiotic-producing Actinobacteria in the sediment and water of Ma'in thermal springs (Jordan). *Germs*, 8(4), 191-198. <https://doi.org/10.18683/germs.2018.1146>
40. Jagannathan, S. V., Manemann, E. M., Rowe, S. E., Callender, M. C., & Soto, W. (2021). Marine Actinomycetes, New Sources of Biotechnological Products. *Marine Drugs*, 19(7), 365. <https://doi.org/10.3390/md19070365>
41. Jakubiec-Krzesniak, K., Rajnisz-Mateusiak, A., Guspiel, A., Ziemska, J., & Solecka, J. (2018). Secondary Metabolites of Actinomycetes and their Antibacterial, Antifungal and Antiviral Properties. *Polish Journal of Microbiology*, 67(3), 259-272. <https://doi.org/10.21307/pjm-2018-048>
42. Kalkreuter, E., Pan, G., Cepeda, A. J., & Shen, B. (2020). Targeting Bacterial Genomes for Natural Product Discovery. *Trends in Pharmacological Sciences*, 41(1), 13-26. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2019.11.002>
43. Kemung, H. M., Tan, L. T.-H., Khan, T. M., Chan, K.-G., Pusparajah, P., Goh, B.-H., & Lee, L.-H. (2018). Streptomyces as a Prominent Resource of Future Anti-MRSA Drugs. *Frontiers in Microbiology*, 9, 2221. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02221>
44. Kim, M., Lee, K.-E., Cha, I.-T., & Park, S.-J. (2022). Photobacterium halophilum sp. Nov. And a Salt-Loving Bacterium Isolated from Marine Sediment. *Diversity*, 14(3), 188. <https://doi.org/10.3390/d14030188>
45. Komaki, H., & Tamura, T. (2021). Reclassification of four subspecies in the genus Streptomyces to Streptomyces rubradiris sp. Nov., Streptomyces asoensis sp. Nov., Streptomyces fructofermentans sp. Nov. And Streptomyces ossamyceticus sp. Nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 71(11). <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.005078>
46. Katsonis, P., Wilhelm, K., Williams, A., & Lichtarge, O. (2022). Genome interpretation using in silico predictors of variant impact. *Human genetics*, 141(10), 1549-1577. <https://doi.org/10.1007/s00439-022-02457-6>
47. Lalucat, J., Mulet, M., Gomila, M., & García-Valdés, E. (2020). Genomics in Bacterial Taxonomy: Impact on the Genus Pseudomonas. *Genes*, 11(2), 139. <https://doi.org/10.3390/genes11020139>

48. Land, M., Hauser, L., Jun, S.-R., Nookaew, I., Leuze, M. R., Ahn, T.-H., Karpinets, T., Lund, O., Kora, G., Wassenaar, T., Poudel, S., & Ussery, D. W. (2015). Insights from 20 years of bacterial genome sequencing. *Functional & Integrative Genomics*, 15(2), 141-161. <https://doi.org/10.1007/s10142-015-0433-4>
49. Lazzarini, A., Cavaletti, L., Toppo, G., & Marinelli, F. (s. f.). Rare genera of actinomycetes as potential producers of new antibiotics.
50. Lewin, G. R., Carlos, C., Chevrette, M. G., Horn, H. A., McDonald, B. R., Stankey, R. J., Fox, B. G., & Currie, C. R. (2016). Evolution and Ecology of Actinobacteria and Their Bioenergy Applications. *Annual Review of Microbiology*, 70(1), 235-254. <https://doi.org/10.1146/annurev-micro-102215-095748>
51. López-Pérez, M., Haro-Moreno, J. M., Iranzo, J., & Rodríguez-Valera, F. (2020). Genomes of the “ Candidatus Actinomarinales” Order: Highly Streamlined Marine Epipelagic Actinobacteria. *mSystems*, 5(6), e01041-20. <https://doi.org/10.1128/mSystems.01041-20>
52. Millán-Aguíñaga, N., Chavarria, K. L., Ugalde, J. A., Letzel, A.-C., Rouse, G. W., & Jensen, P. R. (2017). Phylogenomic Insight into Salinispora (Bacteria, Actinobacteria) Species Designations. *Scientific Reports*, 7(1), 3564. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-02845-3>
53. Millán-Aguíñaga, N., Soldatou, S., Brozio, S., Munnoch, J. T., Howe, J., Hoskisson, P. A., & Duncan, K. R. (2019). Awakening ancient polar Actinobacteria: Diversity, evolution and specialized metabolite potential. *Microbiology*, 165(11), 1169-1180. <https://doi.org/10.1099/mic.0.000845>
54. Mohammadipanah, F., & Wink, J. (2016). Actinobacteria from Arid and Desert Habitats: Diversity and Biological Activity. *Frontiers in Microbiology*, 6. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.01541>
55. Muller, P. A., & Epstein, S. S. (2012). In Silico Genome-Genome Hybridization Values Accurately and Precisely Predict Empirical DNA-DNA Hybridization Values for Classifying Prokaryotes (Versión 1). *arXiv*. <https://doi.org/10.48550/ARXIV.1202.5211>
56. Naughton, L. M., Romano, S., O’Gara, F., & Dobson, A. D. W. (2017). Identification of Secondary Metabolite Gene Clusters in the Pseudovibrio Genus Reveals Encouraging Biosynthetic Potential toward the Production of Novel Bioactive Compounds. *Frontiers in Microbiology*, 8, 1494. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01494>

57. Navarro-Muñoz, J. C., Selem-Mojica, N., Mulhoney, M. W., Kautsar, S. A., Tryon, J. H., Parkinson, E. I., De Los Santos, E. L. C., Yeong, M., Cruz-Morales, P., Abubucker, S., Roeters, A., Lokhorst, W., Fernandez-Guerra, A., Cappelini, L. T. D., Goering, A. W., Thomson, R. J., Metcalf, W. W., Kelleher, N. L., Barona-Gomez, F., & Medema, M. H. (2020). A computational framework to explore large-scale biosynthetic diversity. *Nature Chemical Biology*, 16(1), 60-68. <https://doi.org/10.1038/s41589-019-0400-9>
58. Ngamcharungchit, C., Chaimusik, N., Panbangred, W., Euanorasetr, J., & Intra, B. (2023). Bioactive Metabolites from Terrestrial and Marine Actinomycetes. *Molecules*, 28(15), 5915. <https://doi.org/10.3390/molecules28155915>
59. Nouioui, I., Carro, L., García-López, M., Meier-Kolthoff, J. P., Woyke, T., Kyrpides, N. C., Pukall, R., Klenk, H.-P., Goodfellow, M., & Göker, M. (2018). Genome-Based Taxonomic Classification of the Phylum Actinobacteria. *Frontiers in Microbiology*, 9, 2007. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02007>
60. Olanrewaju, O. S., & Babalola, O. O. (2019). Streptomyces: Implications and interactions in plant growth promotion. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 103(3), 1179-1188. <https://doi.org/10.1007/s00253-018-09577-y>
61. Oren, A., & Garrity, G. M. (2021). Valid publication of the names of forty-two phyla of prokaryotes. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 71(10). <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.005056>
62. Panda, A., Islam, S. T., & Sharma, G. (2022). Harmonizing Prokaryotic Nomenclature: Fixing the Fuss over Phylum Name Flipping. *mBio*, 13(3), e00970-22. <https://doi.org/10.1128/mbio.00970-22>
63. Parks, D. H., Chuvochina, M., Rinke, C., Mussig, A. J., Chaumeil, P.-A., & Hugenholtz, P. (2022). GTDB: An ongoing census of bacterial and archaeal diversity through a phylogenetically consistent, rank normalized and complete genome-based taxonomy. *Nucleic Acids Research*, 50(D1), D785-D794. <https://doi.org/10.1093/nar/gkab776>
64. Parra, J., Beaton, A., Seipke, R. F., Wilkinson, B., Hutchings, M. I., & Duncan, K. R. (2023). Antibiotics from rare actinomycetes, beyond the genus *Streptomyces*. *Current Opinion in Microbiology*, 76, 102385. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2023.102385>
65. Pinto-Almeida, A., Bauermeister, A., Luppino, L., Grilo, I. R., Oliveira, J., Sousa, J. R., Petras, D., Rodrigues, C. F., Prieto-Davó, A., Tasdemir, D., Sobral, R. G., & Gaudêncio, S. P. (2021). The Diversity, Metabolomics Profiling, and the

- Pharmacological Potential of Actinomycetes Isolated from the Estremadura Spur Pockmarks (Portugal). *Marine Drugs*, 20(1), 21. <https://doi.org/10.3390/md20010021>
66. Qin, S., Li, W.-J., Klenk, H.-P., Hozzein, W. N., & Ahmed, I. (2019). Editorial: Actinobacteria in Special and Extreme Habitats: Diversity, Function Roles and Environmental Adaptations, Second Edition. *Frontiers in Microbiology*, 10, 944. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00944>
 67. Quinn, G. A., Banat, A. M., Abdelhameed, A. M., & Banat, I. M. (2020). Streptomyces from traditional medicine: Sources of new innovations in antibiotic discovery. *Journal of Medical Microbiology*, 69(8), 1040-1048. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.001232>
 68. Raina, V., Nayak, T., Ray, L., Kumari, K., & Suar, M. (2019). A Polyphasic Taxonomic Approach for Designation and Description of Novel Microbial Species. En *Microbial Diversity in the Genomic Era* (pp. 137-152). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814849-5.00009-5>
 69. Ramírez-Durán, N., De La Haba, R. R., Vera-Gargallo, B., Sánchez-Porro, C., Alonso-Carmona, S., Sandoval-Trujillo, H., & Ventosa, A. (2021). Taxogenomic and Comparative Genomic Analysis of the Genus *Saccharomonospora* Focused on the Identification of Biosynthetic Clusters PKS and NRPS. *Frontiers in Microbiology*, 12, 603791. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.603791>
 70. Rangseekaew, P., Barros-Rodríguez, A., Pathom-aree, W., & Manzanera, M. (2022a). Plant Beneficial Deep-Sea Actinobacterium, *Dermacoccus abyssi* MT1.1T Promote Growth of Tomato (*Solanum lycopersicum*) under Salinity Stress. *Biology*, 11(2), 191. <https://doi.org/10.3390/biology11020191>
 71. Rangseekaew, P., Barros-Rodríguez, A., Pathom-aree, W., & Manzanera, M. (2022b). Plant Beneficial Deep-Sea Actinobacterium, *Dermacoccus abyssi* MT1.1T Promote Growth of Tomato (*Solanum lycopersicum*) under Salinity Stress. *Biology*, 11(2), 191. <https://doi.org/10.3390/biology11020191>
 72. Reina-Bueno, M., Argandoña, M., Salvador, M., Rodríguez-Moya, J., Iglesias-Guerra, F., Csonka, L. N., Nieto, J. J., & Vargas, C. (2012). Role of Trehalose in Salinity and Temperature Tolerance in the Model Halophilic Bacterium *Chromohalobacter salexigens*. *PLoS ONE*, 7(3), e33587. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0033587>
 73. Riesco, R., & Trujillo, M. E. (2024). Update on the proposed minimal standards for the use of genome data for the taxonomy of prokaryotes. *International Journal of*

Systematic and Evolutionary Microbiology, 74(3).
<https://doi.org/10.1099/ijsem.0.006300>

74. Román-Ponce, B., Millán-Aguñaga, N., Guillen-Matus, D., Chase, A. B., Ginigini, J. G. M., Soapi, K., Feussner, K. D., Jensen, P. R., & Trujillo, M. E. (2020). Six novel species of the obligate marine actinobacterium *Salinispora*, *Salinispora cortesiana* sp. Nov., *Salinispora fenicalii* sp. Nov., *Salinispora goodfellowii* sp. Nov., *Salinispora mooreana* sp. Nov., *Salinispora oceanensis* sp. Nov. And *Salinispora vitiensis* sp. Nov., and emended description of the genus *Salinispora*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 70(8), 4668-4682. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.004330>
75. Said Hassane, C., Fouillaud, M., Le Goff, G., Sklirou, A. D., Boyer, J. B., Trougakos, I. P., Jerabek, M., Bignon, J., De Voogd, N. J., Ouazzani, J., Gauvin-Bialecki, A., & Dufossé, L. (2020). Microorganisms Associated with the Marine Sponge *Scopalina hapalia*: A Reservoir of Bioactive Molecules to Slow Down the Aging Process. *Microorganisms*, 8(9), 1262. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8091262>
76. Salam, N., Jiao, J.-Y., Zhang, X.-T., & Li, W.-J. (2020). Update on the classification of higher ranks in the phylum Actinobacteria. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 70(2), 1331-1355. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.003920>
77. Salwan, R., & Sharma, V. (2020). Molecular and biotechnological aspects of secondary metabolites in actinobacteria. *Microbiological Research*, 231, 126374. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2019.126374>
78. Satyanarayana, T., Johri, B. N., & Das, S. K. (Eds.). (2019). *Microbial Diversity in Ecosystem Sustainability and Biotechnological Applications: Volume 1. Microbial Diversity in Normal & Extreme Environments*. Springer Singapore. <https://doi.org/10.1007/978-981-13-8315-1>
79. Seipke, R. F., Barke, J., Heavens, D., Yu, D. W., & Hutchings, M. I. (2013). Analysis of the bacterial communities associated with two ant-plant symbioses. *MicrobiologyOpen*, 2(2), 276-283. <https://doi.org/10.1002/mbo3.73>
80. Selim, M. S. M., Abdelhamid, S. A., & Mohamed, S. S. (2021). Secondary metabolites and biodiversity of actinomycetes. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 19(1), 72. <https://doi.org/10.1186/s43141-021-00156-9>
81. Seshadri, R., Roux, S., Huber, K. J., Wu, D., Yu, S., Uduary, D., Call, L., Nayfach, S., Hahnke, R. L., Pukall, R., White, J. R., Varghese, N. J., Webb, C., Palaniappan,

- K., Reimer, L. C., Sardà, J., Bertsch, J., Mukherjee, S., Reddy, T. B. K., ... Ivanova, N. N. (2022). Expanding the genomic encyclopedia of Actinobacteria with 824 isolate reference genomes. *Cell Genomics*, 2(12), 100213. <https://doi.org/10.1016/j.xgen.2022.100213>
82. Shivelata, L., & Satyanarayana, T. (2015). Thermophilic and alkaliphilic Actinobacteria: Biology and potential applications. *Frontiers in Microbiology*, 6. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.01014>
83. Sholkamy, E. N., Muthukrishnan, P., Abdel-Raouf, N., Nandhini, X., Ibraheem, I. B. M., & Mostafa, A. A. (2020). Antimicrobial and antinematocidal metabolites from *Streptomyces cuspidosporus* strain SA4 against selected pathogenic bacteria, fungi and nematode. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 27(12), 3208-3220. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2020.08.043>
84. Siddharth, S., Parida, S., Muniraj, N., Hercules, S., Lim, D., Nagalingam, A., Wang, C., Gyorffy, B., Daniel, J. M., & Sharma, D. (2021). Concomitant activation of GLI1 and Notch1 contributes to racial disparity of human triple negative breast cancer progression. *eLife*, 10, e70729. <https://doi.org/10.7554/eLife.70729>
85. Simonsen, A. K. (2022). Environmental stress leads to genome streamlining in a widely distributed species of soil bacteria. *The ISME Journal*, 16(2), 423-434. <https://doi.org/10.1038/s41396-021-01082-x>
86. Siro, G., Pipite, A., Christi, K., Srinivasan, S., & Subramani, R. (2022). Marine Actinomycetes Associated with Stony Corals: A Potential Hotspot for Specialized Metabolites. *Microorganisms*, 10(7), 1349. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10071349>
87. Skinnider, M. A., Johnston, C. W., Gunabalasingam, M., Merwin, N. J., Kieliszek, A. M., MacLellan, R. J., Li, H., Ranieri, M. R. M., Webster, A. L. H., Cao, M. P. T., Pfeifle, A., Spencer, N., To, Q. H., Wallace, D. P., Dejong, C. A., & Magarvey, N. A. (2020). Comprehensive prediction of secondary metabolite structure and biological activity from microbial genome sequences. *Nature Communications*, 11(1), 6058. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-19986-1>
88. Soldatou, S., Eldjárn, G. H., Ramsay, A., Van Der Hooft, J. J. J., Hughes, A. H., Rogers, S., & Duncan, K. R. (2021). Comparative Metabologenomics Analysis of Polar Actinomycetes. *Marine Drugs*, 19(2), 103. <https://doi.org/10.3390/md19020103>

89. Stincone, P., & Brandelli, A. (2020). Marine bacteria as source of antimicrobial compounds. *Critical Reviews in Biotechnology*, 40(3), 306-319. <https://doi.org/10.1080/07388551.2019.1710457>
90. Subramani, R., & Aalbersberg, W. (2012). Marine actinomycetes: An ongoing source of novel bioactive metabolites. *Microbiological Research*, 167(10), 571-580. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2012.06.005>
91. Subramani, R., & Sipkema, D. (2019). Marine Rare Actinomycetes: A Promising Source of Structurally Diverse and Unique Novel Natural Products. *Marine Drugs*, 17(5), 249. <https://doi.org/10.3390/md17050249>
92. Stackebrandt, E., & Ebers, J. (2006). Taxonomic parameters revisited: tarnished gold standards. *Microbiology Today*, 33(4), 152–155.
93. Tajima, K., Takahashi, Y., Seino, A., Iwai, Y., & Omura, S. (2001). Description of two novel species of the genus *Kitasatospora* Omura et al. 1982, *Kitasatospora cineracea* sp. Nov. And *Kitasatospora niigatensis* sp. Nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 51(5), 1765-1771. <https://doi.org/10.1099/00207713-51-5-1765>
94. Tao, H., Zhang, Y., Deng, Z., & Liu, T. (2019). Strategies for Enhancing the Yield of the Potent Insecticide Spinosad in Actinomycetes. *Biotechnology Journal*, 14(1), 1700769. <https://doi.org/10.1002/biot.201700769>
95. Turroni, F., Van Sinderen, D., & Ventura, M. (2021). Bifidobacteria: Insights into the biology of a key microbial group of early life gut microbiota. *Microbiome Research Reports*. <https://doi.org/10.20517/mrr.2021.02>
96. Van Bergeijk, D. A., Terlouw, B. R., Medema, M. H., & Van Wezel, G. P. (2020). Ecology and genomics of Actinobacteria: New concepts for natural product discovery. *Nature Reviews Microbiology*, 18(10), 546-558. <https://doi.org/10.1038/s41579-020-0379-y>
97. Van Der Meij, A., Worsley, S. F., Hutchings, M. I., & Van Wezel, G. P. (2017). Chemical ecology of antibiotic production by actinomycetes. *FEMS Microbiology Reviews*, 41(3), 392-416. <https://doi.org/10.1093/femsre/fux005>
98. Ventura, M., Canchaya, C., Tauch, A., Chandra, G., Fitzgerald, G. F., Chater, K. F., & Van Sinderen, D. (2007). Genomics of Actinobacteria: Tracing the Evolutionary History of an Ancient Phylum. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 71(3), 495-548. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00005-07>
99. Von Rosen, T., Keller, L. M., & Weber-Ban, E. (2021). Survival in Hostile Conditions: Pupylation and the Proteasome in Actinobacterial Stress Response

- Pathways. *Frontiers in Molecular Biosciences*, 8, 685757.
<https://doi.org/10.3389/fmolb.2021.685757>
100. Wang, J.-T., Shi, T.-T., Ding, L., Xie, J., & Zhao, P.-J. (2023). Multifunctional Enzymes in Microbial Secondary Metabolic Processes. *Catalysts*, 13(3), 581.
<https://doi.org/10.3390/catal13030581>
101. Xu, D., Nepal, K. K., Chen, J., Harmody, D., Zhu, H., McCarthy, P. J., Wright, A. E., & Wang, G. (2018). Nocardiopeptidins A-C: New angucyclines with anti-MRSA activity isolated from a marine sponge-derived *Nocardiopeptidum* sp. HB-J378. *Synthetic and Systems Biotechnology*, 3(4), 246-251.
<https://doi.org/10.1016/j.synbio.2018.10.008>
102. Zamora-Quintero, A. Y., Torres-Beltrán, M., Guillén Matus, D. G., Oroz-Parra, I., & Millán-Aguinaga, 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).
<https://doi.org/10.1099/mic.0.001144>
103. Zhang, D., Lu, Y., Chen, H., Wu, C., Zhang, H., Chen, L., & Chen, X. (2020). Antifungal peptides produced by actinomycetes and their biological activities against plant diseases. *The Journal of Antibiotics*, 73(5), 265-282.
<https://doi.org/10.1038/s41429-020-0287-4>
104. Zhang, F., Braun, D. R., Chanana, S., Rajski, S. R., & Bugni, T. S. (2019). Phallusialides A–E, Pyrrole-Derived Alkaloids Discovered from a Marine-Derived *Micromonospora* sp. Bacterium Using MS-Based Metabolomics Approaches. *Journal of Natural Products*, 82(12), 3432-3439.
<https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.9b00808>

Capítulo 2. Análisis filogenómico de actinobacterias aisladas de sedimento de la Laguna Ojo de Liebre, México.

Capítulo 3. Minería genómica de actinobacterias aisladas de sedimento de la Laguna Ojo de Liebre, México.

A continuación, se presenta el artículo titulado “Exploración filogenómica y de metabolismo secundario de actinobacterias aisladas de sedimentos de la Laguna Ojo de Liebre, México”, aceptado en diciembre de 2024 y publicado en la revista *Mexican Journal of Biotechnology*. Dicho artículo se enfoca en la descripción de dos capítulos; el capítulo 2, el cual corresponde a los análisis filogenómicos y el capítulo 3 correspondiente la minería genómica de actinobacterias de la Laguna Ojo de Liebre. El objetivo general del segundo capítulo fue analizar las relaciones filogenómicas de 12 genomas de actinobacterias aisladas de sedimento de la Laguna Ojo de Liebre, México. Para ello se realizaron los pasos pertinentes para obtener borradores de genomas de alta calidad y de esta manera utilizarlos en los análisis filogenómicos correspondientes. Dichos análisis filogenómicos se hicieron integrando árboles filogenéticos del gen 16S rRNA, el análisis de secuencias multilocus (MLSA). También se utilizaron métricas utilizadas para la delimitación de las especies, como la hibridación digital ADN-ADN (DDH) y el índice de similitud de nucleótidos promedio (ANI). Estos métodos nos permitieron obtener una visión detallada de las relaciones filogenéticas entre las actinobacterias estudiadas y de esta manera proponer nuevas especies. El tercer capítulo se basó en la minería genómica exhaustiva utilizando programas especializados como antiSMASH y BiGSCAPE. Los objetivos generales del capítulo fueron identificar y caracterizar clusters de genes de biosíntesis de metabolitos secundarios (BGCs) en los genomas de las actinobacterias. La minería genómica no solo nos proporcionó información sobre la capacidad biosintética de estas bacterias, sino que también reveló la presencia de BGCs con potencial para la producción de compuestos bioactivos.

Phylogenomic and secondary metabolism exploration of actinobacteria isolated from sediments of Laguna Ojo de Liebre, Mexico

Exploración filogenómica y de metabolismo secundario de actinobacterias aisladas de sedimentos de la Laguna Ojo de Liebre, México

César O. Carreón-Gaxiola¹, Mónica Torres-Beltrán¹, Juan A. Ugalde², Natalie Millán-Aguiñaga^{1*}

¹Universidad Autónoma de Baja California, Facultad de Ciencias Marinas, Ensenada, Baja California, México.

²Centro de Bioinformática y Biología Integrativa, Facultad de Ciencias de la Vida, Universidad Andrés Bello, Santiago de Chile, Chile.

*Corresponding author

E-mail address: nmillan@uabc.edu.mx (N. Millán-Aguiñaga)

ABSTRACT

The Ojo de Liebre Lagoon Complex Biosphere Reserve, is an essential habitat for migratory species such as the gray whale and various birds. This unique hypersaline environment is underexplored concerning its microbial diversity, particularly regarding actinobacteria, which are among the most prolific sources of bioactive compounds found in marine ecosystems. 12 genomes of actinobacteria isolated from marine sediments of Laguna Ojo de Liebre (LOL) in B.C.S., Mexico. were analyzed. The genomes were classified into 3 genera; *Actinomadura*, *Nocardiopsis* and *Micromonospora*. Genomic mining revealed the presence of 314 Biosynthetic Gene Groups (BGCs) associated with secondary metabolism. The main BGCs categories found were terpenes, type I polyketides (T1PKS), non-ribosomal peptide synthetases (NRPS) and ribosomally synthesized post-translationally modified peptides (RiPPS). The analysis on patterns of Gene Cluster Families (GCFs) revealed only 4 GCFs (<1%). associated with production to known compounds, implying that most of the detected clusters could be responsible for the production of several novel compounds. Also, the phylogenomic analysis suggests the presence of five potential new actinobacteria species belonging to the genera *Micromonospora* and *Nocardiopsis*. Overall, the genomes of actinobacteria isolated from LOL sediments showed unknown secondary metabolites, highlighting their biotechnological potential in the production of uncharacterized compounds.

Keywords: phylogenomics, genome mining, secondary metabolites, biosynthetic gene clusters, gene cluster family.

RESUMEN

La Reserva de la Biósfera Complejo Lagunar Ojo de Liebre, es un hábitat esencial para especies migratorias como la ballena gris y diversas aves. Este único entorno hipersalino está subexplorado en cuanto a su diversidad microbiana, especialmente en lo que respecta a las actinobacterias, que son una de las fuentes más prolíficas de compuestos bioactivos encontrados en los ecosistemas marinos. En esta investigación se analizaron 12 genomas de actinobacterias aisladas de sedimento marino de la Laguna Ojo de Liebre (LOL) en B.C.S., México. Los genomas se clasificaron en 3 géneros; *Actinomadura*, *Nocardiopsis* y *Micromonospora*. La minería genómica reveló la presencia de 314 Grupos de Genes Biosintéticos (BGCs, por sus siglas en inglés) asociados al metabolismo secundario. Las principales categorías de BGCs encontradas fueron terpenos, policétidos tipo I (T1PKS), péptido sintetasa no ribosomales (NRPS) y péptidos modificados postraduccionalmente y sintetizados ribosomalmente (RiPPS). Además, se observaron los patrones de Familias de Grupos de Genes (GCFs por sus siglas en inglés), obteniendo categorías comunes entre los genomas y solamente 4 GCFs se asignaron a la producción de compuestos conocidos (<1%). Ningún GCF se asignó a rutas responsables de la producción de compuestos conocidos, lo que implica que las agrupaciones detectadas podrían ser responsables de la producción de nuevos compuestos. La información filogenómica generada sugiere la presencia de cinco cepas candidatas a nuevas especies de actinobacteria del género *Micromonospora* y *Nocardiopsis*. Los genomas de las actinobacterias aisladas de los sedimentos de LOL mostraron metabolitos secundarios desconocidos, lo que resalta su potencial biotecnológico en la producción de compuestos no caracterizados.

Palabras clave: filogenómica, minería genómica, metabolitos secundarios, grupo de genes biosintéticos, familia de grupos de genes.

1. INTRODUCCIÓN

El filo Actinomycetota es uno de los grupos más abundantes y diversos de bacterias Gram positivas en nuestro planeta (He *et al.*, 2023; Barka *et al.*, 2016). Está conformado generalmente por especies aerobias, y algunos géneros presentan la capacidad de formar esporas (Barka *et al.*, 2016; Li *et al.*, 2016; Silva *et al.* 2022). Los representantes de este filo se caracterizan por presentar genomas desde <0.5 y hasta 15.0 Mbp con alto contenido de G+C (Seshadri *et al.*, 2022). El género *Streptomyces* es el más común y estudiado y es por ello que se han clasificado a las actinobacterias en dos subgrupos, aquellas que pertenecen al género *Streptomyces* y aquellas que no pertenecen a este género y que se denominan “actinobacterias raras” (Hui *et al.*, 2021). Estas últimas, a pesar de ser poco estudiadas y su baja frecuencia de aislamiento con respecto a *Streptomyces*, han cobrado importancia en el estudio de la producción de compuestos bioactivos como: antibióticos (ej. actinomicina, kanamicina, estreptomicina, cloranfenicol), antitumorales (doxorubicina y daunorubicina), antifúngicos (kitamicina), bioherbicidas (spinosad), antiparasitarios (avermectina) y agentes inmunosupresivos (rapamicina) (Barka *et al.*, 2016; Weber *et al.*, 2015). En particular, aquellas bacterias aisladas de ambientes extremos, las cuales se han asociado con la producción de una variedad de actividades biológicas (Hu *et al.*, 2020). La secuenciación de ácidos nucleicos puede fortalecer la investigación de las capacidades metabólicas de las actinobacterias de ambientes extremos, no sólo con el propósito de caracterizarlas para su identificación

taxonómica, sino para conocer a los genes responsables de la producción de metabolitos secundarios (MS) (Garavito *et al.*, 2017; van Bergeijk *et al.*, 2020).

Actualmente, luego de casi 3 décadas de haber completado la secuenciación del primer genoma bacteriano, se han reportado más de 330 millones de borradores y genomas completos de bacterias y arqueas (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/refseq/statistics/>). En particular, las secuencias de 58 mil genomas del grupo de las actinobacterias se encuentran disponibles en bases de datos públicas, de entre las que destacan los géneros *Streptomyces*, *Mycobacterium*, *Micromonospora* y *Actinoplanes*. Sin embargo, el filo Actinomycetota se encuentra representado por menos del 10% del total de genomas publicados en bases de datos (ej. NCBI y GOLD) a la fecha (Kalkreuter *et al.*, 2020; Mukherjee *et al.*, 2023; Seshadri *et al.*, 2022; Zhang *et al.*, 2020), lo que representa una valiosa oportunidad para enfocar esfuerzos en la secuenciación y análisis de genomas de actinobacterias que contribuyan al conocimiento del metabolismo secundario.

Una de las principales ventajas que tiene la secuenciación completa de genomas es contar con todos los genes para poder realizar análisis filogenómicos más confiables para la clasificación taxonómica. Esto contrasta con el uso de solo un par de genes ribosomales o de copia única, como por ejemplo, 16s/23s ARNr, *gyrB*, *dnaA*; que tradicionalmente se han utilizado para la identificación y clasificación a nivel de género (Nouiou *et al.*, 2018). La tasa de evolución individual no ha permitido en ocasiones diferenciar filogenéticamente entre especies cercanas (Lalucat *et al.*, 2020). El análisis Multilocus de Secuencia (MLSA) involucra el uso simultáneo de múltiples genes constitutivos y ha sido una alternativa más confiable para la caracterización taxonómica a nivel de especie (Adamek *et al.*, 2018; Alanjary *et al.*, 2019; Lalucat *et al.*, 2020). Es por ello que el empleo del genoma completo en la construcción de filogenias permite una visión más completa y precisa de la evolución de los organismos (Chun *et al.*, 2018; Kim *et al.*, 2022). En este contexto es posible realizar análisis taxonómicos robustos para determinar las similitudes en genomas completos como: la identidad de nucleótidos promedio (ANI) y la hibridación digital ADN-ADN (dDDH) (Muller and Epstein, 2012; Raina *et al.*, 2019). Se ha hecho una transición natural hacia el uso de este tipo de herramientas bioinformáticas, debido a que son capaces de hacer predicciones más rápidas y precisas en comparación con técnicas como la hibridación que es un método laborioso y que requiere de equipos especializados y de mayor costo (ej. >95% de ANI corresponde al 70% de DDH) (Goris *et al.*, 2007; Muller y Epstein, 2012). Es por ello que diversos grupos de investigación han utilizado análisis filogenómicos para la delimitación de nuevas especies bacterianas (Chun *et al.*, 2018; Millán-Aguíñaga *et al.*, 2017; Parks *et al.*, 2021).

Otra ventaja de disponer del genoma completo de un microorganismo es la capacidad de explorar la diversidad de genes funcionales. Por ejemplo, la minería genómica permite la identificación de grupos de genes biosintéticos (Biosynthetic Gene Clusters, BGCs), lo que resulta fundamental para predecir la presencia de rutas para la síntesis de metabolitos secundarios (MS) con potencial biotecnológico (van Bergeijk *et al.*, 2020). Los BGCs se encuentran organizados en grupos de genes en los genomas de los microorganismos, los cuales codifican para la maquinaria enzimática necesaria para la síntesis de MS. Comúnmente los BGCs se clasifican en función de la clase de compuestos que producen como: policétidos sintetas (PKS), sintetas peptídicas no ribosómicas (NRPS), péptidos sintetizados ribosomalmente y modificados postraduccionalmente (RiPPs), terpenos, sacáridos, etc. (Arulprakasam y Dharumadurai, 2021; Naughton *et al.*, 2017; Medema *et al.*, 2014; Wang *et al.*, 2023).

Dos de las herramientas bioinformáticas más empleadas en la minería genómica de microorganismos son antiSMASH y BiG-SCAPE, las cuales se han empleado en la identificación de una gran cantidad de nuevos compuestos con actividad antibacteriana, antitumoral, antiinflamatoria, fungicida y antiviral (Manikkam *et al.*, 2019; Zhang *et al.*, 2020). Así mismo, existe la necesidad de caracterizar los BGCs con el fin de evaluar su diversidad y los mecanismos que llevan a esta diversificación (Dat *et al.*, 2022; Siro *et al.*, 2022). Una de las estrategias consiste en agrupar rutas biosintéticas que produzcan compuestos similares en familias de grupos de genes (Gene Cluster Families , GCFs) , usando para ello redes de similitud que permitan conducir a la priorización de nuevos BGCs (Adamek *et al.*, 2018; Navarro-Muñoz *et al.*, 2020). De esta manera se busca evitar el redescubrimiento de MS de especies de actinobacterias ya conocidas.

La producción de MS en actinobacterias se ha visto relacionada a varios factores, pero principalmente con el ambiente que colonizan. Los ambientes pueden presentar diferentes condiciones, incluyendo aquellas que se consideran extremas o poco favorables para la sobrevivencia (altas o bajas temperaturas, salinidad, alcalinidad, etc.), como ocurre en lagunas hipersalinas, desiertos, regiones polares y las profundidades del océano (Hui *et al.*, 2021; Millán-Aguíñaga *et al.*, 2019; Shivilata y Satyanarayana, 2015; Soldatou *et al.*, 2021). El interés por el descubrimiento de metabolitos secundarios novedosos ha llevado a un enfoque creciente en el aislamiento e identificación de actinobacterias raras de ambientes extremos (Hui *et al.*, 2021; Jagannathan *et al.*, 2021; Millán-Aguíñaga *et al.*, 2019; Shivilata y Satyanarayana, 2015; Soldatou *et al.*, 2021), las cuales han desarrollado adaptaciones únicas que han resultado en su capacidad de producir nuevos metabolitos secundarios (Qin *et al.*, 2019), como la diketopiperazina con actividad antibacteriana aislada de *Nocardiopsis* sp. SCA30 y las angluciclinas kumemicinones A-G de *Actinomadura* sp. KD439, ambas provenientes de sedimentos marinos en India (Siddharth *et al.*, 2021; Zhang *et al.*, 2019; Zhang *et al.*, 2021).

En México existen estudios que relacionan el aislamiento de actinobacterias raras de ambientes extremos e inexplorados con el perfil del metabolismo secundario y su potencial biotecnológico (Cardoso-Martínez *et al.*, 2015; Torres-Beltrán *et al.*, 2012; Zamora-Quintero *et al.*, 2022). Trabajos como el de Fernández-López *et al.* en 2022 realizados en las profundidades del Golfo de México, lograron identificar más de 2000 secuencias de genes candidatos PKS I en metagenomas que incluyen diferentes filos (entre ellos Actinobacteria); sugiriendo que los sedimentos marinos de esta región son una fuente rica y diversa de este tipo de genes que podrían ser explorados en la búsqueda de nuevas rutas que codifican a nuevos MS. Zamora-Quintero *et al.* (2022) a partir de muestras de sedimento de la laguna hipersalina Ojo de Liebre en México identificó distintos géneros de actinobacterias, incluyendo *Actinomadura*, *Nocardiopsis*, *Micromonospora*, *Plantactisnospora* y *Streptomyces*. En particular, los géneros *Micromonospora* y *Actinomadura* presentaron actividad anticancerígena que revela el potencial de posibles nuevas rutas biosintéticas. Por lo que el presente trabajo, se enfoca en el análisis filogenómico y de minería genómica de 12 genomas aislados de dicho estudio que presentaron actividad anticancerígena.

2. METODOLOGÍA

2.1. Selección de cepas de actinobacterias, extracción de ADN y secuenciación

Del estudio de Zamora et al., 2022, se seleccionaron 12 cepas de actinobacterias con actividad anticancerígena para su secuenciación genómica. La extracción de ADN se realizó utilizando el método de fenol-cloroformo descrito en Ziemert y colaboradores (2014). El ADN extraído se envió al Centro Genómico de la Universidad de California, San Diego (IGM-UCSD) para su secuenciación utilizando la plataforma Illumina HiSeq 4000 (2x100 pb).

2.2. Análisis bioinformático de los genomas de actinobacterias

La calidad de las secuencias de los 12 genomas fue analizada mediante el programa FastQC (<http://www.bioinformatics.bbsrc.ac.uk/projects/fastqc>). Las lecturas de mala calidad y los adaptadores fueron removidos utilizando el programa BBDuk, utilizando las modificaciones de nivel de calidad Phred igual a 20, un número de k-meros igual a 23 y un mínimo de 11 k-meros, con un máximo de 1 desajuste (Bushnell, 2014). El ensamble *de novo* fue realizado utilizando Shovill (Seemann, 2017) y su calidad fue verificada con el programa CheckM (Parks et al., 2015). La anotación funcional se hizo con el programa Prokka (mincontiglen= 200) (Seemann, 2019).

2.3. Análisis filogenómico

Para la asignación taxonómica de los genomas se realizaron diferentes aproximaciones. En primer lugar se realizó una clasificación utilizando la Genome Taxonomy Database (GTDB), a través del GTDB toolkit (GTDB-tk) v1.7.0 (Chaumeil et al., 2019). Se empleó la base de datos EZBiocloud (Yoon et al., 2017) para identificar las cepas tipo que han sido descritas y que exhibieran el mayor porcentaje de similitud con base en el gen ribosomal 16S rARN. En esta selección se incluyeron los genomas de 229 cepas tipo, de las cuales se extrajo el gen 16S ARNr utilizando el programa Barnnap (Seemann, 2014). Posteriormente se generó un alineamiento de las secuencias extraídas utilizando el programa MAFFT (Kato et al., 2013) y se reconstruyó un árbol filogenético utilizando el método máxima verosimilitud con el programa IQtree v1.6.12 (Minh et al., 2020), utilizando 1000 réplicas y el parámetro ModelFinder (Kalyaanamoorthy et al., 2017) para conocer el mejor modelo de sustitución nucleotídica (GTR+F+R8).

Una segunda aproximación consistió en un análisis multilocus de secuencia (MLSA) a partir de la concatenación de 100 genes conservados y utilizando el programa AutoMLST (Alanjary et al., 2019). Para hacer la selección de los genomas de referencia para el MLSA, se consideraron dos criterios: 1) la similitud con base en el árbol filogenético para el gen 16S ARNr y, 2) la disponibilidad de genomas completos en las bases de datos. En total se incluyeron un total de 52 genomas (39 genomas de cepa tipo con mayor similitud, 12 genomas de estudio y grupo externo). Se utilizó el programa IQtree v1.6.12 (Minh et al., 2020) para generar el árbol filogenético utilizando el método de máxima verosimilitud

con 1000 réplicas y el mejor modelo de sustitución fue utilizado con base en ModelFinder (TVM+F+R10).

Como última aproximación fue utilizar el índice de identidad promedio de nucleótidos (ANI) e Hibridación digital DNA-DNA (dDDH). El ANI se calculó utilizando el programa en línea de comandos FastANI (Jain *et al.*, 2018), mientras que la hibridación digital DNA-DNA fue calculada con la herramienta GGDC (<http://ggdc.dsmz.de>) utilizando el método BLAST+ (Meier-Kolthoff *et al.*, 2013).

2.4. Minería genómica

Para predecir los BGCs en los 12 genomas se realizó un análisis de minería genómica utilizando el programa Antibiotics and Secondary Metabolite Analysis Shell (antiSMASH) versión 6.0 (Blin *et al.*, 2021). Se incluyeron los parámetros extendidos de MIBiG cluster comparison, Cluster Pfam analysis y ClusterBlast, que permiten identificar BGCs similares y comparar los BGCs con las bases de datos de Pfam (Mistry *et al.*, 2021), MIBiG (Terlouw *et al.*, 2023) y antiSMASH (Blin *et al.*, 2021).

Para evitar una sobre estimación en el número de BGCs, se realizó una revisión manual de los resultados de antiSMASH. Cuando no fue posible la asignación de clases de BGCs se realizaron los siguientes pasos: 1) se verificó que los BGCs no se encontraran incompletos o fragmentados, 2) se confirmó que los genes centrales se encontraran presentes en los BGCs para cada clase, 3) para los BGCs que no fueron asignados a una clase específica, se utilizó un criterio de similitud >50% para clasificarlos y 4) aquellos BGCs que no cumplieron con los criterios anteriores fueron asignados en la categoría de "Otros". Además, se consideraron BGCs únicos a aquellos que pertenecen a una clase específica pero no presentaron relación con la predicción de moléculas reportadas en la base de datos de antiSMASH. Se construyó una matriz de presencia de BGCs por genoma, la cual se visualizó utilizando el programa Circos (Krzywinski, *et al.*, 2009).

2.5. Comparación de rutas biosintéticas

El agrupamiento en familias de BGCs entre los genomas se llevó a cabo con el programa BiG-SCAPE, empleando el modo de alineación del subcluster común más largo (glocal) (Navarro-Muñoz *et al.*, 2020). Por ultimo, utilizando la paquetería ggplot2 (Wickham, 2016) en Rstudio (Racine, 2012). las GCFs se ordenaron en una matriz de ausencia/presencia para visualizar los patrones de distribución

2.6. Números de acceso

Las secuencias de los genomas se encuentran depositadas en NCBI con la siguiente información de proyecto BioProjectID PRJNA1161731, con los números de acceso de SAMN43789094 a SAMN43789105.

3. RESULTADOS

Se obtuvieron las secuencias de 12 genomas de actinobacterias aisladas de sedimento marino de la Laguna Ojo de Liebre (LOL) en B.C.S., México, cuyos tamaños oscilaron entre 6.1 y 9.2 Mbp. La longitud de los contigs fue de entre 134 y 445 bp y se obtuvo un porcentaje de completitud mayor al 98.95%. El porcentaje de GC resultó de entre 64 y 72%, logrando identificar entre 5680 a 8638 secuencias de codificación (CDS) (Tabla 1).

Tabla 1. Características generales de los 12 genomas de actinobacterias aisladas de sedimento marino.

Table 1. General characteristics of the 12 actinobacterial genomes isolated from marine sediments.

ID-genomas	Género	Contigs	%GC	Genes	CDS	Tamaño de genoma (Mb)	Compleitud (%)
LOL-011	<i>Actinomadura</i>	445	64	8638	8505	9.2	100
LOL-016	<i>Actinomadura</i>	229	70	8621	8488	9.2	100
LOL-012	<i>Nocardiosis</i>	159	70	4699	4610	5.1	100
LOL-024	<i>Micromonospora</i>	244	69	5712	5620	6.1	100
LOL-025	<i>Micromonospora</i>	169	72	6370	6222	7.2	100
LOL-013	<i>Micromonospora</i>	136	70	5680	5551	6.2	99.47
LOL-014	<i>Micromonospora</i>	134	69	5735	5599	6.2	99.47
LOL-015	<i>Micromonospora</i>	248	69	5856	5717	6.3	99.47
LOL-021	<i>Micromonospora</i>	201	68	6220	6128	6.8	98.95
LOL-023	<i>Micromonospora</i>	233	69	6305	6155	6.8	99.47
LOL-027	<i>Micromonospora</i>	164	69	5730	5571	6.2	99.47
LOL-028	<i>Micromonospora</i>	177	69	5715	5555	6.2	99.47

3.1. Identificación filogenética de los genomas

Los resultados de la identificación filogenética con el análisis del gen 16S rRNA, mostraron que los 12 genomas se agrupan con 3 géneros: *Actinomadura* (2 genomas), *Nocardiosis* (1 genoma) y *Micromonospora* (9 genomas), con un alto porcentaje de similitud (>99%) respecto a las cepas tipo más cercanas. Particularmente, los genomas afiliados al género *Micromonospora* mostraron similitudes del 99.93% en el gen 16S ARNr con *Micromonospora spongicola* S3-1, 99.72% con *Micromonospora phaseoli* CGMCC y 99.79% *Micromonospora citrea* DSM. En el caso de los genomas afiliados al género *Actinomadura* tuvieron un porcentaje de similitud del 99.93% con *Actinomadura crenea* JCM, y para el género *Nocardiosis* se mostró un porcentaje de similitud del 99.73% con

Nocardiosis fildesensis GW9-2. El árbol filogenético del gen 16S ARNr agrupó los 9 genomas de *Micromonospora* en 3 distintos clados; donde los genomas de LOL-013, LOL-014, LOL-015, LOL-021, LOL-023, LOL-027 y LOL-028 forman un clado entre ellas y se agrupan con los genomas más cercanos de *M. spongicola*, *M. caldifontis* y *M. zhanjiangensis*. Por otro lado, LOL-024 se encuentra en un clado con *M. phaseoli* y agrupada con *M. qiui*; mientras que el genoma de LOL-25 se encuentra en un clado con *M. chaiyaphumensis* y *M. citrea*. Los genomas de *Actinomadura* LOL-011 y LOL-016 se encuentran formando un clado entre ellas agrupadas con la cepa *A. creamea*, mientras que el genoma de *Nocardiosis* LOL-012 se encuentra formando un clado con *N. fildesensis* y *N. algeriensis* (Fig. S1). Cabe mencionar que los resultados obtenidos por GTDB-tk también clasifican a 9 de los genomas como cercanos al género *Micromonospora*, 1 genoma al género *Nocardiosis* y 2 genomas al género *Spirillospora*, es por ello que se agregó este género en los árboles filogenéticos para futuras comparaciones con el género *Actinomadura*.

Utilizando la aproximación de análisis multilocus en los genomas, se obtuvo un árbol filogenético con topología similar al gen 16S ARNr pero con mayor valor de soporte en los clados de los genomas de estudio (soporte de 100%) (Fig. 1, Fig. S1). Se observa la división en 3 subclados (a, b y c) en el género *Micromonospora*. El subclado “a” está conformado por 7 genomas (LOL-013, 014, 015, 021, 023, 027 y 028) con el genoma de referencia más cercano *M. pattaloongensis*. Los clados “b” y “c” se encontraron constituidos por un genoma cada uno, siendo los genomas de referencia más cercanos *M. phaseoli* (LOL-024; subclado b) y *M. echinosfusca* (LOL-025; subclado c), respectivamente (Fig. 1). Por otro lado, los genomas del grupo de las *Actinomadura* formaron un clado agrupado con el genoma de referencia *A. creamea* con un valor de soporte de 100%, mientras que el genoma perteneciente al género *Nocardiosis* se encontró formando un clado con el genoma de referencia *Nocardiosis* sp. CNT-312 agrupadas con el genoma de referencia *Nocardiosis lucentensis* (Fig. 1) con un valor de soporte de 100%.

En cuanto a la aproximación filogenómica de la métrica ANI se observó que para el género *Micromonospora* los valores oscilaron entre 80% a 93%, por debajo del valor de corte de delimitación de especies (95%). En particular el clado “a” de los genomas de *Micromonospora* se observa una separación de tres especies basado en valor de corte por debajo del 95% de ANI comparado con los genomas de cepa tipo más cercanas; esto también se observa para el clado “b” y “c”, con valores de ANI por debajo del 95% comparado con los genomas más cercanos (Fig. 2). En comparación, los valores ANI para los géneros *Nocardiosis* y *Actinomadura* resultaron iguales o superiores al valor de corte de entre 95% y 97%, respectivamente (Tabla S1). La aproximación de dDDH digital mostró valores por debajo del valor de corte (70%), que corresponde a la delimitación de especies en los genomas de *Micromonospora* y *Nocardiosis* con valores de 27.64% y 61.30%, respectivamente. En el caso del género *Actinomadura* mayores al 70% con respecto al genoma más cercano (Tabla S1).

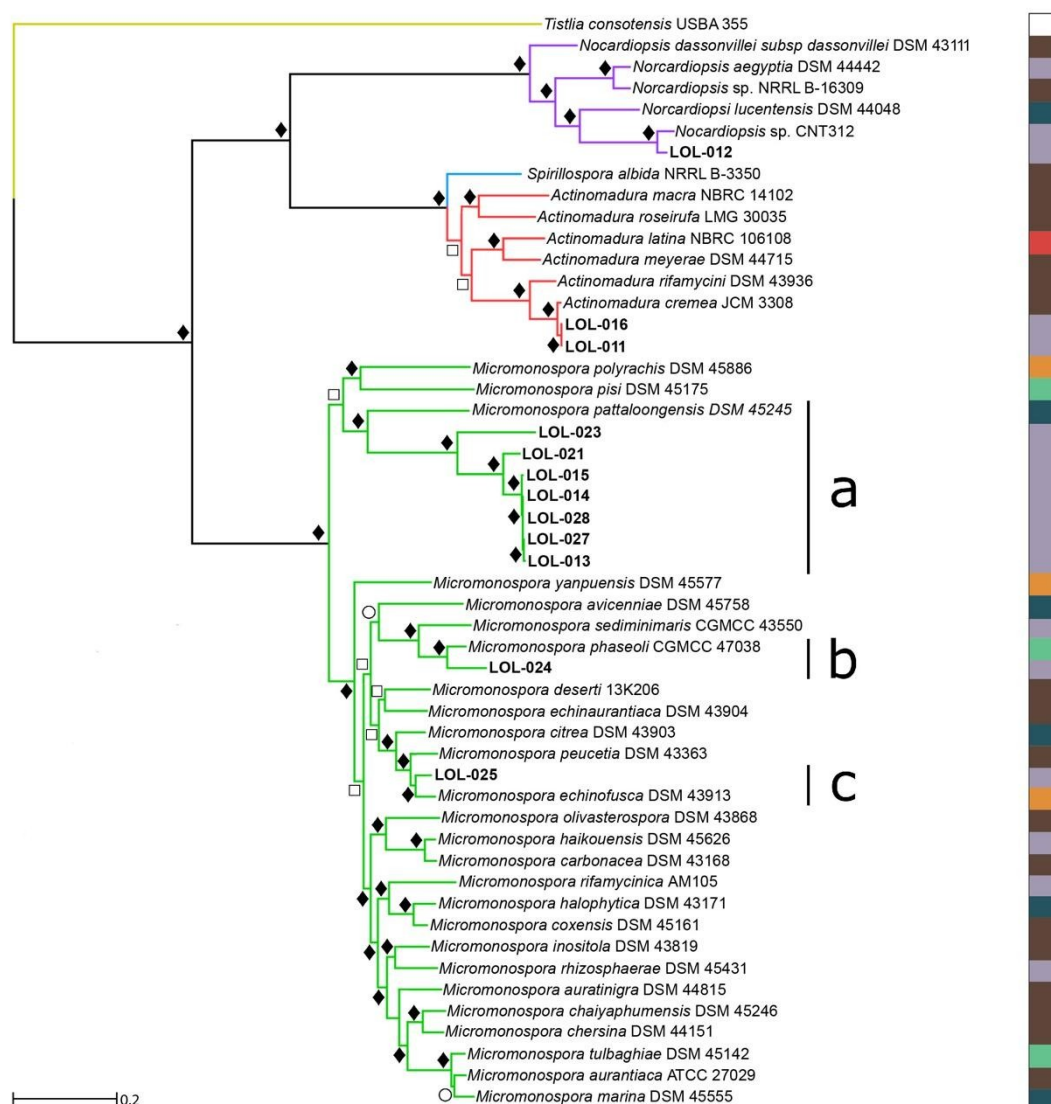


Fig. 1. Árbol filogenético de máxima verosimilitud basado en 100 genes constitutivos utilizando la herramienta autoMLST. Los clados se encuentran coloreado por su respectivo código de color: Grupo externo (amarillo), *Nocardioopsis* (morado), *Actinomadura* (rojo), *Spirillospora albida* (azul) y *Micromonospora* (verde). Se muestra definido el conjunto de subclados de *Micromonospora* (a, b y c). Los rombos negros (♦) indican los valores de soporte al 100%, los cuadrados (□) indican valores de soporte de 80-99% y los círculos (○) indican valores de soporte de 70-79%. Los colores de la barra derecha indican los hábitats de origen de los genomas; café (suelo), gris (sedimento), rojo (clínico), naranja (animal), verde (planta) y azul (acuático).

Fig. 1. Maximum likelihood phylogenetic tree constructed with the autoMLST tool. Clades are colored by their respective color: outgroup/yellow, *Nocardioopsis*/purple, *Actinomadura*/red, *Spirillospora albida*/blue, and *Micromonospora*/green. Black diamonds (♦) indicate 100% bootstrap support values, squares (□) indicate bootstrap support values of 80-99% and circles (○) indicate bootstrap support values of 70-79%. The colors on the right bar indicate the habitats of origin of the genomes; brown/soil, gray/sediment, red/clinical sample, orange/animal, green/plant and blue/aquatic.

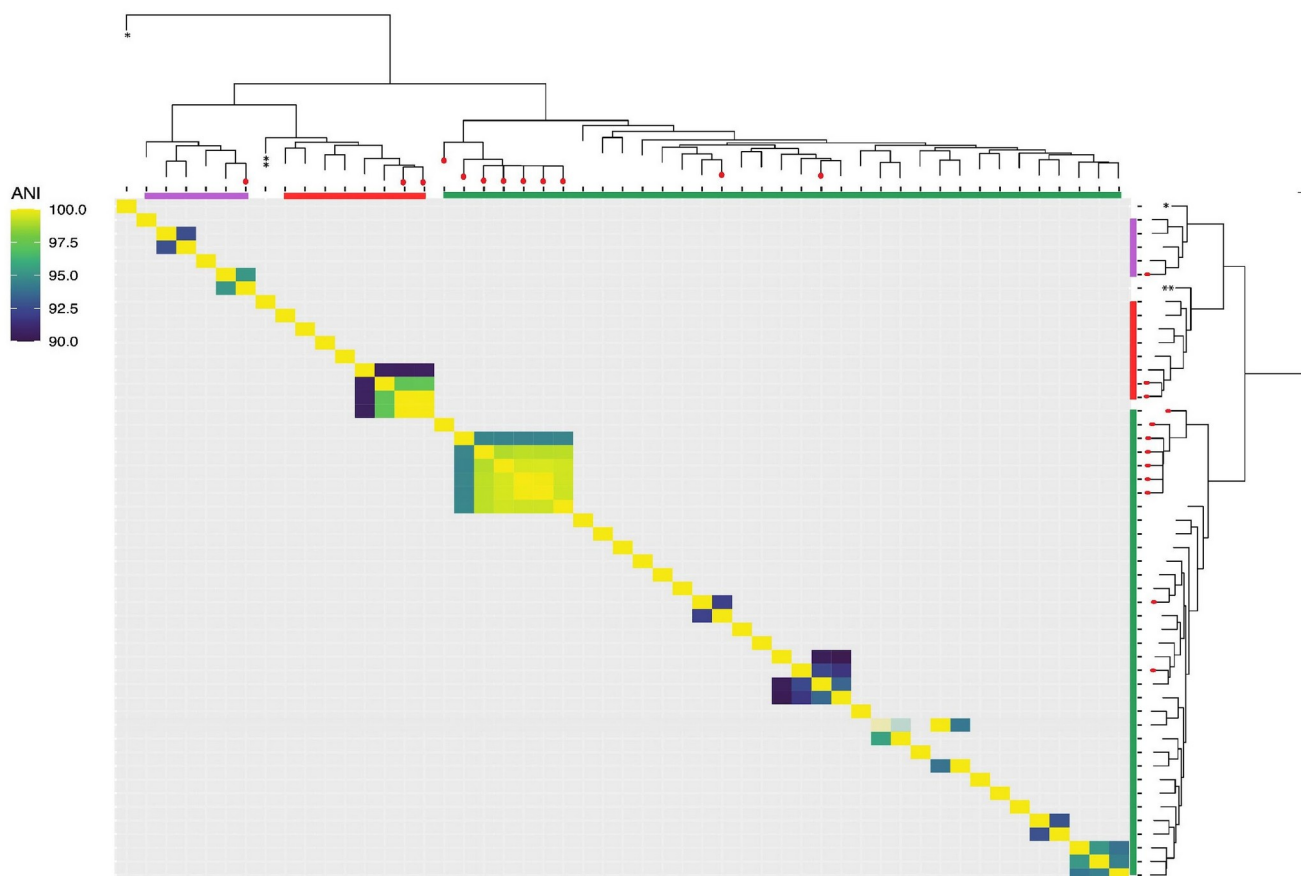


Fig. 2. Mapa de calor de las comparaciones de los valores por arriba del 90% de ANI de los genomas. En ambos ejes se utiliza el árbol MLSA para visualizar las comparaciones. En el árbol se muestra el clado de *Nocardiosis* de color morado, *Actinomadura* en rojo y *Micromonospora* en verde. En círculos rojos se muestran los genomas de estudio.

Fig. 2. Heatmap of ANI values above 90% between the MLSA phylogeny genomes comparison. In the phylogenetic tree the *Nocardiosis* Clade is shown in purple, *Actinomadura* in red and *Micromonospora* in green. In red circles the genomes from this study are marked.

3.2. Minería genómica de rutas de genes biosintéticos

Los análisis de antiSMASH mostraron la presencia de un total de 314 BGCs en los 12 genomas de estudio. Para los genomas del género *Micromonospora* se identificaron un máximo de 30 BGCs (LOL-025), para los genomas del género *Actinomadura* se identificaron 29 BGCs (LOL-011 y LOL-016) y para el género *Nocardiosis* 22 BGCs. Además, de acuerdo con la longitud de la región de los BGCs identificados se estimó que hasta un 8.9% de los genomas evaluados se encuentra asociado al metabolismo secundario. Se observó que los géneros que presentaron mayor número de clases de BGCs fueron *Actinomadura* y *Micromonospora*, con 13 y 12 clases respectivamente.

Las principales clases de BGCs compartidas entre genomas corresponden a: terpenos, policétidos tipo I (T1PKS), péptidos sintetizados no ribosomalmente (NRPS) y péptidos modificados postraduccionalmente y sintetizados ribosomalmente (RiPPs); así como los terpenos, T1PKS, NRPS, RiPPs-like y terpenos fueron los de mayor abundancia entre los genomas con un promedio de tres BGCs para cada clase (Fig. 3). En particular, el genoma de *Micromonospora* LOL-025 contó con la mayor cantidad de BGCs (12)

relacionados con la categoría de NRPS (Fig. 3). Además, la categoría T1PKS se observó en 11 de los genomas analizados, solo LOL-024 no contó con ningún BGC de esta categoría. Por otro lado, las categorías con menor abundancia de BGCs fueron: Rantipéptidos, Furano, Tioamitido, Tiopéptido, Aminoglucósido (amglyccycl) y Lasso péptido (Fig. 4). Particularmente, la categoría de Amglyccycl y Thiopeptide-LAP solo se encontraron presentes en genomas del género *Micromonospora* y en el caso de los genomas del género *Actinomadura* se observaron únicamente Thioamitides y Cofactor-Redox. Cabe mencionar que la categoría de Lassopéptido fue compartida entre los géneros de *Actinomadura* y *Nocardiopsis*; mientras que las categorías de Rantipéptido y Furano contaron con un solo BGC en *Micromonospora* (LOL-021) y *Nocardiopsis*, respectivamente.

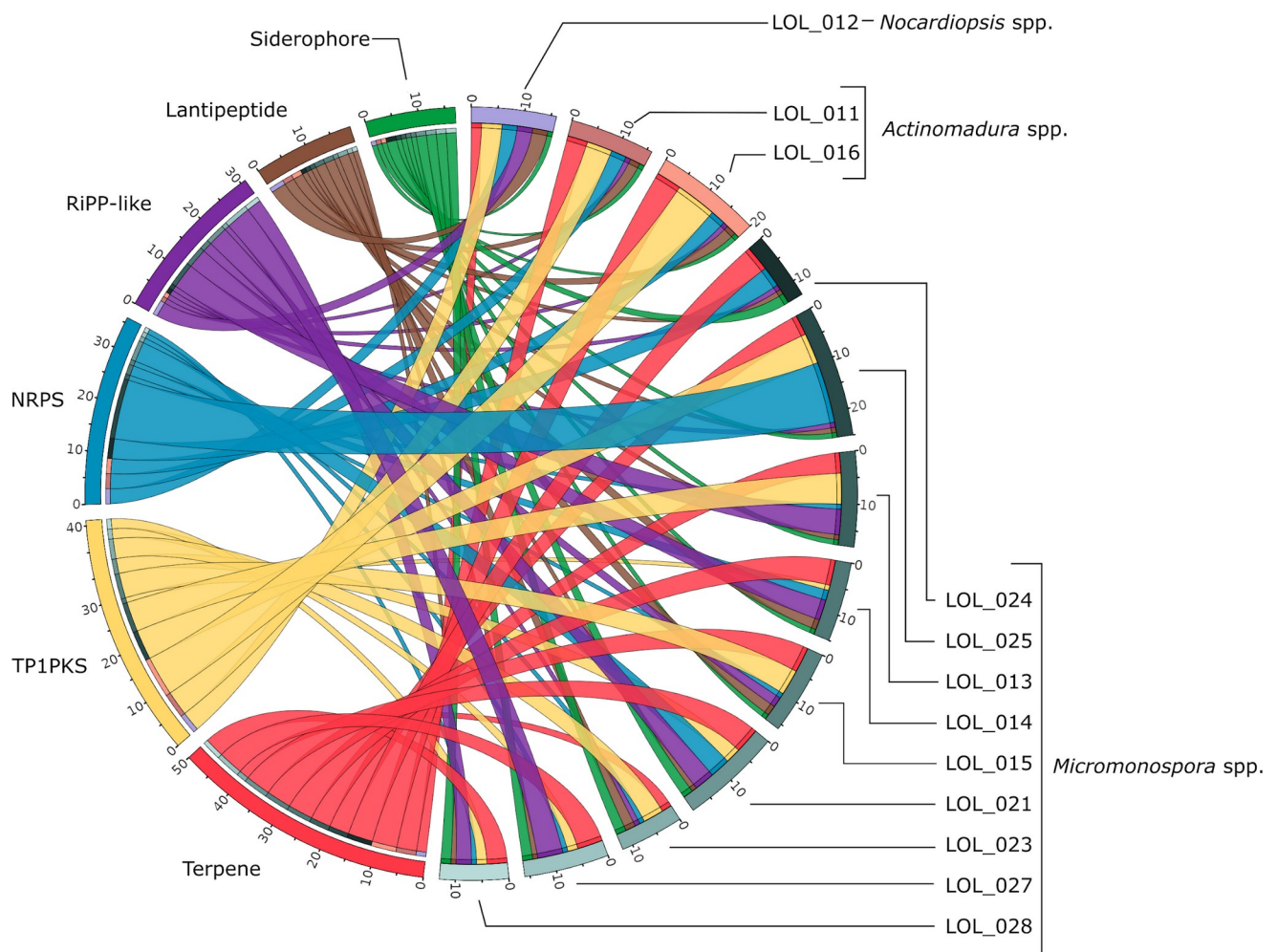


Fig. 3. Diversidad de BGC en los 12 genomas de estudio, ordenado por mayor abundancia de ruta metabólica. El color de los listones representa el tipo de ruta metabólica y la anchura representa el número de BGC de cada ruta metabólica.

Fig. 3. BGC diversity of the 12 genomes ordered by the highest metabolic pathway abundance in the 12 actinomycete strains. The color of the bands represents the type of metabolic pathway and the width represents the number of BGCs in each metabolic pathway in each genome.

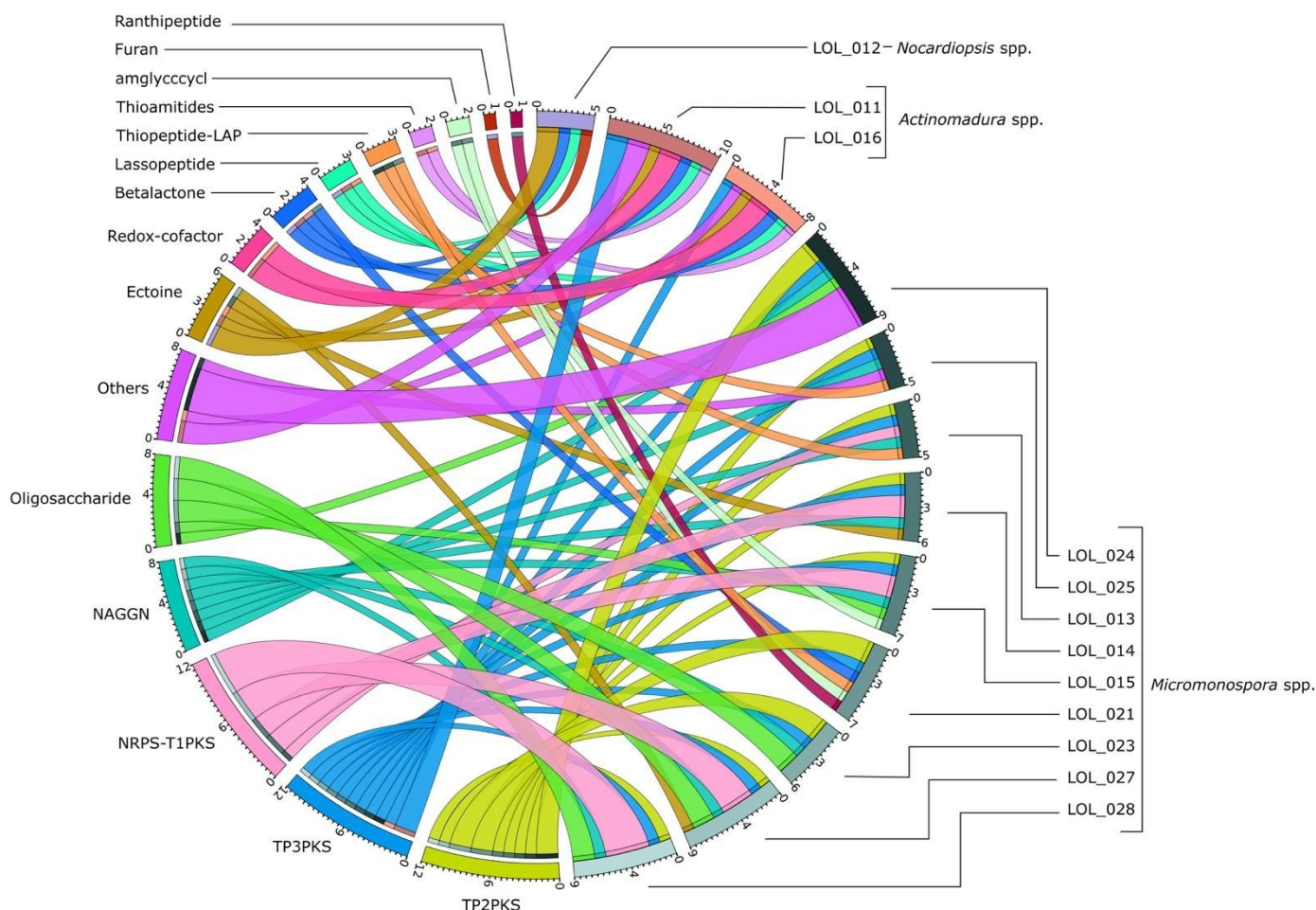


Fig. 4. Diversidad de BGC en los 12 genomas de estudio, ordenado por menor abundancia. El color de los listones representa el tipo de ruta metabólica y la anchura representa el número de BGC de cada ruta metabólica.

Fig. 4. BGC diversity of the 12 genomes ordered by the lowest abundance. The color of the bands represents the type of metabolic pathway and the width represents the number of BGCs in each metabolic pathway.

Respecto a los resultados de redes de similitud utilizando BiG-SCAPE mostraron la agrupación de los BGCs en GCFs en donde se identificaron un total de 1074 entre todos los genomas analizados del árbol MLSA (235 GCF entre los 12 genomas). Se dividieron en 8 diferentes categorías: híbridos de PKS-NRP (65), NRPS (260), PKS (139), Terpenos (113), RiPPs (151), PKS-I (150), Sacáridos (27) y otros (169). La categoría NRPS fue la que mostró la mayoría (80%) de GCFs identificados entre los géneros. En cuanto a los GCFs formados entre géneros, no se observó la formación de ninguna familia. Sin embargo, entre genomas del mismo género sí se observaron agrupaciones. En particular, el género *Micromonospora* mostró la mayor agrupación de familias entre los BGCs analizados, correspondiente a un 6.7% del total de GCFs observadas. Por su parte, para el genoma LOL-028, perteneciente al subclado “a” de *Micromonospora*, se observó que todos sus BGCs formaron GCFs exclusivamente con los genomas de este subclado, lo que resalta la similitud y especificidad genética existente dentro de este subclado.

En general, se identificaron 3 GCF con coincidencias en la base de datos de MIBiG dentro las categorías de Otros y Otros-PKS. Específicamente, el GCF de la categoría de Otros se encontró integrado por los genomas LOL-024, LOL-025, *M. chersina* y *M. sediminaria*

con relación al BGC de Desferrioxamine E de *Streptomyces* sp. (ID38640) (Sosio *et al.*, 2018). En la clase de Otros-PKS se encontró un GCF conformado únicamente por LOL-023 relacionado al BGC de Saquayamaycin Z aislado de *Micromonospora* sp. Tu 6368 (Erb *et al.*, 2009). Los genomas de LOL-023 y LOL-025 se encontraron relacionados con un GCF 431 (Awakawa *et al.*, 2011) y agrupado con otras 11 especies de *Micromonospora* (*M. auratinigra*, *M. inositola*, *M. olivasterospora*, *M. rhizosphaerae*, *M. halophytica*, *M. coxensis*, *M. marina*, *M. echinaurantiaca*, *M. yangpuensis*, *M. polyrhachis*, *M. pisi*).

Para los genomas de *Actinomadura* LOL-011 y LOL-016, todos sus BGCs formaron únicamente GCFs entre ellos; particularmente en la categoría de Híbridos de NRPS-PKS se encontró una coincidencia en las bases de datos con el compuesto Maduropeptin formando un GCF con la cepa de referencia *Actinomadura madurae*. Por su parte, en el genoma *Nocardiosis* LOL-012, ningún GCF tuvo relación de similitud con lo conocido en las bases de datos, ni tampoco tuvo GCF compartidos con otros géneros. A pesar de esto, formó familias principalmente con el genoma de referencia *Nocardiosis* sp. CNT-312, con el que compartió 13 familias, en las categorías de NRPS (4), RiPPs (3), PKS (2), Terpeno (1) y Otras (3). Además, solamente compartió un GCF en la categoría de "Otros" con los genomas de referencia *N. dassonvillei*, *N. aegyptia*, *N. sp.* NRRL B-16309, *N. lucentensis* y *N. sp.* CNT-312.

En cuanto a la comparación de los patrones de distribución de los GCFs entre genomas de cada uno de los géneros (Fig. 5), se utilizó la distribución de filogenia del árbol de MLSA. Particularmente, se observó que los genomas del subclado "a" tuvieron la formación de un GFC en la categoría de Terpenos, exceptuando a LOL-023. Particularmente, en este subclado el genoma LOL-023 al igual que *M. pattaloongensis* no contaron con GCF en la categoría Otros-PKS. De manera similar, LOL-014 y LOL-013 no presentaron ningún GCF relacionado con la clase de Sacáridos. Con respecto al subclado "b" se observaron los contrastes en los patrones de distribución. Específicamente, se observó que LOL-024 carece de GCF en la categoría de PKS. Cabe señalar que LOL-024 presenta GCFs exclusivos en comparación con *M. phaseoli*, específicamente en las clases de Sacáridos (1) y RiPPs (7). También, en el subclado "c" se observaron discrepancias, por ejemplo únicamente en la clase RiPPs, LOL-025 exhibió la presencia de 3 GCFs que no se encontraban en su homólogo más cercano, *M. echinofusca*.

Con relación al clado de *Actinomadura*, los patrones de distribución de GCF fueron iguales entre LOL-011 y LOL-016, compartiendo todos sus GCFs (32). Mientras que respecto a su homólogo más cercano (*A. cremea*), solo comparte 15 GCF. Los patrones de distribución en los genomas de *Nocardiosis* no formaron un GCF relacionado con la clase Sacáridos, excepto *N. dassonvillei*. Mientras que los genomas de *Nocardiosis* sp. NRRL B.16309, *Nocardiosis* sp. CNT-312 y LOL-012 no contaron con GCFs de las clases Híbridos PKS/NRPS. Asimismo, el genoma LOL-012 contó con un GCF en la clase Otros PKS que su homólogo más cercano *Nocardiosis* sp. CNT-312.

Adicionalmente, se comparó entre GCFs de los géneros con respecto a otros genomas presentes en el estudio. Se observó la presencia de tres grupos, cada uno representativo de un género específico. Puntualmente, en el género *Nocardiosis*, se determinó que con la especie filogenéticamente más cercana comparte un 13% de GCF, marcando la máxima correlación en este grupo. En el caso del género *Actinomadura*, se destacó una asociación completa entre los genomas LOL-011 y LOL-016, alcanzando un 100% de

coincidencia en sus GCFs. Adicionalmente, ambos genomas compartieron GCFs con el genoma *A. cremea* en un 32%.

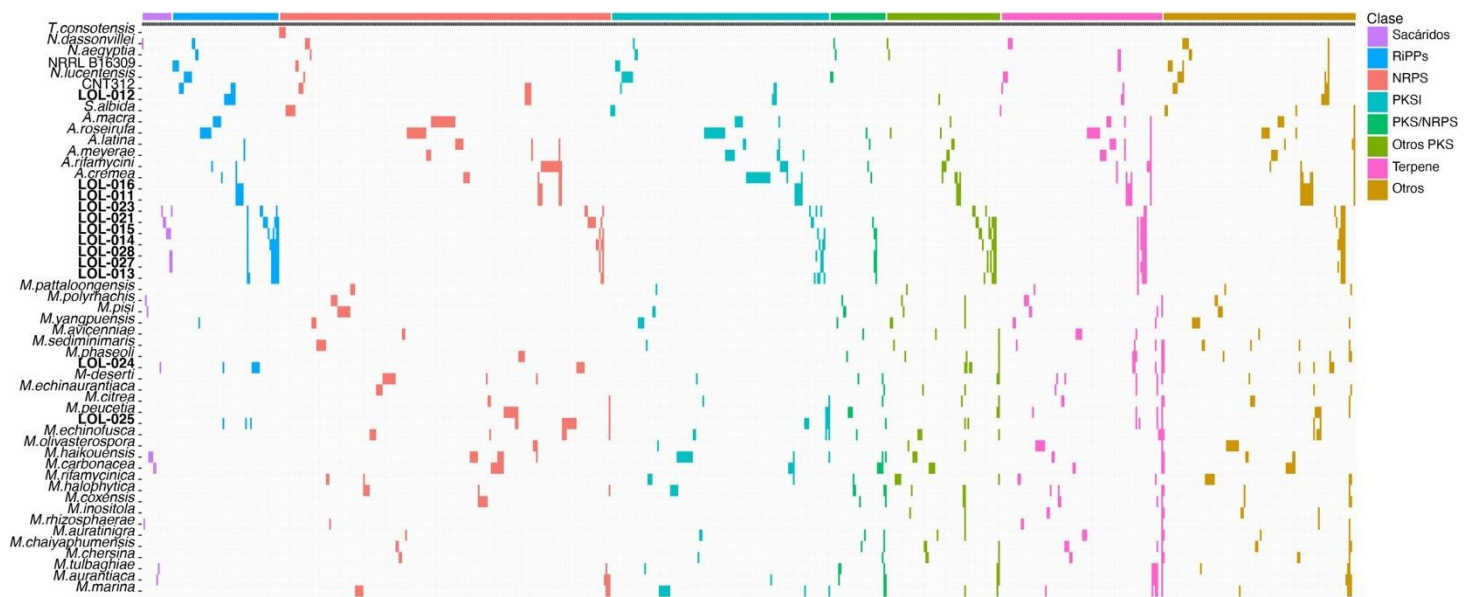


Fig. 5. Presencia/ausencia de GCFs en los géneros *Micromonospora*, *Actinomadura*, *Nocardiopsis*. Las columnas en la matriz corresponden a la clase dadas por BiGSCAPE y las filas a los genomas organizados con base en filogenia de MSLA. La ausencia de cada clase se muestra en blanco y la presencia de cada clase se encuentra coloreada de acuerdo con el código de color que se muestra en la imagen

Fig. 5. Presence/absence of GCFs in the genera *Micromonospora*, *Actinomadura*, *Nocardiopsis*. The columns in the matrix correspond to the class given by BiGSCAPE and the rows to the genomes organized based on MSLA phylogeny. The absence of each class is shown in white, and the presence of each class is colored according to the color key shown.

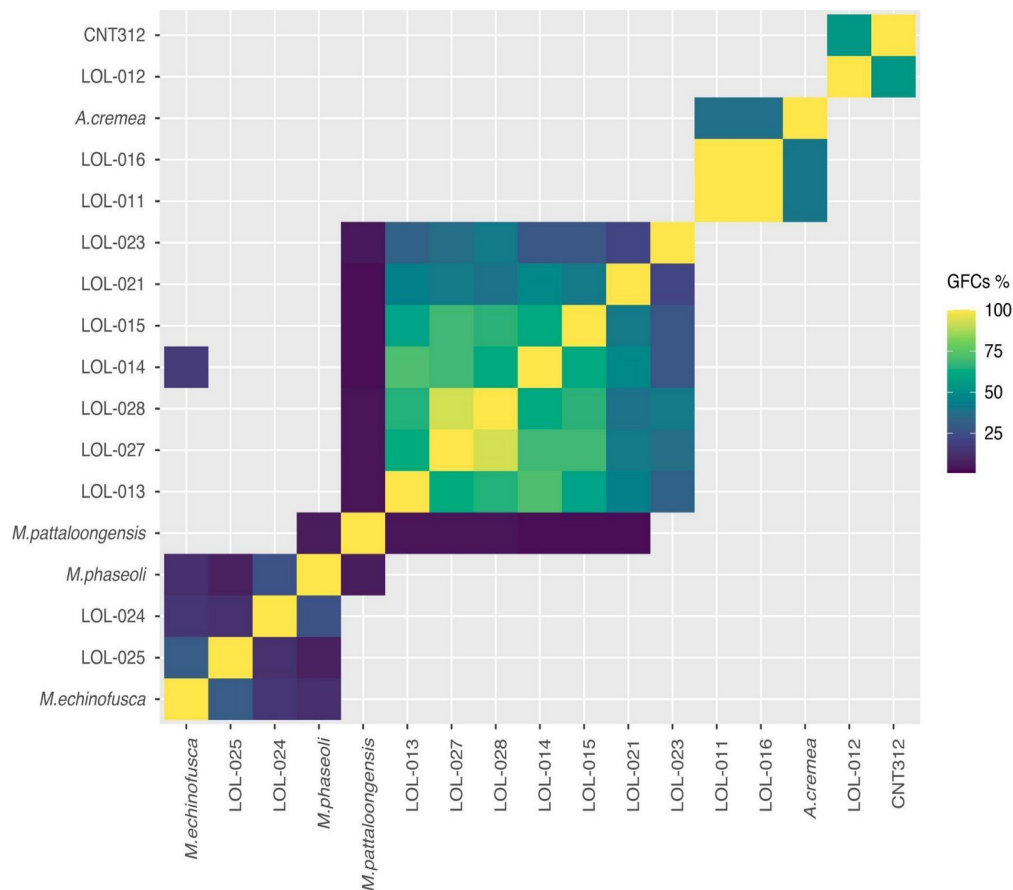


Fig. 6. Mapa de calor de comparaciones de GCFs entre géneros de actinobacterias. Los genomas están ordenados en ambos ejes de acuerdo con el orden del árbol MLSA. La escala de 1-100 representa el porcentaje de GCFs compartidos. En donde las comparaciones son igual a 0 se muestran en gris.

Fig. 6. Heat map image of GCF comparisons between actinobacterial genera. Genomes are sorted on both axes according to MLSA order. The scale of 1-100 represents the percentage of shared GFCs. Where comparisons are equal to 0 they are shown in gray.

Con respecto al género *Micromonospora*, se observó que el porcentaje de GCFs compartidos fue superior al 50% entre los genomas más cercanos (LOL-015, LOL-014, LOL-028, LOL-027 y LOL-013). Sin embargo, al incorporar al análisis a LOL-021, un genoma más distante con respecto al grupo anteriormente mencionado, el porcentaje se redujo a un 36% de GCF compartidos y al agregar a LOL-023 el porcentaje también se redujo a un 21% de GCF compartidos. Además, la comparación del subclado “a” con respecto al genoma de referencia filogenéticamente más cercano de *M. pattaloongensis*, solamente se compartieron un 3% de GCF. Por otro lado, el subclado “b” y “c” compartieron entre ellas un 13%, y con sus genomas de referencia más cercanos *M. phaseoli* y *M. echinofusca* un 26% y un 30%, respectivamente. Lo anterior sugiere que existe una cierta diversidad genética en la que entre mayor sea la distancia filogenética que existe entre genomas, comparten menos GCF. Por lo que, esto enriquece nuestra comprensión de las relaciones genómicas dentro de los géneros estudiados, ofreciendo una visión detallada de las similitudes y posibles diferencias funcionales entre los genomas.

4. DISCUSIÓN

La secuenciación y análisis de genomas se ha convertido en una herramienta de gran uso para la clasificación taxonómica y filogenética de bacterias, para poder comprender las relaciones evolutivas y su diversidad genética. García-López *et al.* (2019) y Lalucat *et al.* (2020) resaltan la importancia de estas clasificaciones para aclarar las relaciones taxonómicas y reorganizar las especies dentro de los géneros utilizando genomas. Específicamente, estas clasificaciones resultan cruciales para asignaciones taxonómicas precisas, siendo particularmente relevantes en el caso del descubrimiento de nuevas especies bacterianas (von Meijenfeldt *et al.*, 2019). En este estudio el análisis inicial de identificación del gen 16S ARNr y los análisis filogenómicos demostraron ser herramientas útiles durante la clasificación taxonómica y filogenética de los genomas de este estudio, utilizando las cepas tipo más cercanas filogenéticamente en el gen 16S ARNr. Por ejemplo, esto permitió la diferenciación de los genomas LOL-011 y LOL-016 entre los géneros *Spirillospora* y *Actinomadura*, que anteriormente se ha reportado la estrecha relación que existe entre ellos. Por lo que estudios genómicos son necesarios para aclarar este tipo de relaciones (Nouioui *et al.*, 2018; Zhang *et al.*, 2001) y resultan esenciales para una comunicación efectiva de los resultados científicos, y también contribuyen de manera significativa a la robustez y claridad del marco taxonómico en la investigación bacteriana (Parks *et al.*, 2019).

Estudios del gen 16S ARNr han puesto en evidencia las limitaciones de este método en la designación a nivel de especies debido a su alto grado de conservación; a pesar de este grado de similitud, diferenciaciones nucleotídicas del gen 16S rARN han revelado, que una sola base en regiones variables puede revelar nuevas especies (Cho *et al.*, 2020; Mateo-Estrada *et al.*, 2019; Millán-Aguiñaga *et al.*, 2017). Por lo que es necesario utilizar análisis complementarios como MLSA, ANI, y dDDH para determinar a mayor precisión la identificación de actinobacterias, así como de otros grupos de bacterias (Baig *et al.*, 2021; Mohamad Naim *et al.*, 2022). Por ejemplo, anteriormente se consideraba 98.7% de similitud en el gen 16S ARN, como valor de corte para delimitar especies (Stackebrandt and Eberts, 2006). Actualmente, esta regla se ha modificado y no es aplicable a todos los géneros (ej. *Salinispora*, *Micromonospora* y *Bacillus*), ya que basta con cambios de un solo nucleótido en su secuencia para asignar nuevas especies (Román-Ponce *et al.*, 2020; Pinto-Almeida *et al.*, 2021; Said Hassane *et al.*, 2020). En los 12 genomas de este estudio se tuvieron valores >99% de similitud en el gen 16S ARNr, por lo que análisis complementarios como el MLSA aunadas a métricas como ANI y dDDH, resultaron esenciales para realizar una correcta delimitación de las especies (Alanjary *et al.*, 2019; Lalucat *et al.*, 2020). Los genomas de estudio sugieren con base en los análisis de MLSA, ANI y dDDH (ANI <80% y dDDH ~21%) que los 9 genomas de *Micromonospora*, pueden representar 5 cepas candidatas a nuevas especies. Por lo que sugerimos es necesario realizar análisis fenotípicos detallados incluyendo evaluaciones quimiotaxonómicas y fisiológicas, además de una reconstrucción filogenética del núcleo de los genomas y para poder concluir si en efecto se pudieran proponer nuevas especies.

En el caso de los genomas de *Actinomadura* y *Nocardiopsis*, éstos se encontraron por encima de los valores de corte de ANI y dDDH en la delimitación de las especies con respecto a sus genomas de referencia más cercanos de *Actinomadura cremea* (Preobrazhenskaia *et al.*, 1975) y *Nocardiopsis luncentensis* (Yassin *et al.*, 1993). Se logró confirmar mediante los resultados filogenómicos que ambos genomas del género *Actinomadura* se agrupan con la especie *Actinomadura cremea*, lo que se asignó previamente por Zamora *et al.* (2022) utilizando solo el gen 16S ARNr. En lo que respecta al genoma afiliado al género *Nocardiopsis*, los resultados de ANI (>95%) mostraron que la

cepa *Nocardiopsis* sp. CNT-312 (Schorn *et al.*, 2016) fue la especie más cercana filogenéticamente al nivel jerárquico de especie; sin embargo, el análisis de dDDH con un valor de 61.30, sugiere delimitarla como nueva especie. Este tipo de resultados, donde los valores de corte de dDDH y ANI están por debajo o se encuentra muy cercano del valor límite, ha sido reportado en recientes estudios en genomas de actinobacterias como *Micromonospora* y *Rhodococcus* (Abdel-Mageed *et al.*, 2021; Riesco *et al.*, 2018; Thomson *et al.*, 2020). Es importante hacer mención que las diferencias reportadas en los índices también se pueden deber al método utilizado para su cálculo. Por lo que se debe de tomar en consideración este tipo de diferencias a la hora de reportar una posible diferenciación genética entre genomas a nivel de especie. Además, dada la amplia diversidad genética y evolutiva de las bacterias, se recomienda considerar la historia evolutiva de los taxones (Palmer *et al.*, 2020; Riesco *et al.*, 2018; Thomson *et al.*, 2020). Debido a lo antes mencionado y a los resultados filogenéticos de este estudio, sería adecuado realizar más estudios entre el genoma de *Nocardiopsis* sp. (LOL-012) y *Nocardiopsis* sp. (CNT-312).

Con minería genómica fue posible obtener los perfiles genómicos asociados a metabolismo secundario que nos permite predecir el tipo de compuesto que las cepas de estudio podrían tener la capacidad de producir y que además pudieran tener propiedades bioactivas (Gregory *et al.*, 2019). Para el género *Micromonospora* se han reportado una gran diversidad de BGCs. Por ejemplo, recientemente Yang *et al.* (2021) para cepas de *Micromonospora* aisladas de una esponja marina (*Craniella* sp.) reportaron un total de 22 BGCs en la cepa *M. craniellae* LHW63014^T, en comparación al máximo de 30 BGCs observados en este estudio para el mismo género. Se ha observado que las bacterias simbiotes tienen un tamaño de genoma reducido debido a que han modificado principalmente sus rutas metabólicas para complementar algunas particularidades de la ecología y fisiología del huésped, lo que podría explicar la diferencia entre los genomas de este estudio (Moran and Wernegreen, 2000; Rio *et al.*, 2003). Por otra parte, el número de BGCs en los géneros *Actinomadura* y *Nocardiopsis* observados es mayor al reportado en aislados de ambientes distintos al marino donde el número tiende a ser menor *i.e.* ambientes terrestres (Tarantini *et al.*, 2021; Xu *et al.*, 2018). Esto en gran medida se puede deber a diferentes factores como el tamaño del genoma, transferencia horizontal, contenido de BGC y especificidad de BGCs (Seshadri *et al.*, 2022). Las actinobacterias marinas tienden a tener una mayor diversidad y número de BGCs en comparación con las terrestres (Li *et al.*, 2023; Silva *et al.*, 2017), esto podría deberse a la competencia por recursos en ambientes marinos que impulsa la evolución de una mayor variedad de productos naturales para la defensa y la comunicación intermicrobiana (Liu and Kakeya, 2020; Tuttle *et al.*, 2019; van der Lee and Medema, 2016). Esto es relevante para comprender la biología y ecología detrás de la producción de metabolitos secundarios aún en especies del mismo género, y por lo tanto los factores que promueven su producción y su potencial para desarrollar nuevos fármacos (van Bergeijk *et al.*, 2020).

Una de las categorías de metabolismo secundario observadas con mayor abundancia fue la de los terpenos, la cual se encontró presente en todos los genomas de este estudio. La mayoría de los terpenos observados se encuentran relacionados a los genomas de *Micromonospora*; coincidiendo con lo reportado por Carro *et al.* (2018) donde reportan que la mayoría de los BGCs presentes son terpenos (82 BGCs) en 40 genomas de *Micromonospora* aisladas de diferentes ambientes. Sin embargo, en este estudio no observamos similitud con alguna familia o compuesto específico. Se conoce que los terpenos tienen diversas funciones, entre ellas la formación de pigmentos en bacterias (Xie y Elsheikh, 2021). La pigmentación observada en las colonias de bacterias en nuestro estudio proporciona información relevante sobre las características fenotípicas de

las cepas (Caruso *et al.* 2022; Gomes *et al.* 2022). La variación en la intensidad y el color de las pigmentaciones puede indicar la producción de metabolitos específicos o la adaptación a ciertos ambientes. Por ejemplo, las colonias con una pigmentación intensa rojo-amarillo podrían sugerir la presencia de carotenoides, compuestos conocidos por sus propiedades antioxidantes (Aruldass *et al.*, 2018; Dawoud *et al.*, 2020; El-Tarabily *et al.*, 2021). Además, la pigmentación oscura en algunas colonias podría indicar la producción de compuestos como melanina, que a menudo están relacionados con la protección contra el estrés ambiental (Pavan *et al.*, 2019). Estos hallazgos concuerdan con observaciones previas en otros estudios que han identificado la relación entre la pigmentación y la adaptación de las bacterias a su entorno (Dieser *et al.*, 2010; Fong *et al.*, 2001; Singh *et al.*, 2017). Uno de los carotenoides más estudiados es la astaxantina, un pigmento rojo reportado en bacterias marinas (Liu *et al.*, 2020) y que se ha reportado que cuenta con una fuerte actividad antioxidante (neutralizando las especies reactivas de oxígeno (ROS)), antiinflamatoria y antiapoptótica (Asker *et al.*, 2018; Brotosudarmo *et al.*, 2020; Hassan *et al.*, 2021). En el contexto de la producción de carotenoides en actinobacterias marinas, Sandmann (2021) destaca la notable diversidad de carotenoides sintetizados por este grupo, incluyendo aquellos con una longitud de cadena C50, grupos terminales aromáticos y ceto-carotenoides. De igual manera, subraya la capacidad de las actinobacterias marinas para sintetizar carotenoides con estructuras químicas variadas (e.g. pigmentos), lo cual puede influir en sus propiedades biológicas y potenciales aplicaciones. Sin embargo, para las cepas aisladas de LOL aún existe un amplio espacio para la exploración y caracterización de los terpenos que potencialmente pueden producir y respecto a su función en la célula y en el ecosistema marino.

Los PKS y NRPS fueron las siguientes dos clases de grupos de genes biosintéticos que fueron observados con mayor abundancia en los genomas de este estudio. Este tipo de clases se han reportado asociados a una gran cantidad de los antibióticos y antifúngicos conocidos (Cragg y Newman, 2013). Se han reportado recientemente la presencia de estas clases de BGCs, en particular PKS-I y NRPS, con diferentes actividades en los géneros *Streptomyces*, *Micrococcus*, *Brachy bacterium*, *Micromonospora* y *Saccharomonospora* aislados de diferentes hábitats, entre ellos ambientes marinos e hipersalinos (Shayesteh *et al.*, 2020; Anggelina *et al.*, 2021; Ramírez-Durán *et al.*, 2021). En particular, este estudio sugiere que las actinobacterias marinas tienen la capacidad de sintetizar biosintéticamente clústeres de PKS y NRPS, lo que implica un potencial para la producción de nuevos compuestos bioactivos. Se debe tener en cuenta que, aunque los compuestos producidos pueden no mostrar actividad directa contra otras bacterias, en el medio ambiente pueden presentar propiedades biológicas alternativas de beneficio para las células que los producen. Por ejemplo, al examinar los genomas del género *Micromonospora*, identificamos que los genomas LOL-024 y LOL-025 presentan grupos de PKS tipo-III, pertenecientes a la producción de Alkyl-O-dihydro geranyl methoxy hydroquinona; un tipo de lípido fenólico prenilado que se cree por otros tipos de alkylquinonas que pueda estar relacionado con la rigidez de la membrana celular. Además de otros BGCs de Sideróforos como la desferrioxamina E y moléculas osmoprotectoras como ectoína y N-acetilglutaminilglutamina amida (NAGGN).

En particular, la presencia de ectoína en todos los genomas del género *Actinomadura* y *Nocardiopsis* confirman lo reportado por Arulpraskasam y Dharumadurai (2021), en donde señalan que el grupo de genes de síntesis de la ectoína se encuentra conservado en todos los géneros de actinobacterias, excepto en el género *Micromonospora*, lo cual se confirma en este estudio. Es importante mencionar que se ha reportado que la ausencia de ectoína se ha correlacionado con la presencia de NAGGN en *Micromonospora*, como también lo observamos. Los genes de ectoína y NAGGN tienen una función

osmoprotectora, la cual es importante para contrarrestar y mantener el equilibrio osmótico en su entorno (Arulpraskasam and Dharumadurai, 2021; Abdel-Mageed *et al.*, 2021). Con base en lo anterior, consideramos que la presencia de estos grupos de genes en los genomas de cepas LOL juegan un papel clave en la síntesis de compuestos osmoprotectores, que resultan relevantes en ambientes con altas salinidades como la Laguna Ojo de Liebre.

A pesar de la abundancia de GCFs detectados en la formación de redes de similitud, resultó que su porcentaje de homología fue significativamente bajo, registrando menos del 1% en comparación con aquellos ya documentados en las bases de datos de referencia. Esto sugiere que las actinobacterias cuyos GCFs exhiben bajos niveles de homología con aquellos conocidos poseen un potencial elevado para la producción de compuestos novedosos con actividad biológica (Hifnawy *et al.*, 2020; Soldatou *et al.*, 2021). Cabe mencionar que las cepas de este estudio han reportado actividad biológica contra diferentes líneas celulares de cáncer (Zamora *et al.*, 2022), y los análisis de masas de estos extractos revelaron una escasa similitud con las masas de compuestos previamente consignados en la literatura científica (Zamora *et al.*, 2022). Estos resultados fortalecen la hipótesis de que las actinobacterias con GCFs poco homólogos ofrecen un reservorio prometedor para la identificación de nuevos compuestos bioactivos.

Los dos genomas del género *Actinomadura* que se analizaron en este estudio (LOL-011 y LOL-016) tuvieron entre ellos un 100% de similitud en sus patrones de distribución de GCF; así como alta similitud con el genoma de referencia más cercano (*A. cremea*). Estos análisis apoyan la afiliación quimiotaxonómica de nuestras cepas a esta misma especie. Una familia de genes ya estudiada y conocida que estos genomas poseen es la del híbrido de PKS-NRP, que produce el compuesto Maduropeptina. Este compuesto fue inicialmente aislado de la cepa *A. madurae* ATCC 39144 y descrito por Van Lanen *et al.* en 2007, y pertenece a la familia de antibióticos antitumorales de la enedina. Su estructura incluye una proteína transportadora (MDP) y un cromóforo, propuesto que se compone de cuatro enzimas: MdpB, MdpB1, MdpB2 y MdpB3 (Ling *et al.*, 2010). Debido al alto grado de similitud con esta ruta metabólica en nuestros genomas, podemos inferir que también la especie *A. cremea*, tiene el potencial de producir dicho compuesto; lo que sugiere que las cepas correspondientes a los genomas estudiados tienen el potencial de producir al menos un compuesto con propiedades antibióticas y antitumorales.

Por otra parte, los patrones de distribución del genoma LOL-012 con respecto a su genoma filogenéticamente más cercano, *Nocardiopsis* sp CNT-312, presentaron cinco diferencias en categorías como RiPPs, PKSs, Terpenos y Otros lo que representa que comparten un 54% en sus comparaciones de GCFs. Lo cual nos puede indicar un valor alto de similitud y apoya la hipótesis de que representan la misma especie. Sin embargo, a pesar de tener altos niveles de similitud con respecto a los GCFs observados, será necesario realizar más estudios para considerar clasificar como una nueva especie. El potencial del genoma de *Nocardiopsis* LOL-012 reveló grupos de genes relacionados con la producción de compuestos con propiedades antimicrobianas, dado que este género ha sido reconocido por su capacidad sobresaliente en la producción de tales compuestos (Bennur *et al.*, 2015).

5. CONCLUSIÓN

El análisis genómico realizado permitió evaluar las relaciones filogenéticas y el potencial biosintético de las cepas de actinobacterias aisladas de los sedimentos de la Laguna Ojo de Liebre. La combinación de herramientas como la comparación de las secuencias del gen 16S ARNr, junto con los análisis de MLSA, ANI y dDDH, facilitó una identificación robusta y, en algunos casos, permitió proponer nuevas especies, como resultó con las cepas del género *Micromonospora*. Además, la minería genómica reveló una notable diversidad de genes biosintéticos, particularmente aquellos relacionados con la producción de terpenos, PKS y NRPS, lo que sugiere un considerable potencial de estas actinobacterias para la síntesis de compuestos bioactivos con aplicaciones biotecnológicas, especialmente terapéuticas. Los resultados de este estudio refuerzan la idea de que las actinobacterias provenientes de ambientes extremos, como la Laguna Ojo de Liebre, representan una fuente prometedora de metabolitos. Sin embargo, se resalta la necesidad de realizar estudios fenotípicos adicionales que permitan confirmar la delimitación de especies y explorar con mayor profundidad el potencial de estas bacterias en el desarrollo de nuevos fármacos.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos al gobierno Mexicano por su apoyo a través de una subvención por PRODEP-SEP (UABC-PTC-676), y al CONAHCYT con la beca de Doctorado del CVU 553310 y el financiamiento otorgado para el proyecto de Ciencia de Frontera CF-2023-G-690 otorgadas para llevar a cabo esta investigación científica. A la Universidad Autónoma de Baja California por financiar esta investigación a través de la 22a Convocatoria Interna con el proyecto 401-1-C-35-22. Agradecemos el apoyo de la beca para Mujeres en la Ciencia L'Oreal-UNESCO-Academia Mexicana de Ciencias 2021. A la Exportadora de Sal S.A. por su apoyo y logística en Guerrero Negro, B.C.S., para la recolección de muestras de sedimento.

CONTRIBUCIÓN DE LOS AUTORES

Cesar O. Carreón-Gaxiola realizó el trabajo experimental bioinformático, analizó los datos, generó figuras, tablas y redactó el manuscrito. Mónica Torres-Beltrán, generó figuras, analizó los datos y edición del manuscrito. Juan A. Ugalde realizó limpieza por calidades de lecturas y ensamble de genomas. Natalie Millán-Aguiñaga planificó los experimentos, proporcionó la idea inicial del proyecto, supervisó la investigación, analizó los datos y redactó el manuscrito. Todos los autores leyeron y aprobaron la versión final del manuscrito.

CONFLICTO DE INTERESES

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

REFERENCIAS

1. Abdel-Mageed, W. M., Al-Wahaibi, L. H., Lehri, B., Al-Saleem, M. S. M., Goodfellow, M., Kusuma, A. B., Nouioui, I., Soleh, H., Pathom-Aree, W., Jaspars, M., Karlyshev, A. V., 2021. Biotechnological and ecological potential of *Micromonospora provocator* sp. nov., a gifted strain isolated from the challenger deep of the Mariana trench. Mar. Drugs. 19(5), 243. <https://doi.org/10.3390/md19050243>
2. Abdel-Razek, A. S., El-Naggar, M. E., Allam, A., Morsy, O. M., Othman, S. I., 2020. Microbial natural products in drug discovery. Processes. 8(4), 470. <https://doi.org/10.3390/pr8040470>
3. Adamek, M., Alanjary, M., Sales-Ortells, H., Goodfellow, M., Bull, A. T., Winkler, A., Wibberg, D., Kalinowski, J., Ziemert, N., 2018. Comparative genomics reveals phylogenetic distribution patterns of secondary metabolites in *Amycolatopsis* species. BMC Genomics. 19 (1), 426. <https://doi.org/10.1186/s12864-018-4809-4>
4. Alanjary, M., Steinke, K., Ziemert, N., 2019. AutoMLST: An automated web server for generating multi-locus species trees highlighting natural product potential. Nucleic Acids Res. 47 (W1), W276-W282. <https://doi.org/10.1093/nar/gkz282>
5. Amin, D. H., Abdallah, N. A., Abolmaaty, A., Tolba, S., Wellington, E. M. H., 2020. Microbiological and molecular insights on rare Actinobacteria harboring bioactive prospective. Bull. Natl. Res. Cent. 44 (1), 5. <https://doi.org/10.1186/s42269-019-0266-8>
6. Anggelina, A. C., Pringgenies, D., Setyati, W. A., 2021. Presence of biosynthetic gene clusters (NRPS/PKS) in actinomycetes of mangrove sediment in Semarang and Karimunjawa, Indonesia. Environ. Nat. Resour. J. 19 (5), 391-401. <https://doi.org/10.32526/ennrj/19/202100050>
7. Aruldass, C. A., Dufossé, L., Ahmad, W. A., 2018. Current perspective of yellowish-orange pigments from microorganisms- a review. J. Clean. Prod. 180, 168-182. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2018.01.093>
8. Arulprakasam, K. R., Dharumadurai, D., 2021. Genome mining of biosynthetic gene clusters intended for secondary metabolites conservation in actinobacteria. Microb. Pathog. 161, 105252. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2021.105252>
9. Asker, D., Awad, T. S., Beppu, T., Ueda, K., 2018. Rapid and selective screening method for isolation and identification of carotenoid-producing bacteria. In: Barreiro, C., Barredo, J.L. (Eds.), Microbial Carotenoids. vol. 1852. Springer, New York, pp. 143-170. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8742-9_9
10. Awakawa, T., Fujita, N., Hayakawa, M., Ohnishi, Y., Horinouchi, S., 2011. Characterization of the biosynthesis gene cluster for alkyl-O-dihydrogeranyl-methoxyhydroquinones in *Actinoplanes missouriensis*. Chembiobhem. 12(3), 439-448. <https://doi.org/10.1002/cbic.201000628>
11. Baig, U., Dahanukar, N., Shintre, N., Holkar, K., Pund, A., Lele, U., Gujarathi, T., Patel, K., Jakati, A., Singh, R., Vidwans, H., Tamhane, V., Deshpande, N., Watve,

- M., 2021. Phylogenetic diversity and activity screening of cultivable Actinobacteria isolated from marine sponges and associated environments from the western coast of India. Access Microbiol. 3(9). <https://doi.org/10.1099/acmi.0.000242>
12. Barka, E. A., Vatsa, P., Sanchez, L., Gaveau-Vaillant, N., Jacquard, C., Klenk, H. P., Clément, C., Ouhdouch, Y., Van Wezel, G. P., 2016. Taxonomy, physiology, and natural products of Actinobacteria. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 80(1), 1-43. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00019-15>
 13. Ben Khedher, M., Ghedira, K., Rolain, J. M., Ruimy, R., Croce, O., 2022. Application and challenge of 3rd generation sequencing for Clinical Bacterial Studies. Int. J. Mol. Sci. 23(3), 1395. <https://doi.org/10.3390/ijms23031395>
 14. Bennur, T., Kumar, A. R., Zinjarde, S., Javdekar, V., 2015. *Nocardiosis* species: incidence, ecological roles and adaptations. Microbiol. Res, 174, 33-47. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2015.03.010>
 15. Blin, K., Shaw, S., Kloosterman, A. M., Charlop-Powers, Z., van Wezel, G. P., Medema, M. H., Weber, T., 2021. antiSMASH 6.0: Improving cluster detection and comparison capabilities. Nucleic Acids Res. 49(W1), W29-W35. <https://doi.org/10.1093/nar/gkab335>
 16. Bowmer, K. H., Padovan, A., Oliver, R. L., Korth, W., Ganf, G. G., 1992. Physiology of geosmin production by *Anabaena circinalis* Isolated from the Murrumbidgee river, Australia. Water Sci. Technol. 25 (2), 259-267. <https://doi.org/10.2166/wst.1992.0060>
 17. Brotosudarmo, T. H. P., Limantara, L., Setiyono, E., Heriyanto., 2020. Structures of astaxanthin and their consequences for therapeutic application. Int. J. Food Sci. 1-16. <https://doi.org/10.1155/2020/2156582>
 18. Bushnell, B., 2020. BBDuk, California, Estados Unidos, <https://jgi.doe.gov/data-and-tools/software-tools/bbtools/bb-tools-user-guide/bbduk-guide/> (consultado agosto 7, 2021)
 19. Cardoso-Martínez, F., Becerril-Espinosa, A., Barrila-Ortíz, C., Torres-Beltrán, M., Ocampo-Alvarez, H., Iñiguez-Martínez, A. M., Soria-Mercado, I. E., 2015. Antibacterial and cytotoxic bioactivity of marine Actinobacteria from Loreto Bay national park, Mexico. Hidrobiológica. 25 (2), 223-229. <https://hidrobiologica.izt.uam.mx/index.php/revHidro/article/view/479>
 20. Carranco Jáuregui, M. E., Calvo Carrillo, M., Pérez-Gil Romo, F., 2011. Carotenoides y su función antioxidante: Revisión. Arch. Latinoam. Nutr. 61 (3), 233-241. <http://www.alanrevista.org/ediciones/2011/3/art-1/>
 21. Carro, L., Nouioui, I., Sangal, V., Meier-Kolthoff, J. P., Trujillo, M. E., Montero-Calasanz, M. D. C., Sahin, N., Smith, D. L., Kim, K. E., Peluso, P., Deshpande, S., Woyke, T., Shapiro, N., Kyrpides, N. C., Klenk, H. P., Göker, M., Goodfellow, M., 2018. Genome-based classification of micromonosporae with a focus on their biotechnological and ecological potential. Sci. Rep. 8(1), 525. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-17392-0>

22. Caruso G., Dell'Acqua O., Caruso R., Azzaro M., 2022. Phenotypic characterization of bacterial isolates from marine waters and plastisphere communities of the Ross Sea (Antarctica). J. Clin. Microbiol. Biochem. Technol. 8 (1), 001-009. <https://dx.doi.org/10.17352/jcmbt.000048>
23. Chaumeil, P. A., Mussig, A. J., Hugenholtz, P., Parks, D. H., 2020. GTDB-Tk: A toolkit to classify genomes with the genome taxonomy database. Bioinformatics. 36(6), 1925-1927. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btz848>
24. Cho, S. T., Kung, H. J., Huang, W., Hogenhout, S. A., Kuo, C. H., 2020. Species boundaries and molecular markers for the classification of 16S rDNA phytoplasmas inferred by genome analysis. Front. Microbiol. 11, 1531. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01531>
25. Chun, J., Oren, A., Ventosa, A., Christensen, H., Arahal, D. R., Da Costa, M. S., Rooney, A. P., Yi, H., Xu, X.-W., De Meyer, S., Trujillo, M. E., 2018. Proposed minimal standards for the use of genome data for the taxonomy of prokaryotes. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 68 (1), 461-466. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.002516>
26. Cragg, G. M., Newman, D. J., 2013. Natural products: A continuing source of novel drug leads. Biochim. Biophys. Acta – Gen. Subj. 1830 (6), 3670-3695. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2013.02.008>
27. Dat, T. T. H., Steinert, G., Cuc, N. T. K., Cuong, P. V., Smidt, H., Sipkema, D., 2022. Diversity of bacterial secondary metabolite biosynthetic gene clusters in three vietnamese sponges. Mar. Drugs, 21(1), 29. <https://doi.org/10.3390/md21010029>
28. Dawoud, T. M., Alharbi, N. S., Theruvinalakal, A. M., Thekkangil, A., Kadaikunnan, S., Khaled, J. M., Almana, T. N., Sankar, K., Innasimuthu, G. M., Alanzi, K. F., Rajaram, S. K., 2020. Characterization and antifungal activity of the yellow pigment produced by a *Bacillus* sp. DBS4 isolated from the lichen *Dirinaria agealita*. Saudi J. Biol. Sci. 27(5), 1403-1411. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2019.11.031>
29. Edelvio, D. B. G., Leo, R. L. D., Rita, D. C. M. D. M., 2018. Actinomycetes bioactive compounds: Biological control of fungi and phytopathogenic insect. Afr. J. Biotechnol. 17 (17), 552-559. <https://doi.org/10.5897/AJB2017.16323>
30. El-Tarabily, K. A., Sham, A., Elbadawi, A. A., Hassan, A. H., Alhosani, B. K. K., El-Esawi, M. A., AlKhajeh, A. S., AbuQamar, S. F., 2021. A Consortium of rhizosphere-competent Actinobacteria exhibiting multiple plant growth-promoting traits improves the growth of *Avicennia marina* in the United Arab Emirates. Front. Mar. Sci. 8, 715123. <https://doi.org/10.3389/fmars.2021.715123>
31. Erb, A., Luzhetskyy, A., Hardter, U., Bechthold, A., 2009. Cloning and sequencing of the biosynthetic gene cluster for saquayamycin z and galtamycin b and the elucidation of the assembly of their saccharide chains. Chembiochem. 10 (8), 1392-1401. <https://doi.org/10.1002/cbic.200900054>
32. Fong, N. J. C., Burgess, M. L., Barrow, K. D., Glenn, D. R., 2001. Carotenoid accumulation in the psychrotrophic bacterium *Arthrobacter agilis* in response to

- thermal and salt stress. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 56 (5-6), 750-756.
<https://doi.org/10.1007/s002530100739>
33. Garavito, A., González-Muñoz, A., Mosquera-Rendón, J., Catalina, A., Álvarez-Yela, D. L. Á., Cristancho-Ardila, M. A., 2017. Latin American biodiversity and perspectives to study it using 'omics' technologies/Biodiversidad latinoamericana y sus perspectivas de estudio con tecnologías 'ómicas'. *Mex. J. Biotechnol.* 2 (2), 98-129. <https://doi.org/10.29267/mxjb.2017.2.2.98>
34. García-López, M., Meier-Kolthoff, J. P., Tindall, B. J., Gronow, S., Woyke, T., Kyrpides, N. C., Göker, M., 2019. Analysis of 1,000 type-strain genomes improves taxonomic classification of Bacteroidetes. *Front. Microbiol.* 10, 2083. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02083>
35. Glaeser, S. P., Kämpfer, P., 2015. Multilocus sequence analysis (MLSA) in prokaryotic taxonomy. *Syst. Appl. Microbiol.* 38 (4), 237-245. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2015.03.007>
36. Gomes, R. P., Oliveira, T. R., Gama, A. R., Alves, K. R., Santos, R. K., Vieira, J. D. G., Pires, D., Carneiro, L. C., 2022. Phenotypic plasticity and characterization of *Chromobacterium* isolates from aquatic environment. *Res. Soc. Dev.* 11 (15). <https://doi.org/10.33448/rsd-v11i15.36821>
37. Goris, J., Konstantinidis, K. T., Klappenbach, J. A., Coenye, T., Vandamme, P., Tiedje, J. M., 2007. DNA–DNA hybridization values and their relationship to whole-genome sequence similarities. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 57 (1), 81-91. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.64483-0>
38. Gregory, K., Salvador, L. A., Akbar, S., Adaikpoh, B. I., Stevens, D. C., 2019. Survey of biosynthetic gene clusters from sequenced *Myxobacteria* reveals unexplored biosynthetic potential. *Microorganisms*, 7 (6), 181. <https://doi.org/10.3390/microorganisms7060181>
39. Hassan, W. M., 2022. Microbial pigments: Sources and applications in the marine environment. *Egypt. J. Aquat. Biol. Fish.* 26 (1), 99-124. <https://doi.org/10.21608/ejabf.2022.215163>
40. He, Z., Wang, Y., Bai, X., Chu, M., Yi, Y., Zhu, J., Gu, M., Jiang, L., Zhang, Z., 2023. Bacterial community composition and isolation of Actinobacteria from the soil of flaming mountain in Xinjiang, China. *Microorganisms*. 11(2), 489. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11020489>
41. Hifnawy, M. S., Fouda, M. M., Sayed, A. M., Mohammed, R., Hassan, H. M., AbouZid, S. F., Rateb, M. E., Keller, A., Adamek, M., Ziemert, N., Abdelmohsen, U. R., 2020. The genus *Micromonospora* as a model microorganism for bioactive natural product discovery. *RSC Adv.* 10(35), 20939-20959. <https://doi.org/10.1039/D0RA04025H>
42. Hu, D., Sun, C., Jin, T., Fan, G., Mok, K. M., Li, K., Lee, S. M. Y., 2020. Exploring the potential of antibiotic production from rare Actinobacteria by whole-genome sequencing and guided MS/MS analysis. *Front. Microbiol.* 11, 1540. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01540>

43. Hui, M. L. Y., Tan, L. T. H., Letchumanan, V., He, Y. W., Fang, C. M., Chan, K. G., Law, J. W. F., Lee, L. H., 2021. The extremophilic actinobacteria: from microbes to medicine. *Antibiotics*. 10(6), 682. <https://doi.org/10.3390/antibiotics10060682>
44. Jagannathan, S. V., Manemann, E. M., Rowe, S. E., Callender, M. C., Soto, W., 2021. Marine actinomycetes, new sources of biotechnological products. *Mar. Drugs*. 19(7), 365. <https://doi.org/10.3390/md19070365>
45. Jain, C., Rodriguez-R, L. M., Phillippy, A. M., Konstantinidis, K. T., Aluru, S., 2018. High throughput ANI analysis of 90K prokaryotic genomes reveals clear species boundaries. *Nat. Commun.* 9(1), 5114. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-07641-9>
46. Jakubiec-Krzesniak, K., Rajnisz-Mateusiak, A., Guspiel, A., Ziemska, J., Solecka, J., 2018. Secondary metabolites of actinomycetes and their antibacterial, antifungal and antiviral properties. *Pol. J. Microbiol.* 67(3), 259-272. <https://doi.org/10.21307/pjm-2018-048>
47. Kalkreuter, E., Pan, G., Cepeda, A. J., Shen, B., 2020. Targeting bacterial genomes for natural product discovery. *Trends Pharmacol. Sci.* 41(1), 13-26. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2019.11.002>
48. Katoh, K., Standley, D. M., 2013. MAFFT Multiple Sequence Alignment Software Version 7: improvements in performance and usability. *Mol. Biol. Evol.* 30(4), 772-780. <https://doi.org/10.1093/molbev/mst010>
49. Kim, M., Lee, K. E., Cha, I. T., Park, S. J., 2022. *Photobacterium halophilum* sp. nov. and a salt-loving bacterium isolated from marine sediment. *Diversity*. 14(3), 188. <https://doi.org/10.3390/d14030188>
50. Krzywinski, M., Schein, J., Birol, I., Connors, J., Gascoyne, R., Horsman, D., Jones, S. J., Marra, M. A., 2009. Circos: An information aesthetic for comparative genomics. *Genome Res.* 19(9), 1639-1645. <https://doi.org/10.1101/gr.092759.109>
51. Lalucat, J., Mulet, M., Gomila, M., García-Valdés, E., 2020. Genomics in bacterial taxonomy: Impact on the genus *Pseudomonas*. *Genes*. 11(2), 139. <https://doi.org/10.3390/genes11020139>
52. LeBlanc, N., Charles, T. C., 2022. Bacterial genome reductions: Tools, applications, and challenges. *Front. Genome Ed.* 4, 957289. <https://doi.org/10.3389/fgeed.2022.957289>
53. Li, Q., Chen, X., Jiang, Y., Jiang, C., 2016. Morphological identification of actinobacteria. In: Dharumadurai, D., Yi, J. (Eds.), *Actinobacteria-basics and biotechnological applications*, IntechOpen, Reino Unido, pp. 59-86. <https://dx.doi.org/10.5772/61461>
54. Li, S., Jiang, Y. J., Ma, Z., Wang, N., 2023. Complete genome sequence of *Streptomyces* sp. HNA39, a new cyclizidine producer isolated from a South China Sea sediment. *Mar. Genomics*, 70, 101033. <https://doi.org/10.1016/j.margen.2023.101033>

55. Ling, J., Horsman, G. P., Huang, S.-X., Luo, Y., Lin, S., Shen, B., 2010. Enediyne antitumor antibiotic maduropeptin biosynthesis featuring a c-methyltransferase that acts on a CoA-tethered aromatic substrate. *J. Am. Chem. Soc.* 132(36), 12534-12536. <https://doi.org/10.1021/ja1050814>
56. Liu, C., Kakeya, H., 2020. Cryptic chemical communication: Secondary metabolic responses revealed by microbial co-culture. *Chem. Asian J.* 15(3), 327-337. <https://doi.org/10.1002/asia.201901505>
57. Liu, H., Zhang, C., Zhang, X., Tan, K., Zhang, H., Cheng, D., Ye, T., Li, S., Ma, H., Zheng, H., 2020. A novel carotenoids-producing marine bacterium from noble scallop *Chlamys nobilis* and antioxidant activities of its carotenoid compositions. *Food Chem.* 320, 126629. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.126629>
58. Manikkam, R., Pati, P., Thangavel, S., Venugopal, G., Joseph, J., Ramasamy, B., Dastager, S. G., 2019. Distribution and bioprospecting potential of actinobacteria from Indian mangrove ecosystems. In: In: Satyanarayana, T., Johri, B., Das, S. (Eds.), *Microbial Diversity in Ecosystem Sustainability and Biotechnological Applications*. vol.1. Springer, Singapore, pp. 319-353. https://doi.org/10.1007/978-981-13-8315-1_11
59. Mateo-Estrada, V., Graña-Miraglia, L., López-Leal, G., Castillo-Ramírez, S., 2019. Phylogenomics reveals clear cases of misclassification and genus-wide phylogenetic markers for *Acinetobacter*. *Genome Biol. Evol.* 11(9), 2531-2541. <https://doi.org/10.1093/gbe/evz178>
60. Medema, M. H., Cimermancic, P., Sali, A., Takano, E., Fischbach, M. A., 2014. A systematic computational analysis of biosynthetic gene cluster evolution: lessons for engineering biosynthesis. *PLOS Comput. Biol.* 10 (12):e1004016. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1004016>
61. Millán-Aguiñaga, N., Chavarria, K. L., Ugalde, J. A., Letzel, A. C., Rouse, G. W., Jensen, P. R., 2017. Phylogenomic insight into *Salinispora* (Bacteria, Actinobacteria) species designations. *Sci. Rep.* 7(1), 3564. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-02845-3>
62. Millán-Aguiñaga, N., Soldatou, S., Brozio, S., Munnoch, J. T., Howe, J., Hoskisson, P. A., Duncan, K. R., 2019. Awakening ancient polar Actinobacteria: Diversity, evolution and specialized metabolite potential. *Microbiology.* 165(11), 1169-1180. <https://doi.org/10.1099/mic.0.000845>
63. Minh, B. Q., Schmidt, H. A., Chernomor, O., Schrempf, D., Woodhams, M. D., Von Haeseler, A., Lanfear, R., 2020. IQ-TREE 2: New models and efficient methods for phylogenetic inference in the genomic era. *Mol. Biol. Evol.* 37(5), 1530-1534. <https://doi.org/10.1093/molbev/msaa015>
64. Mistry, J., Chuguransky, S., Williams, L., Qureshi, M., Salazar, G. A., Sonnhammer, E. L. L., Tosatto, S. C. E., Paladin, L., Raj, S., Richardson, L. J., Finn, R. D., Bateman, A., 2021. Pfam: The protein families database in 2021. *Nucleic Acids Res.* 49(D1), D412-D419. <https://doi.org/10.1093/nar/gkaa913>

65. Mohamad Naim, N. A. I., Tajul Anuar, N. R., Ahmad, L. W. Z., Kambol, R., Syed Mohamad, S. A., Aris, F., Zakaria, N. A., Mohamed Yunus, N., 2022. In silico study of the effectiveness of 16S rRNA gene as a universal genetic marker to identify closely related *Burkholderia* spp. in panicle blight of rice. Sci. Lett. J. 16(1), 102. <https://doi.org/10.24191/sl.v16i1.15582>
66. Moran, N. A., Wernegreen, J. J., 2000. Lifestyle evolution in symbiotic bacteria: Insights from genomics. Trends Ecol. Evol. 15(8), 321-326. [https://doi.org/10.1016/S0169-5347\(00\)01902-9](https://doi.org/10.1016/S0169-5347(00)01902-9)
67. Mukherjee, S., Stamatis, D., Li, C. T., Ovchinnikova, G., Bertsch, J., Sundaramurthi, J. C., Kandimalla, M., Nicolopoulos, P. A., Favognano, A., Chen I. C., Kyrpides, C. K., Reddy, T. B. K., 2023. Twenty-five years of Genomes OnLine Database (GOLD): data updates and new features in v. 9. Nucleic Acids Res. 51 (D1), D957-D963. <https://doi.org/10.1093/nar/gkac974>
68. Mukhia, S., Kumar, A., Kumari, P., Kumar, R., Kumar, S., 2022. Multilocus sequence based identification and adaptational strategies of *Pseudomonas* sp. From the supraglacial site of Sikkim Himalaya. PLOS ONE. 17(1), e0261178. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0261178>
69. Muller Jr, P. A., Epstein, S. S., 2012. In silico genome-genome hybridization values accurately and precisely predict empirical DNA-DNA hybridization values for classifying prokaryotes. arXiv, 1202.5211. <https://doi.org/10.48550/arXiv.1202.5211>
70. Naughton, L. M., Romano, S., O'Gara, F., Dobson, A. D. W., 2017. Identification of secondary metabolite gene clusters in the *Pseudovibrio* genus reveals encouraging biosynthetic potential toward the production of novel bioactive compounds. Front. Microbiol. 8, 1494. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01494>
71. Navarro-Muñoz, J. C., Selem-Mojica, N., Mallowney, M. W., Kautsar, S. A., Tryon, J. H., Parkinson, E. I., De Los Santos, E. L. C., Yeong, M., Cruz-Morales, P., Abubucker, S., Roeters, A., Lokhorst, W., Fernandez-Guerra, A., Cappelini, L. T. D., Goering, A. W., Thomson, R. J., Metcalf, W. W., Kelleher, N. L., Barona-Gomez, F., Medema, M. H., 2020. A computational framework to explore large-scale biosynthetic diversity. Nat. Chem. Biol. 16(1), 60-68. <https://doi.org/10.1038/s41589-019-0400-9>
72. Nouioui, I., Carro, L., García-López, M., Meier-Kolthoff, J. P., Woyke, T., Kyrpides, N. C., Pukall, R., Klenk, H.-P., Goodfellow, M., Göker, M., 2018. Genome-based taxonomic classification of the phylum Actinobacteria. Front. Microbiol. 9, 2007. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02007>
73. Palmer, M., Steenkamp, E. T., Blom, J., Hedlund, B. P., Venter, S. N., 2020. All ANIs are not created equal: Implications for prokaryotic species boundaries and integration of ANIs into polyphasic taxonomy. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 70(4), 2937-2948. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.004124>
74. Parks, D. H., Chuvochina, M., Rinke, C., Mussig, A. J., Chaumeil, P.-A., Hugenholtz, P., 2022. GTDB: An ongoing census of bacterial and archaeal diversity through a phylogenetically consistent, rank normalized and complete genome-

based taxonomy. Nucleic Acids Res. 50(D1), D785-D794.
<https://doi.org/10.1093/nar/gkab776>

75. Parks, D. H., Imelfort, M., Skennerton, C. T., Hugenholtz, P., Tyson, G. W., 2015. CheckM: Assessing the quality of microbial genomes recovered from isolates, single cells, and metagenomes. Genome Res. 25(7), 1043-1055.
<https://doi.org/10.1101/gr.186072.114>
76. Parks, D.H., Chuvochina, M., Chaumeil, P., Rinke, C., Mussig, A.J., Hugenholtz, P., 2019. Selection of representative genomes for 24,706 bacterial and archaeal species clusters provide a complete genome-based taxonomy. BioRxiv.
<https://doi.org/10.1101/771964>
77. Patin, N. V., Duncan, K. R., Dorrestein, P. C., Jensen, P. R., 2016. Competitive strategies differentiate closely related species of marine actinobacteria. ISME J. 10(2), 478-490. <https://doi.org/10.1038/ismej.2015.128>
78. Pavan, M. E., López, N. I., Pettinari, M. J., 2020. Melanin biosynthesis in bacteria, regulation and production perspectives. Appl. Microbiol. Biotechnol. 104(4), 1357-1370. <https://doi.org/10.1007/s00253-019-10245-y>
79. Pinto-Almeida, A., Bauermeister, A., Luppino, L., Grilo, I. R., Oliveira, J., Sousa, J. R., Petras, D., Rodrigues, C. F., Prieto-Davó, A., Tasdemir, D., Sobral, R. G., Gaudêncio, S. P., 2021. The diversity, metabolomics profiling, and the pharmacological potential of Actinomycetes isolated from the Estremadura spur pockmarks (Portugal). Mar. Drugs. 20(1), 21. <https://doi.org/10.3390/md20010021>
80. Preobrazhenskaia, T. P., Lavrova, N. V., Ukholina, R. S., Nechaeva, N. P., 1975. Isolation of new species of the genus *Actinomadura* on selective media with streptomycin and bruneomycin. Antibiotiki. 20(5), 404–409. PMID: 1225188.
81. Qin, S., Li, W. J., Klenk, H. P., Hozzein, W. N., Ahmed, I., 2019. Actinobacteria in special and extreme habitats: diversity, function roles and environmental adaptations. Front. Microbiol. 10, 944. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00944>
82. Racine, J. S., 2012. RStudio: A platform-independent IDE for R and sweave: Software review. J. Appl. Econometrics. 27 (1), 167-172.
<https://doi.org/10.1002/jae.1278>
83. Raina, V., Nayak, T., Ray, L., Kumari, K., Suar, M., 2019. A polyphasic taxonomic approach for designation and description of novel microbial species. In: Das, S., Dash, H.R. (Eds.), Microbial Diversity in the Genomic Era. Academic Press, Reino Unido, pp. 137-152. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814849-5.00009-5>
84. Ramírez-Durán, N., De La Haba, R. R., Vera-Gargallo, B., Sánchez-Porro, C., Alonso-Carmona, S., Sandoval-Trujillo, H., Ventosa, A., 2021. Taxogenomic and comparative genomic analysis of the genus *Saccharomonospora* focused on the identification of biosynthetic clusters PKS and NRPS. Front. Microbiol. 12, 603791.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.603791>
85. Riesco, R., Carro, L., Román-Ponce, B., Prieto, C., Blom, J., Klenk, H.-P., Normand, P., Trujillo, M. E., 2018. Defining the species *Micromonospora*

saelicesensis and *Micromonospora noduli* under the framework of genomics. Front. Microbiol. 9, 1360. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01360>

86. Rio, R. V. M., Lefevre, C., Heddi, A., Aksoy, S., 2003. Comparative genomics of insect-symbiotic bacteria: Influence of host environment on microbial genome composition. Appl. Environ. Microbiol. 69 (11), 6825-6832. <https://doi.org/10.1128/AEM.69.11.6825-6832.2003>
87. Roda-Garcia, J. J., Haro-Moreno, J. M., López-Pérez, M., 2023. Evolutionary pathways for deep-sea adaptation in marine planktonic Actinobacteriota. Front. Microbiol. 14, 1159270. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1159270>
88. Said Hassane, C., Fouillaud, M., Le Goff, G., Sklirou, A. D., Boyer, J. B., Trougakos, I. P., Jerabek, M., Bignon, J., De Voogd, N. J., Ouazzani, J., Gauvin-Bialecki, A., Dufossé, L., 2020. Microorganisms associated with the marine sponge *Scopalina hapalia*: A reservoir of bioactive molecules to slow down the aging process. Microorganisms. 8 (9), 1262. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8091262>
89. Sandmann, G., 2021. Carotenoid biosynthesis in the phylum Actinobacteria. In: Misawa, N. (Ed.), Carotenoids, advances in experimental medicine and biology. Springer Nature, Singapore, pp. 175–181. https://doi.org/10.1007/978-981-15-7360-6_14
90. Satyanarayana, T., Johri, B. N., Das, S. K., 2019. Microbial diversity in ecosystem sustainability and biotechnological applications. In: Satyanarayana, T., Johri, B. N., Das, S. K. (Eds.), Microbial diversity in normal and extreme environments. vol.1. Springer, Singapore. <https://link.springer.com/book/10.1007/978-981-13-8315-1>
91. Schorn, M. A., Alanjary, M. M., Aguinaldo, K., Korobeynikov, A., Podell, S., Patin, N., Lincecum, T., Jensen, P. R., Ziemert, 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. <https://doi.org/10.1099/mic.0.000386>
92. Seemann T., 2017. Shovill: Faster SPAdes assembly of Illumina reads. <https://github.com/tseemann/shovill> (consultado agosto 14, 2019).
93. Seemann, T., 2014. Prokka: Rapid prokaryotic genome annotation. Bioinformatics. 30 (14), 2068-2069. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu153>
94. Seshadri, R., Roux, S., Huber, K. J., Wu, D., Yu, S., Udvary, D., Call, L., Nayfach, S., Hahnke, R. L., Pukall, R., White, J. R., Varghese, N. J., Webb, C., Palaniappan, K., Reimer, L. C., Sardà, J., Bertsch, J., Mukherjee, S., Reddy, T. B. K., Hajek P. P., Huntemann, M., Chen, A. I., Spunde, A., Clum, A., Shapiro, N., Wu, Z. Y., Zhao, Z., Zhou, Y., Evtushenko, L., Thijs, S., Stevens, V., Elie-fradosh, E. A., Mouncey, N. J., Yoshikuni, Y., Whitman, W. B., Klenk, H. P., Woyke, T., Göker, M., Krypides, N. C., Ivanova, N. N., 2022. Expanding the genomic encyclopedia of Actinobacteria with 824 isolate reference genomes. Cell Genom. 2 (12), 100213. <https://doi.org/10.1016/j.xgen.2022.100213>

95. Shayesteh, F., Binti Zakaria, N. S., Usup, G., Ahmad, A., 2020. Evaluation of antimicrobial potentiality and type-I polyketide synthase and nonribosomal peptide synthetase biosynthetic genes from some marine actinomycetes. *J. Microb. World.* 13 (1), 77-86. https://journals.iau.ir/article_673527_7c1075d060cc09ddfa3e1ffab0e82da4.pdf
96. Shivilata, L., Satyanarayana, T., 2015. Thermophilic and alkaliphilic Actinobacteria: Biology and potential applications. *Front. Microbiol.* 6, 1014. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.01014>
97. Siddharth, S., Parida, S., Muniraj, N., Hercules, S., Lim, D., Nagalingam, A., Wang, C., Gyorffy, B., Daniel, J. M., Sharma, D., 2021. Concomitant activation of GLI1 and Notch1 contributes to racial disparity of human triple negative breast cancer progression. *eLife.* 10, e70729. <https://doi.org/10.7554/eLife.70729>
98. Silva, A., Guimarães, L., Ferreira, E., Torres, M. D. C., Da Silva, A., Branco, P., Oliveira, F. A., Silva, G., Wilke, D., Silveira, E., Pessoa, O. D., Jimenez, P., Costa-Lotufo, L., 2016. Bioprospecting anticancer compounds from the marine-derived Actinobacteria *Actinomadura* sp. collected at the Saint Peter and Saint Paul Archipelago (Brazil). *J. Braz. Chem. Soc.* 28, 465-474 <https://doi.org/10.21577/0103-5053.20160297>
99. Silva, G. D. C., Kitano, I. T., Ribeiro, I. A. D. F., Lacava, P. T., 2022. The potential use of actinomycetes as microbial inoculants and biopesticides in agriculture. *Front. Soil Sci.* 2, 833181. <https://doi.org/10.3389/fsoil.2022.833181>
100. Singh, A., Krishnan, K. P., Prabakaran, D., Sinha, R. K., 2017. Lipid membrane modulation and pigmentation: A cryoprotection mechanism in Arctic pigmented bacteria. *J. Basic Microbiol.* 57 (9), 770-780. <https://doi.org/10.1002/jobm.201700182>
101. Siro, G., Pipite, A., Christy, K., Srinivasan, S., Subramani, R., 2022. Marine Actinomycetes associated with stony corals: A potential hotspot for specialized metabolites. *Microorganisms.* 10 (7), 1349. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10071349>
102. Soldatou, S., Eldjárn, G. H., Ramsay, A., Van Der Hooft, J. J. J., Hughes, A. H., Rogers, S., Duncan, K. R., 2021. Comparative metabologenomics analysis of polar Actinomycetes. *Mar. Drugs.* 19 (2), 103. <https://doi.org/10.3390/md19020103>
103. Sosio, M., Gaspari, E., Iorio, M., Pessina, S., Medema, M. H., Bernasconi, A., Simone, M., Maffioli, S. I., Ebright, R. H., Donadio, S., 2018. Analysis of the pseudouridimycin biosynthetic pathway provides insights into the formation of c-nucleoside antibiotics. *Cell Chem. Biol.* 25 (5), 540-549.e4. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2018.02.008>
104. Stackebrandt, E. Ebers, J., 2006. Taxonomic parameters revisited: tarnished gold standards. *Microbiol. Today*, 33, 152.
105. Stephens, R. S., Myers, G., Eppinger, M., Bavoil, P. M., 2009. Divergence without difference: Phylogenetics and taxonomy of *Chlamydia* resolved. *FEMS*

- Immunol. Med. Microbiol. 55 (2), 115-119. <https://doi.org/10.1111/j.1574-695X.2008.00516.x>
106. Tarantini, F. S., Brunati, M., Taravella, A., Carrano, L., Parenti, F., Hong, K. W., Williams, P., Chan, K. G., Heeb, S., Chan, W. C., 2021. *Actinomadura graeca* sp. nov.: A novel producer of the macrocyclic antibiotic zelvomycin. PLOS ONE. 16 (11), e0260413. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0260413>
107. Terlouw, B. R., Blin, K., Navarro-Muñoz, J. C., Avalon, N.E., Chevrette, M. G., Egbert, S., Lee, S., Meijer, D., Recchia, M. J. J., Reitz, Z. L., van Santen, J. A., Selem-Mojica, N., Tørring, T., Zaroubi, L., Alanjary, M., Aleti, G., Aguilar, C., Al-Salihi, S. A. A., Augustijn, H. E., Avelar-Rivas, J. A., Avitia-Domínguez, L. A., Barona-Gómez, F., Bernaldo-Agüero, J., Bielinski, V. A., Biermann, F., Booth, T. J., Carrion-Bravo, V.J., Castelo-Branco, R., Chagas, F. O., Cruz-Morales, P., Du, C., Duncan KR, Gavriilidou A, Gayraud D, Gutiérrez-García K, Haslinger K, Helfrich EJN, van der Hooft, J. J. J., Jati, A. P., Kalkreuter, E., Kalyvas, N., Kang, K. B., Kautsar, S., Kim, W., Kunjapur, A. M., Li, Y. X., Lin, G. M., Loureiro, C., Louwen, J. J. R., Louwen, N. L. L., Lund, G., Parra, J., Philmus, B., Pourmohsenin, B., Pronk, L. J. U., Rego, A., Rex, D. A. B., Robinson, S., Rosas-Becerra, L.R., Roxborough, E.T., Schorn, M.A., Scobie, D.J., Singh, K.S., Sokolova, N., Tang, X., Udway, D., Vigneshwari, A., Vind, K., Vromans, S. P. J. M., Waschulin, V., Williams, S. E., Winter, J. M., Witte, T. E., Xie, H., Yang, D., Yu, J., Zdouc, M., Zhong, Z., Collemare, J., Linington, R.G., Weber, T., Medema, M.H., 2023. MIBiG 3.0: a community-driven effort to annotate experimentally validated biosynthetic gene clusters. Nucleic Acids Res. 51 (D1), D603-D610, <https://doi.org/10.1093/nar/gkac1049>
108. Thompson, D., Cognat, V., Goodfellow, M., Koechler, S., Heintz, D., Carapito, C., Van Dorsselaer, A., Mahmoud, H., Sangal, V., Ismail, W., 2020. Phylogenomic classification and biosynthetic potential of the fossil fuel-biodesulfurizing *Rhodococcus* strain IGTS8. Front. Microbiol. 11, 1417. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01417>
109. Torres-Beltrán, M., Cardoso-Martínez, F., Millán-Aguíñaga, N., Becerril-Espinosa, A., Soria-Mercado, I., 2012. Evaluation of the Gulf of California as a potential source of bioactive marine actinobacteria. Cienc. Mar. 38 (4), 609-624. <https://doi.org/10.7773/cm.v38i4.2131>
110. Traxler, M. F., Kolter, R., 2015. Natural products in soil microbe interactions and evolution. Nat. Prod. Rep. 32 (7), 956–970. <https://doi.org/10.1039/c5np00013k>
111. Tuttle, R. N., Demko, A. M., Patin, N. V., Kapon, C. A., Donia, M. S., Dorrestein, P., Jensen, P. R., 2019. Detection of natural products and their producers in ocean sediments. Appl. Environ. Microbiol. 85 (8), e02830-18. <https://doi.org/10.1128/AEM.02830-18>
112. Van Bergeijk, D. A., Terlouw, B. R., Medema, M. H., Van Wezel, G. P., 2020. Ecology and genomics of Actinobacteria: New concepts for natural product discovery. Nat. Rev. Microbiol. 18(10), 546-558. <https://doi.org/10.1038/s41579-020-0379-y>

113. Van Der Lee, T. A. J., Medema, M. H., 2016. Computational strategies for genome-based natural product discovery and engineering in fungi. *Fungal Genet. Biol.* 89, 29-36. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2016.01.006>
114. Van Lanen, S. G., Oh, T., Liu, W., Wendt-Pienkowski, E., Shen, B., 2007. Characterization of the maduropeptin biosynthetic gene cluster from *Actinomadura madurae* ATCC 39144 supporting a unifying paradigm for enediyne biosynthesis. *J. Am. Chem. Soc.* 129(43), 13082-13094. <https://doi.org/10.1021/ja073275o>
115. Von Meijenfeldt, F. B., Arkhipova, K., Cambuy, D. D., Coutinho, F. H., Dutilh, B. E., 2019. Robust taxonomic classification of uncharted microbial sequences and bins with CAT and BAT. *Genome Biol.* 20, 217. <https://doi.org/10.1186/s13059-019-1817-x>
116. Wang, J. T., Shi, T. T., Ding, L., Xie, J., Zhao, P. J., 2023. Multifunctional Enzymes in Microbial Secondary Metabolic Processes. *Catalysts.* 13 (3), 581. <https://doi.org/10.3390/catal13030581>
117. Wang, Z., Xu, Y., Shao, J., Wang, J., Li, R., 2011. Genes associated with 2-methylisoborneol biosynthesis in Cyanobacteria: Isolation, characterization, and expression in response to light. *PLOS ONE.* 6 (4), e18665. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0018665>
118. Weber, T., Charusanti, P., Musiol-Kroll, E. M., Jiang, X., Tong, Y., Kim, H. U., Lee, S. Y., 2015. Metabolic engineering of antibiotic factories: new tools for antibiotic production in actinomycetes. *Trends Biotechnol.* 33 (1). 15–26. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2014.10.009>
119. Wickham, H., Chang, W., Wickham, M. H., 2016. ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis. Springer-Verlag, Nueva York. <https://ggplot2.tidyverse.org/>
120. Xie, Y., Elsheikh, M., 2022. Polyketides and terpenes in marine microalgae: Ecological roles and mechanisms of biosynthesis. *J. Mar. Sci. Technol.* 30(1). <https://doi.org/10.51400/2709-6998.2566>
121. Xu, D., Nepal, K. K., Chen, J., Harmody, D., Zhu, H., McCarthy, P. J., Wright, A. E., Wang, G., 2018. Nocardiopeptidins A-C: New angucyclines with anti-MRSA activity isolated from a marine sponge-derived *Nocardiopeptidopsis* sp. HB-J378. *Synth. Syst. Biotechnol.* 3(4), 246-251. <https://doi.org/10.1016/j.synbio.2018.10.008>
122. Yang, X., Zhu, Z. H., Ji, X., Liu, Z. M., Zhang, H., Wei, B., 2021. Complete genome sequence of *Micromonospora craniellae* LHW63014T, a potential metal ion-chelating agent producer. *Mar. Genom.* 57, 100830. <https://doi.org/10.1016/j.margen.2020.100830>
123. Yassin, A. F., Galinski, E. A., Wohlfarth, A., Jahnke, K. D., Schaal, K. P., Truper, H. G., 1993. A New actinomycete species, *Nocardiopeptidopsis lucentensis* sp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 43 (2), 266-271. <https://doi.org/10.1099/00207713-43-2-266>
124. Yoon, S. H., Ha, S. M., Kwon, S., Lim, J., Kim, Y., Seo, H., Chun, J., 2017. Introducing EzBioCloud: A taxonomically united database of 16S rRNA gene

- sequences and whole-genome assemblies. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 67(5), 1613-1617. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.001755>
125. Zamora-Quintero, A. Y., Torres-Beltrán, M., Guillén-Matus, D. 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). <https://doi.org/10.1099/mic.0.001144>
126. Zhang, D., Lu, Y., Chen, H., Wu, C., Zhang, H., Chen, L., Chen, X., 2020. Antifungal peptides produced by actinomycetes and their biological activities against plant diseases. *J. Antibiot.* 73 (5), 265-282. <https://doi.org/10.1038/s41429-020-0287-4>
127. Zhang, F., Braun, D. R., Chanana, S., Rajski, S. R., Bugni, T. S., 2019. Phallusialides A–E, pyrrole-derived alkaloids discovered from a marine-derived *Micromonospora* sp. bacterium using MS-based metabolomics approaches. *J. Nat. Prod.* 82 (12), 3432-3439. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.9b00808>
128. Zhang, T., Li, L., Song, L., Chen, W., 2009. Effects of temperature and light on the growth and geosmin production of *Lyngbya kuetzingii* (Cyanophyta). *J. Appl. Phycol.* 21 (3), 279-285. <https://doi.org/10.1007/s10811-008-9363-z>
129. Zhang, Z., In, Y., Fukaya, K., Yang, T., Harunari, E., Urabe, D., Imada, C., Oku, N., Igarashi, Y., 2022. Kumemycinones A–G, cytotoxic angucyclinones from a deep sea-derived actinomycete of the genus *Actinomadura*. *J. Nat. Prod.* 85 (4), 1098-1108. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.1c01205>
130. Zhang, Z., Kudo, T., Nakajima, Y., Wang, Y., 2001. Clarification of the relationship between the members of the family Thermomonosporaceae on the basis of 16S rDNA, 16S-23S rRNA internal transcribed spacer and 23S rDNA sequences and chemotaxonomic analyses. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 51 (2), 373-383. <https://doi.org/10.1099/00207713-51-2-373>
131. Zhang, Z., Wang, J., Wang, J., Wang, J., Li, Y., 2020. Estimate of the sequenced proportion of the global prokaryotic genome. *Microbiome*. 8 (1), 134. <https://doi.org/10.1186/s40168-020-00903-z>

MATERIAL SUPLEMENTARIO

Tabla S1. Delimitación de las especies de las 12 actinobacterias por gen 16S RNAr, ANI y dDDH

Table S1. Species delimitation of the 12 actinobacteria by 16S rRNA, ANI and dDDH gene

Muestra	Gen 16S RNAr			ANI			dDDH		
	Género	Especie	%	Género	Especie	%	Género	Especie	%
LOL-12	<i>Nocardiopsis</i>	<i>fildesensis</i> *	99.73%	<i>Nocardiopsis</i>	sp. CNT312	95.16	<i>Nocardiopsis</i>	sp. CNT312	61.30
LOL-11	<i>Actinomadura</i>	<i>cremea</i>	99.93%	<i>Actinomadura</i>	<i>cremea</i>	97.26	<i>Actinomadura</i>	<i>cremea</i>	76.70
LOL-16	<i>Actinomadura</i>	<i>cremea</i>	99.93%	<i>Actinomadura</i>	<i>cremea</i>	97.27	<i>Actinomadura</i>	<i>cremea</i>	76.60
LOL-24	<i>Micromonospora</i>	<i>phaseoli</i>	99.72%	<i>Micromonospora</i>	<i>phaseoli</i>	92.18	<i>Micromonospora</i>	<i>phaseoli</i>	46.90
LOL-25	<i>Micromonospora</i>	<i>citrea</i>	99.79%	<i>Micromonospora</i>	<i>echinofusca</i>	93.43	<i>Micromonospora</i>	<i>echinofusca</i>	50.50
LOL-13	<i>Micromonospora</i>	<i>spongicola</i> *	99.93%	<i>Micromonospora</i>	<i>pattaloongensis</i>	80.56	<i>Micromonospora</i>	<i>pattaloongensis</i>	21.60
LOL-14	<i>Micromonospora</i>	<i>spongicola</i> *	99.93%	<i>Micromonospora</i>	<i>pattaloongensis</i>	80.51	<i>Micromonospora</i>	<i>pattaloongensis</i>	21.60
LOL-15	<i>Micromonospora</i>	<i>spongicola</i> *	99.93%	<i>Micromonospora</i>	<i>pattaloongensis</i>	80.61	<i>Micromonospora</i>	<i>pattaloongensis</i>	21.60
LOL-21	<i>Micromonospora</i>	<i>spongicola</i> *	99.93%	<i>Micromonospora</i>	<i>halophytica</i>	80.52	<i>Micromonospora</i>	<i>halophytica</i>	21.50
LOL-23	<i>Micromonospora</i>	<i>spongicola</i> *	99.51%	<i>Micromonospora</i>	<i>deserti</i>	80.29	<i>Micromonospora</i>	<i>deserti</i>	21.80
LOL-27	<i>Micromonospora</i>	<i>spongicola</i> *	99.93%	<i>Micromonospora</i>	<i>pattaloongensis</i>	80.54	<i>Micromonospora</i>	<i>pattaloongensis</i>	21.60
LOL-28	<i>Micromonospora</i>	<i>spongicola</i> *	99.93%	<i>Micromonospora</i>	<i>pattaloongensis</i>	80.59	<i>Micromonospora</i>	<i>pattaloongensis</i>	21.70

*Secuencias de genomas completos que no se encuentran en las bases de datos. % = Porcentaje de similitud

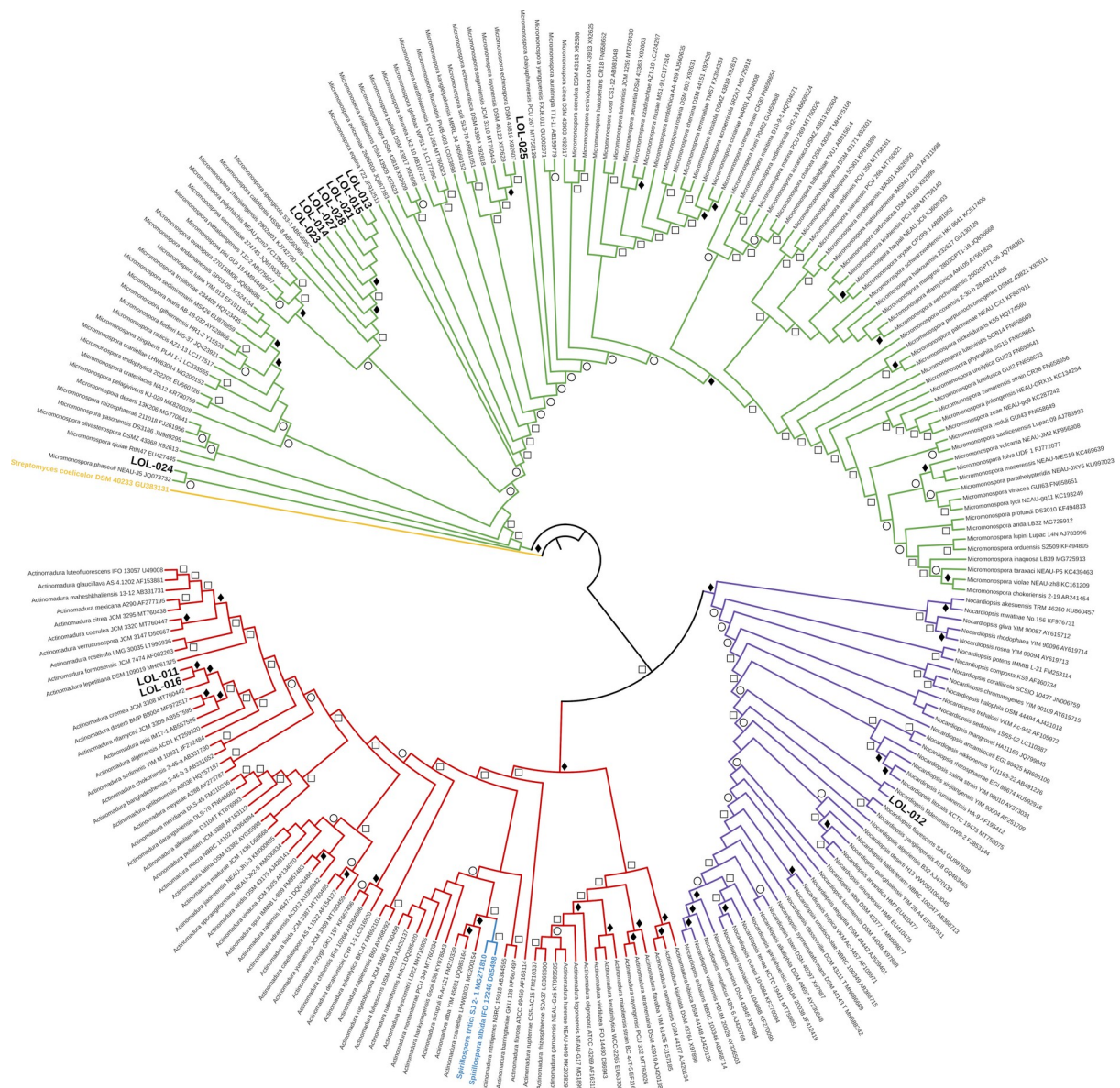


Fig. S2. Árbol filogenético de máxima verosimilitud basado en el análisis del 16S ARNr con 229 cepas tipo generado con 1000 iteraciones. Los rombos negros indican los valores de soporte de las ramas 100%, los cuadrados sin relleno indican valores de soporte de ramas de 80-99% y los círculos sin relleno indican valores de soporte de ramas de 50-79%. En color morado se muestran las bacterias del género *Nocardiopsis*, en color rojo las bacterias del género *Actinomadura* y en color azul las bacterias del género *Spirillospora*, en color verde las bacterias del género *Micromonospora* y en color amarillo se muestra el grupo externo *Streptomyces coelicolor*.

Fig. S2. Maximum likelihood phylogenetic tree based on 16S rRNA analysis with 229 type strains generated with 1000 iterations. Black diamonds indicate 100% branch support values, unfilled squares indicate branch support values of 80-99% and unfilled circles indicate branch support values of 50-79%. Bacteria of the genus *Nocardiopsis* are shown in purple, bacteria of the genus *Actinomadura* are shown in red, bacteria of the genus *Spirillospora* are shown in blue, bacteria of the genus *Micromonospora* are shown in green and the outgroup *Streptomyces coelicolor* is shown in yellow.

Capítulo 4.- Genes de estrés y genes de adaptación al medio marino

1. Introducción

El medio ambiente marino presenta un conjunto de variables fisicoquímicas que requieren adaptaciones especializadas de los organismos que lo habitan (Qin *et al.*, 2019). A diferencia de los entornos terrestres, el medio marino se caracteriza por altos niveles de sal, presión y disponibilidad de oxígeno, así como temperaturas fluctuantes y disponibilidad de nutrientes (Saadouli *et al.*, 2022; Qin *et al.*, 2019; Yaradoddi and Konto, 2022). En los últimos años, el medio ambiente marino ha tomado protagonismo debido a que alberga una gran variedad de microorganismos, entre ellos las actinobacterias, que a través de la presión y selección han desarrollado adaptaciones específicas como la expresión de genes de adaptación y respuesta ante distintos tipos de estrés y condiciones fisicoquímicas (Poli *et al.*, 2017; Gribble, 2015; Saadouli *et al.*, 2022; Torres-Beltrán *et al.*, 2012; Yaradoddi and Konto, 2022). Por ejemplo, han desarrollado mecanismos genéticos específicos para hacer frente a condiciones como altas temperaturas, elevada salinidad y la disponibilidad limitada de nutrientes (Yaradoddi and Konto, 2022).

La clave de la adaptación de las actinobacterias marinas a las condiciones ambientales marinas radica en la expresión y regulación de genes específicos. Estudios genómicos y transcriptómicos han revelado un repertorio de genes asociados con la síntesis de compuestos osmoprotectores, la resistencia a la radiación ultravioleta, y la capacidad de metabolizar sustratos presentes en ambientes marinos (Fuchino *et al.*, 2017; McParland *et al.*, 2021; Meena *et al.*, 2020; Rasuk *et al.*, 2017). Por lo que, las actinobacterias poseen complejas redes regulatorias que controlan diversos procesos adaptativos que están relacionadas con la producción de metabolitos secundarios (van der Meij *et al.*, 2017). Entre los genes cruciales identificados se encuentran aquellos implicados en la síntesis de osmoprotectores, como la trehalosa (*treY*), prolina (*proP*), betaína (*betA*) y ectoína (*ect*) que actúa como regulador del equilibrio osmótico interno. Además, la presencia de sistemas de reparación de ADN (*adnK*) y la expresión de proteínas antioxidantes

revelan estrategias adaptativas para contrarrestar el estrés oxidativo inducido por factores abióticos (von Rosen *et al.*, 2021). Un ejemplo de lo anterior, es la regulación ejercida por el segundo mensajero guanosina pentafofato (p)ppGpp, que tiene una participación importante en la regulación del ciclo de vida de los actinomicetos. La acumulación del (p)ppGpp induce una respuesta contra el estrés nutricional regulando diversos procesos conservados en las bacterias, como la biosíntesis de aminoácidos, síntesis de ARNr y ARNt, resistencia a antibióticos, virulencia de patógenos, persistencia a largo plazo, competencia y formación de biopelículas; a su vez, la (p)ppGpp se ha encontrado que tiene efectos reguladores sobre la biosíntesis de antibióticos en las actinobacterias del género *Saccharopolyspora* (van der Meij *et al.*, 2017; Xu *et al.*, 2018). Así que la comprensión detallada de la función y regulación de estos genes en las actinobacterias marinas no solo puede contribuir a la apreciación de la adaptabilidad microbiana, sino que también tiene implicaciones importantes durante la síntesis de compuestos naturales y la bioprospección de moléculas con potencial farmacológico y biotecnológico.

2. Objetivo

Evaluar la presencia de genes relacionados con la respuesta al estrés y la adaptación al medio marino en 12 genomas de actinobacterias aisladas de sedimento de la Laguna Ojo de Liebre, México.

3. Metodología

3.1. Selección de genes relacionados con el estrés y adaptación al ambiente marino

Para identificar los genes que se han encontrado asociados al estrés y la adaptación marina se realizó una búsqueda en la literatura. Se encontraron un total de 20 genes de diferentes clases incluyendo estrés oxidativo, estrés osmótico, choque térmico, detección de inanición, sensibles al redox y absorción de hierro (Tabla I). Posteriormente, se llevó a cabo una consulta en las bases de datos de NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) e InterPro (<https://www.ebi.ac.uk/interpro/>) de la disponibilidad de las secuencias de estos genes para descargarlas y para la obtención del número identificador que asigna pfam a las secuencias.

Tabla I. Listado de genes de estrés y genes de adaptación al ambiente marino

	Clase
<i>betA</i> (oxygen dependent choline dehydrogenase)	Estrés oxidativo
<i>oxyR</i> (hydrogen peroxide-inducible genes activator)	
<i>hmpA</i> (flavohemoprotein)	
<i>soxR</i> (redox-sensitive transcriptional activator)	
<i>soxS</i> (redox sensitive transcriptional regulator)	
<i>SOD</i> (superoxide dismutase)	
<i>ectC</i> (L-ectoine synthase)	Estrés osmótico
<i>chdH</i> (choline dehydrogenase)	
<i>proP</i> (osmosensory transporter coiled coil)	
<i>stpA</i> (glucosylglycerol-phosphate phosphatase)	
<i>otsA</i> (trehalose-6-phosphate synthase)	
<i>treY</i> (trehalose)	
<i>BTCC</i> (betaine transporter)	Choque térmico
<i>dnaK</i> (heat shock protein) (chaperone)	
<i>grpE</i> (nucleotide exchange factor)	
<i>hrcA</i> (heat-inducible transcription repressor)	Detección de inanición
<i>rspA</i> (starvation sensing protein)	
(p)ppGpp (guanosine pentaphosphate)	Sensibles al redox
<i>rex</i> (redox-sensing transcriptional repressor)	
<i>fur</i> (ferric uptake regulator family)	Absorción de hierro

3.2. Evaluación de la presencia de genes de estrés y adaptación al ambiente marino en los genomas de actinobacterias

Para identificar la presencia de genes relacionados con la respuesta al estrés y adaptación al ambiente marino, se realizó la búsqueda de los genes seleccionados (Tabla I) en los 12 genomas de actinobacterias siguiendo dos aproximaciones: 1) se realizó una búsqueda considerando las anotaciones de los marcos de lectura de los genomas utilizando el número de identificación que asigna la base de datos PFAM a las proteínas y 2) se realizó un alineamiento BLAST con las secuencias completas

de los marcos de lectura identificados en los genomas, previamente traducidas de aminoácidos a nucleótidos, y la base de datos de las secuencias de referencia. El objetivo del BLAST fue maximizar la búsqueda de genes y no subestimar su presencia en caso de que no fueran identificados por número PFAM. Para la generación de la base de datos de referencia se consideró como parámetro de selección de secuencias un rango de longitud que fuera representativo de la mayor cantidad de información a comparar entre las secuencias. El rango de longitud, considerando la diversidad del tamaño de los genes, fue de entre 324 - 1839 pb. Para el análisis de BLAST se utilizó la opción *blastn* con los parámetros por defecto y se consideraron las asignaciones con base en el porcentaje de identidad (>80%), cobertura del gen a consultar (>70%) y el valor-e (<0.05).

Para poder evaluar y comparar la presencia de los genes identificados en los genomas, se realizaron dos matrices de ausencia y presencia: 1) con los resultados obtenidos mediante el análisis de anotaciones por número PFAM y 2) con los resultados del alineamiento BLAST. Los resultados se concatenaron y se obtuvo una única matriz de ausencia/presencia la cual se representó visualmente por tipo de genes de estrés. Para integrar los resultados obtenidos, se elaboraron dos matrices de ausencia y presencia. La primera matriz se basó en la filtración por número PFAM. La segunda matriz se derivó de los alineamientos BLAST. Posteriormente, se combinaron los resultados de ambas matrices para obtener una única matriz de ausencia/presencia. Esta matriz final se organizó según el tipo de genes de estrés, genoma y estación de aislamiento, y se representó de manera visual para proporcionar una representación clara y ordenada de los datos obtenidos.

4. Resultados

4.1. Comparación de los genes en los 12 genomas de actinobacterias

El análisis de las comparaciones de los genomas realizados siguiendo ambas aproximaciones, mostró la presencia de genes relacionados con el estrés y la adaptación al ambiente marino, dentro de las siguientes categorías: estrés oxidativo, osmótico, choque térmico, detección de inanición y captación de hierro. De manera

general, se observaron diferencias en el porcentaje de coincidencias identificadas entre las secuencias de los genomas y la base de datos de referencia. El genoma LOL-012 del género *Nocardiopsis* mostró un 56% de coincidencias con los genes seleccionados, mientras que los genomas LOL-011 y LOL-016 del género *Actinomadura* presentaron un 61%, compartiendo el mismo patrón de presencia entre ambos genomas (Fig. 1). En comparación, los genomas del género *Micromonospora* mostraron diferentes porcentajes de coincidencias y patrones de presencia de genes en relación a los subclados observados para este género (Fig. 1). Por ejemplo, los genomas LOL-013, LOL-014, LOL-015, LOL-021, LOL-023, LOL-027 y LOL-028 del clado “a” presentaron un rango de coincidencias entre el 28% y el 39%. El genoma LOL-024 del clado “b” y el genoma LOL-025 del grupo “c” mostraron un 39% de coincidencias cada uno. Finalmente, los genomas LOL-013, LOL-014, LOL-027 y LOL-028 mostraron el mismo patrón de presencia de los genes observados, lo que representa un 30% de coincidencias (Fig. 1).

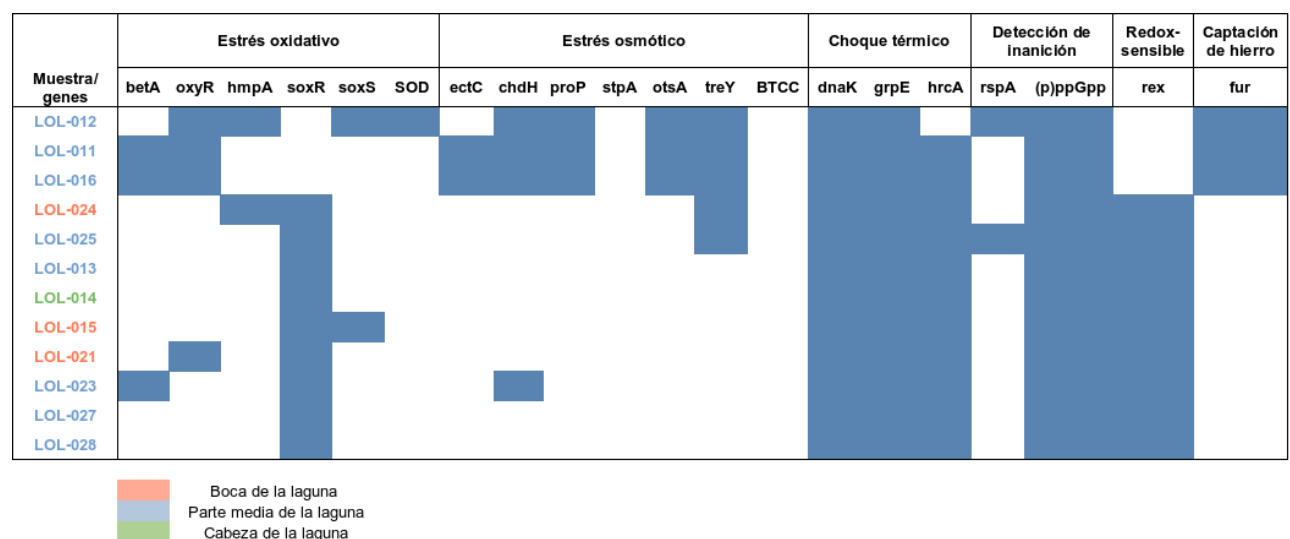


Figura 1. Matriz de ausencia/presencia de genes de estrés, genes de adaptación al ambiente marino y partes de aislamiento dentro de la laguna Ojo de Liebre.

Además, para las distintas categorías, se observaron patrones de presencia en relación a los géneros de actinobacterias a los que corresponden. Referente a los genes de estrés oxidativo, se analizaron y compararon un total de seis genes: *betA*, *oxyR*, *hmpA*, *soxR*, *soxS* y *SOD* (Tabla I), los cuales se encontraron presentes en los genomas con una distribución diferenciada para cada género. Por ejemplo, el genoma LOL-012 del género *Nocardiopsis* presentó solo cuatro genes (*oxyR*, *hmpA*,

soxS, *SOD*). En contraste, ambos genomas de *Actinomadura*, LOL-011 y LOL-016, contaron con dos de estos (*betA* y *oxyR*). Mientras que los genomas del *Micromonospora* contaron con un total de cinco genes (*betA*, *oxyR*, *hmpA*, *soxS*, *SOD*). Cabe destacar que el gen *soxR* se encontró representado en todos los genomas de este género. Así como los genes *soxS* y *oxyR* solo se encontraron en dos genomas de este género (LOL-015 y LOL-021), y el gen *hmpA* solo en el genoma de LOL-024. Además, el genoma LOL-023 se destacó por la presencia de el gen *betA*, que no se encontraron en otros genomas de este género. También cabe destacar que dentro de este género los genomas LOL-025, LOL-013, LOL-014, LOL-027 y LOL-028 contaron con solo un gen en esta categoría (*soxR*), mientras que, algunos genomas contaron con dos genes, el genoma LOL-024 (*hmpA* y *soxR*), LOL-015 (*soxR* y *soxS*), LOL-021 (*oxyR* y *soxR*) y LOL-023 (*betA* y *soxR*).

Para la categoría de estrés osmótico, se analizaron un total de siete genes: *ectC*, *chdH*, *proP*, *ggpP*, *otsA*, *treY* y *BTCC* (Tabla I). Los genes de esta categoría no se encontraron presentes en todos los genomas analizados, se destacaron los genomas de los géneros *Actinomadura* y *Nocardiopsis*. El genoma LOL-012 de *Nocardiopsis* contó solo con cuatro genes (*chdH*, *proP*, *otsA*, *treY*), mientras que ambos genomas de *Actinomadura*, LOL-011 y LOL-016, contaron con cinco genes (*ectC*, *chdH*, *proP*, *otsA*, *treY*). Para el género *Micromonospora*, se observó que solo los genomas LOL-024 y LOL-025 solo contaron con la presencia del gen *treY*, y LOL-023 con la del gen *chdH*.

Con respecto a los genes relacionados con el choque térmico, se utilizaron tres genes: *dnaK*, *grpE* y *hrcA* (Tabla I), los cuales fueron identificados en 11 de los 12 genomas analizados. En el genoma LOL-012 de *Nocardiopsis* se observaron los genes *dnaK* y *grpE*, mientras que en todos los genomas de *Actinomadura* y *Micromonospora* estuvieron los tres genes representativos de esta categoría. Para evaluar la detección de inanición se utilizaron dos genes: *rspA* y (p)*ppGpp* (Tabla I). El gen (p)*ppGpp* se encontró presente en los 12 genomas analizados, mientras que en el gen *rspA* se encontró únicamente en los genomas LOL-012 y LOL-025 perteneciente a los géneros *Nocardiopsis* y *Micromonospora*, respectivamente. Además, se identificaron los genes *rex* y *fur*, que están relacionados con la sensibilidad redox y la captación de hierro, respectivamente (Tabla I). El gen *fur* se

encontró únicamente en los genomas LOL-012, LOL-011 y LOL-016 de los géneros *Nocardiopsis* y *Actinomadura*, respectivamente. Mientras que el gen *rex* se encontró presente en todos los genomas del género *Micromonospora*.

4.2. Distribución de los genomas y genes de estrés en la Laguna Ojo de Liebre, BCS, México

Los 12 genomas se encontraron distribuidos a lo largo y ancho de la Laguna Ojo de Liebre, desde la boca, pasando por la central y por último la cabeza de la laguna. La Fig. 2A muestra que en la parte de la cabeza se encontraron 3 genomas, correspondientes a LOL-015 en la estación 2, LOL-021 en la estación 1 y LOL-024 en la estación 4. En la parte media o central de la laguna se encontraron la mayoría de los genomas, Los cuales son LOL-012, LOL-023, LOL-027 en la estación 6; LOL-011, LOL-016, LOL-025 en la estación 3, LOL-028 en la estación 7 y LOL-013 en la estación 8. y finalmente el genoma LOL-014 en la estación 9. Todos los genomas se encontraron distribuidos en diferentes estaciones y no hubo un patrón que pudiera ser asociado con la distribución encontrada filogenómicamente. Por otra parte, la adaptación y distribución de los genes en los genomas de este estudio si se puede extrapolar a las estaciones de muestreo (Fig. 2). Esto se puede observar en el número de genes por categoría en las diferentes estaciones (Figura 2B). Dicha gráfica muestra el número de genes encontrados por estación, así como también cuantos de estos genes estuvieron presentes en cada una de las estaciones. Las estaciones 3 y 6 son las que cuentan mayor variedad y cantidad de genes de todo el estudio. Siendo la estación 3 la que mayor número de genes tuvo (32) de todo el estudio. En estas estaciones se observaron en ellas todas las categorías de genes relacionados al estrés y a la adaptación al medio marino. Mientras, que en las estaciones 1, 2, 4, 6, 7 y 8 el número de genes y la variedad de categorías de estos fue menor

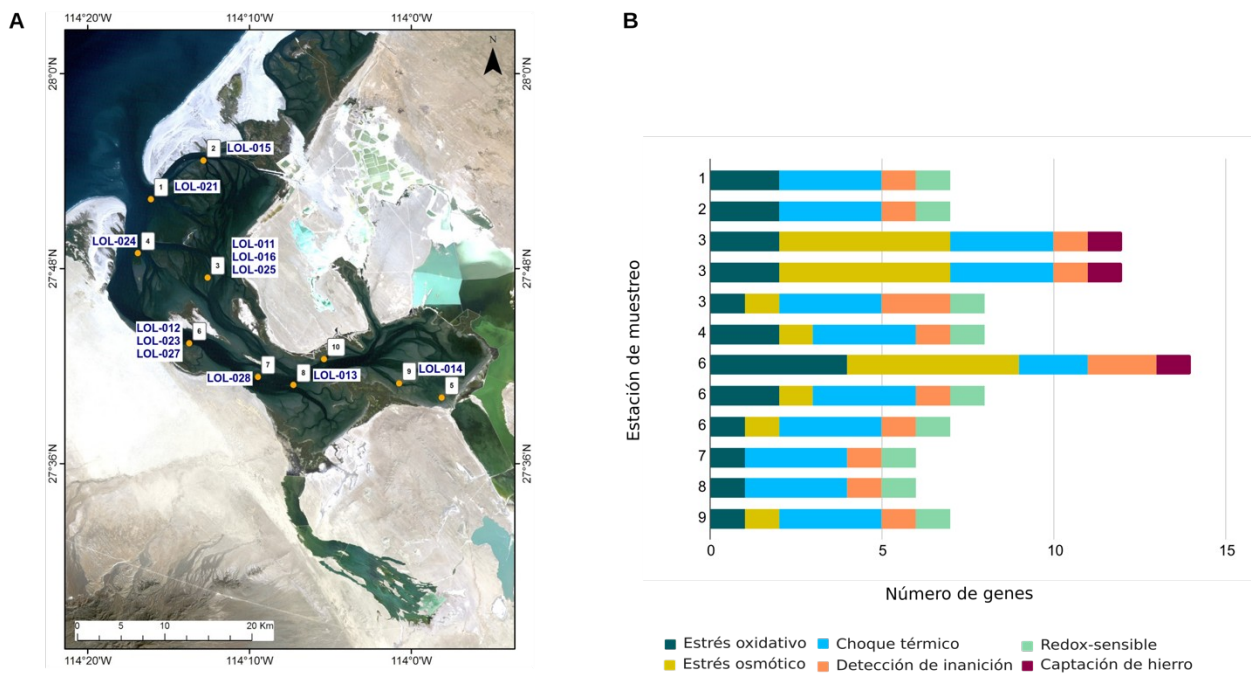


Figura. 2. Distribución de genes de estrés y adaptación al medio marino en la Laguna Ojo de Liebre, BCS, México. A) Localización de cada estación (puntos amarillos) de muestreo junto a las cepas aisladas en esa estación (imagen modificada de la tesis de Zamora-Quintero, 2019). B) gráfica de barras donde muestra el número de genes y tipo de genes de estrés detectados por estación. En color verde-aqua, genes de estrés oxidativo; en color azul-claro, genes de choque térmico; en color salmón, genes de detección de inanición; en color amarillo, genes de éstres osmotico; en color verde-menta, genes sensibles al redox; en color magenta; genes de absorción férrica.

5. Discusión

En este capítulo, se evaluó la presencia y distribución de genes relacionados con el estrés y la adaptación al ambiente marino en los genomas de actinobacterias aisladas de sedimentos de la laguna Ojo de Liebre. Los resultados muestran que los genomas tuvieron coincidencias con la base de datos generada, lo que sugiere que estos microorganismos poseen respuestas adaptativas a condiciones ambientales específicas como: sensibilidad a la disponibilidad de nutrientes así como variaciones ambientales como cambios en temperatura, salinidad y radiación UV. Los patrones

observados sugieren adaptaciones genéticas específicas en función del género y destaca la complejidad de las estrategias adaptativas en estas bacterias marinas.

El medio ambiente marino se caracteriza por la elevada producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) como resultado del metabolismo aeróbico (Kim and Gadd, 2019). En bacterias marinas, el estrés oxidativo además puede conducir a la formación de estructuras de resistencia como esporas que les permita sobrevivir a condiciones ambientales adversas (Baez and Shiloach, 2014; Marquis, 2004; Memar et al., 2018). La capacidad de las esporas de Actinobacteria para resistir factores de estrés ambiental se debe a mecanismos de protección específicos. Estos incluyen la presencia de trehalosa y proteínas asociadas a los nucleoides, que salvaguardan el material genético del daño oxidativo (Beskrovnaya et al., 2021). Aunque la cubierta de la spora no es completamente impermeable, permite la entrada controlada de germinantes que activan la germinación cuando las condiciones se vuelven favorables (Behera y Das, 2023). Esto resalta la relevancia evolutiva de la esporulación como una estrategia de supervivencia en Actinobacteria (Behera y Das, 2023; Beskrovnaya et al., 2021). Además, de este tipo de estructuras de supervivencia, genómicamente también se pueden encontrar diversos mecanismos que resulten en la detección de moléculas y que regulen la respuesta celular para prevenir o mitigar daños por estrés oxidativo. Existen ambientes que crean un entorno propicio para la producción y acumulación de especies reactivas del oxígeno. Tal es el caso de las lagunas hipersalinas costeras que se encuentran influenciados por una gran variedad de factores físicoquímicos (Gutierrez-Galindo et al., 2007). Dichos factores son característicos de la Laguna Ojo de Liebre, los cuales influyen significativamente en los niveles de estrés oxidativo de los organismos acuáticos. Entre los factores clave se encuentran la salinidad, la temperatura, el pH y la presencia de metales traza disueltos, cada uno de los cuales contribuye a la salud general del ecosistema y de los organismos que lo habitan (Valdivieso-ojeda et al., 2021; Walter et al., 2021).

En este estudio, se observaron genes asociados a la respuesta al estrés oxidativo resaltando *soxS*, *oxyR*, *hmpA* y *betA* en los genomas de *Nocardiopsis*, *Actinomadura* y *Micromonospora* (LOL-015, LOL-021 y LOL-023, respectivamente). En específico, se ha propuesto que el sistema regulador SoxRS está relacionado

con la detección de moléculas redox activas como la actinorrodina en cepas de *S. coelicolor*, induciendo una función protectora contra estas moléculas. Además, su función es asegurar que las células tengan una diferenciación y producción de metabolitos secundarios adecuadas y eficientes (Jung-Ho *et al.*, 2011). De manera similar, se ha reportado para el gen *oxyR* una función como sensor de peróxido, el cual solo había sido estudiado en el género *Streptomyces* (den Hengst and Buttner, 2008). Recientemente, se ha comenzado a reportar la presencia de este gen en diferentes géneros incluyendo *Arthrobacter*, *Rhodococcus*, *Streptomyces*, *Nocardia* y *Microbacterium* con el potencial de ser utilizado en la biorremediación de diferentes contaminantes como: pesticidas, hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs) y metales pesados (Behera and Das, 2023). Además, el gen *hmpA* (flavohemoglobina), se encuentra relacionado con la respuesta al estrés nitroxido-sensitivo (Yukioka *et al.*, 2016). Se ha encontrado mediante el modelo más estudiado del ciclo del óxido nítrico en *Streptomyces coelicolor*, que la flavohemoglobina desempeña un papel crucial en el ciclo del óxido de nitrógeno al convertir el óxido nítrico en nitrato, con un mecanismo de retroalimentación finamente sintonizado para regular la producción de flavohemoglobina en función de la concentración de óxido nítrico (Chater, 2016; Crack *et al.*, 2015; Sasaki *et al.*, 2016). Además, la enzima colina deshidrogenasa, codificada por el gen *betA*, juega un papel crucial en el metabolismo de la colina y recientemente se ha reportado que se encuentra asociada a la membrana celular y contiene una flavina, lo que indica que dona electrones a la cadena respiratoria (Breisch *et al.*, 2022; Guillot *et al.*, 2000). En combinación, la presencia de estos genes sugiere que las actinobacterias de los géneros estudiados son sensibles al estrés osmótico y oxidativo, y que es a través de la expresión de éstos que puede haber distintos mecanismos utilizados para la supervivencia en ambientes en donde ocurren gradientes fisicoquímicos y actividad biológica que favorece el estrés oxidativo (Dalmaso *et al.*, 2015). Actualmente, existen pocos estudios en Actinobacterias sobre la actividad de estos mecanismos antioxidantes y su potencial importancia en la adaptación a ambientes hypersalinos costeros como la Laguna Ojo de Liebre.

Otro de los potenciales estresores ambientales relevantes para la laguna es el estrés osmótico. La capacidad de los microorganismos para adaptarse a condiciones fluctuantes de salinidad es un aspecto fundamental de su supervivencia

y proliferación para el ambiente marino (van de Guchte et al., 2002). En los resultados obtenidos, se observaron ciertos genes asociados a la respuesta al estrés osmótico en los genomas de los tres géneros de actinobacterias estudiados. Se destaca la presencia de los genes *treY* y *chdH* en los genomas de las cepas LOL-024 y LOL-025 de *Micromonospora*, así como en los genomas de *Actinomadura* LOL-011 y LOL-016) y *Nocardiopsis* (LOL-012) (Rudulier et al., 1984). Se cree que estos genes desempeñan un papel en la respuesta celular al estrés osmótico, ya que están relacionados con la producción de moléculas osmoprotectoras que ayudan a mantener la integridad celular en condiciones de limitación de agua (Zhang et al., 2018). Por ejemplo, la regulación positiva de genes implicados en la producción de osmoprotectores, como la betaína y la prolina, es una estrategia adaptativa común observada en microorganismos expuestos a estrés osmótico (Rudulier et al., 1984). Además, la expresión alterada de transportadores de membrana, incluidas bombas de flujo y de permeasas, puede contribuir al mantenimiento de la homeostasis celular en condiciones de estrés osmótico. La respuesta genómica coordinada al estrés osmótico implica la activación de varios genes que responden al estrés, lo que en última instancia puede conducir a la acumulación intracelular de solutos compatibles y a la modulación de la composición de la membrana. Aunque las funciones específicas de los genes *treY* y *chdH* en la respuesta al estrés osmótico de *Micromonospora*, *Actinomadura* y *Nocardiopsis* aún no están completamente caracterizadas, su presencia en estos genomas sugiere un papel potencial en los mecanismos adaptativos empleados por estas bacterias para prosperar en entornos con condiciones osmóticas fluctuantes (Ruppel et al., 2013). A pesar de los avances en el estudio de los genes *treY* y *chdH* en actinobacterias, persisten lagunas en la literatura. Su función en entornos no marinos aún no está completamente clara, ya que su investigación se ha centrado mayormente en ambientes marinos (Mohammadipanah y Wink, 2016; Wang et al., 2023). Esto deja un vacío sobre su presencia e impacto en ecosistemas de agua dulce y suelos. Por lo que en futuros estudios se debería explorar la diversidad genética y las funciones de estos genes en actinobacterias de diferentes hábitats, así como el efecto de factores ambientales en su expresión y vías metabólicas asociadas a estos genes (Qin et al. 2019).

Adicionalmente al estrés por fluctuaciones en la salinidad, también está el estrés por choque térmico que se refiere a la respuesta celular que ocurre con las variaciones de temperatura. En particular, se observó que los genes *dnaK*, *grpE* y *hrcA* relacionados con la respuesta al estrés por temperatura se encontraron presentes en los 12 genomas estudiados. La temperatura media anual en la Laguna puede oscilar entre los 18 y 22 °C, pudiendo sobrepasar los 30 °C en ciertas épocas del año, se puede considerar que el estrés por variación de temperatura puede ser relevante para la Laguna Ojo de Liebre considerando la variación en los rangos de temperatura que ocurren en este sistema estacional y espacialmente. Tomando en cuenta que parece que las actinobacterias marinas pueden experimentar estrés térmico a diversas temperaturas, dependiendo de la especie y el entorno específicos. Algunos estudios sugieren que las temperaturas superiores a 30 °C pueden ser estresantes para algunas actinobacterias (Jagannathan et al. 2021; Li et al., 2023).

Además, considerando el aumento de las temperaturas globales debido al cambio climático, los mecanismos de respuesta al estrés térmico en bacterias se vuelven cada vez más relevantes tanto para la estabilidad ecológica como para las aplicaciones biotecnológicas (Bull et al., 2005; Dhakal et al., 2017). La respuesta térmica, que se caracteriza por la regulación incrementada de las proteínas de choque térmico (HSP), es una estrategia de supervivencia crucial para las actinobacterias marinas. Estas proteínas, especialmente la chaperona *dnaK*, son clave para mantener la homeostasis proteica al prevenir la agregación y facilitar el refolding de proteínas dañadas durante episodios de estrés térmico (Hakiem et al., 2020; Straus et al., 1990). Los mecanismos reguladores que involucran a *hrcA* y la co-chaperona *grpE* perfeccionan aún más esta respuesta, evidenciando una interacción compleja entre diversos factores genéticos que determinan la resistencia celular ante este tipo de estrés (Quach et al. 2022). Investigaciones recientes han subrayado la importancia del operón *dnaK* y sus componentes en la mediación de la tolerancia al estrés térmico, sugiriendo que estos genes no son sólo esenciales para la función celular durante el choque térmico, sino que también influyen en una dinámica ecológica y evolutiva más amplia. La capacidad de estos microorganismos para generar compuestos bioactivos bajo condiciones de estrés presenta oportunidades prometedoras para aplicaciones biotecnológicas, especialmente en el

desarrollo de productos farmacéuticos y en iniciativas de conservación ambiental dirigidas a mitigar los efectos del cambio climático (Roda-Garcia *et al.*, 2023; ul Hassan *et al.*, 2024; Li *et al.*, 2023; Li *et al.*, 2024). En un estudio hecho recientemente por ul Hassan *et al.* (2024) probaron mediante análisis transcriptómicos un compuesto que denominaron “compuesto 6” (SM-6). El compuesto reveló actividad antibacteriana en *S. aureus* mediante la modulación de los genes de las proteínas de choque térmico (*dnaK*). lo cual resultó en la alteración del plegamiento y la síntesis de proteínas y la perturbación del equilibrio redox celular, provocando una inhibición completa del crecimiento bacteriano normal.

La investigación de estas respuestas puede aportar información sobre las estrategias de supervivencia microbiana, su contribución a los procesos biogeoquímicos marinos y las posibles aplicaciones de sus productos metabólicos en biotecnología, lo que subraya la importancia de estos microorganismos en las ciencias naturales y aplicadas (Li *et al.*, 2023; Li *et al.*, 2024).

Respecto a evaluar la posible respuesta de las actinobacterias a condiciones limitantes de nutrientes, se encontró que el gen que codifica para la síntesis de (p)ppGpp, este estuvo presente en todos los genomas de este estudio, lo cual indica que podría influir en la expresión de otros elementos genómicos particularmente los grupos de genes relacionados con la síntesis de antibióticos y las proteínas morfogenéticas (Hesketh *et al.*, 2007; Siculella *et al.*, 2010). La producción de antibióticos en actinobacterias marinas, que suele estimularse en condiciones de estrés, pone de relieve la importancia evolutiva de la (p)ppGpp como molécula reguladora (Das y Bahadra, 2020; Selim *et al.*, 2021). Al promover el metabolismo secundario en épocas de escasez de nutrientes o estrés, estas bacterias pueden producir compuestos que pueden inhibir a sus competidores, proporcionándoles así una ventaja de supervivencia en sus hábitats naturales (Das y Bahadra, 2020; Hesketh *et al.*, 2007; Milewska *et al.*, 2019). Esta regulación de metabolitos secundarios por (p)ppGpp no sólo subraya la versatilidad de esta molécula, sino que también sugiere vías potenciales para aplicaciones biotecnológicas, en particular en el descubrimiento y producción de nuevos antibióticos a partir de actinobacterias marinas.

Además, se observó la presencia de los genes *rex* y *fur*, relacionados con la sensibilidad al redox y la absorción de hierro. el gen *rex* se encontró presente en todos los genomas de *Micromonospora*, mientras que el gen *fur* únicamente se encontró en LOL-016 de *Actinomadura*. Lo anterior sugiere adaptaciones genómicas que podrían estar vinculadas al rol ecológico y nicho de cada género en la comunidad en función a las condiciones fisicoquímicas de la laguna. Se ha observado que en bacterias aisladas de la Laguna Ojo de Liebre las variaciones fisicoquímicas estacionales influyen en moldear el genoma de comunidades de actinobacterias que residen en los sedimentos (Zamora-Quintero *et al.*, 2022). Otros estudios han mostrado que el género *Salinispora*, considerado meramente marino (Jensen *et al.*, 2014; Penn y Jensen, 2012), se encuentra metabólicamente incapacitado para crecer en medios de baja osmosis con la inactivación de genes asociados a canales mecanosensibles (Bucarey *et al.*, 2012). Además, en un estudio mediante el análisis de datos genómicos en una cepa de *Streptomyces* sp. H-KF8, se descubrió una diversidad de características genéticas que confieren resistencia a metales pesados, estrés oxidativo y capacidad para enfrentar antibióticos (Undabarrena *et al.*, 2017). Esto sugiere que estas actinobacterias poseen cierta capacidad para sobrellevar una amplia gama de desafíos estresantes en el hábitat marino. Sobre todo, durante el estrés oxidativo y la limitación de hierro en la laguna, estos genes pudieran estar regulando otros sistemas proteicos que involucren agrupaciones de hierro-azufre [Fe-S] que estén presentes en proteínas implicadas en la homeostasis redox. Hay que tomar en cuenta que existen algunas condiciones limitantes de hierro en lagunas hipersalinas pueden influir de manera significativa en la estructura y función de las comunidades microbianas (Hou *et al.*, 2017). Según un estudio realizado por Santini *et al.* (2022) hace mención en la composición de estas comunidades microbianas se encuentran más estrechamente relacionada con la distancia geográfica y el pH en los sedimentos de lagos salinos e inclusive, pueda deber a baja la producción primaria que existe en la laguna. También se destaca la presencia del gen *rspA* en el genoma LOL-012 y LOL-025 implicado en la detección de inanición. Este es un gen regulador crucial en algunas bacterias marinas, que desempeña un papel central en su adaptación a entornos pobres en nutrientes (Tsang & Hoover, 2014). El análisis comparativo con genes similares de otras bacterias marinas puede aportar información valiosa sobre la conservación evolutiva y la diversidad funcional de este mecanismo regulador. Si

bien, la mayoría de los reportes existentes de este gen han sido en *E. coli* (Schultz and Matin 1991), existen reportes cepas de *Streptomyces* como un gen homólogo y recientemente reportado en genomas de *Micromonospora*. Este gen puede ayudar a la supervivencia en hábitats bajos en carbono mediante la activación de la captación de péptidos (Carro *et al.*, 2018; Rasmussen *et al.*, 2013). También se destaca la presencia del gen *rspA* en el genoma LOL-012 y LOL-025 implicado en la detección de inanición. Este es un gen regulador crucial en algunas bacterias marinas, que desempeña un papel central en su adaptación a entornos pobres en nutrientes (Tsang & Hoover, 2014). El análisis comparativo con genes similares de otras bacterias marinas puede aportar información valiosa sobre la conservación evolutiva y la diversidad funcional de este mecanismo regulador. Si bien, la mayoría de los reportes existentes de este gen han sido en *E. coli* (Schultz and Matin 1991), existen reportes cepas de *Streptomyces* como un gen homólogo y recientemente reportado en genomas de *Micromonospora*. Este gen puede ayudar a la supervivencia en hábitats bajos en carbono mediante la activación de la captación de péptidos (Carro *et al.*, 2018; Rasmussen *et al.*, 2013).

También, se observó la relación entre la frecuencia y distribución espacial de los genes evaluados en la laguna. Los genes que se encontraron con mayor frecuencia en todas las estaciones fueron los relacionados al estrés oxidativo y choque térmico, lo cual se puede explicar considerando las fluctuaciones espaciales de temperatura, luz y ROS en la laguna (Fleming *et al.*, 2021; Rodríguez-Valdez *et al.*, 2022). Las estaciones de muestreo donde fueron aislados los genomas van desde la parte de la boca hasta la cabeza de la laguna, y destacan las estaciones 3 y 6, ya que en ellas hubo un mayor número de genes relacionados al estrés oxidativo y choque térmico. Dichas estaciones se encuentran distribuidas en la parte central o media de la laguna. En la laguna el aumento en la temperatura y salinidad va de la boca hacia la cabeza. También acompañado de una limitada disponibilidad de nutrientes que pudiera deberse a la ya mencionada baja productividad primaria existente (Angel-Dapa *et al.*, 2015). En cuanto a la distribución de las cepas en la laguna, llama la atención que la mayor concentración y diversidad de genomas sean de la parte media de la laguna. Dicha distribución puede ser atribuida a los muestreos estacionales ya que pueden esta puede variar con la estación de muestreo, observándose la mayor abundancia de cepas de actinobacterias durante las

estaciones más cálidas (Zamora-Quintero et al., 2022). Lo cual puede llevar a descubrir la presencia de nuevas especies de actinobacterias (Ghai et al., 2011; Sabry et al., 2004). Sin embargo, es importante resaltar la necesidad de estudios que conjunten datos genómicos con los datos *in-sit* de las áreas de muestreo para entender mejor el papel que juegan los genes de estrés en los ambientes.

Conclusión

La diversidad genética y las adaptaciones específicas al ambiente marino en las actinobacterias, destaca la complejidad de sus estrategias adaptativas. La variabilidad en la coincidencia con la base de datos entre los diferentes géneros sugiere una adaptación genética diferencial según el género, mientras que la presencia de genes únicos o altamente divergentes relacionados con el estrés osmótico, la detección de inanición y otros desafíos ambientales subraya la importancia de estos mecanismos para su supervivencia. Además, se observa una distribución específica de genes en ciertos genomas, lo que sugiere adaptaciones genéticas vinculadas a la ecología y nichos específicos. Estos hallazgos resaltan la influencia significativa del entorno en la expresión genética y subrayan la necesidad de una comprensión más profunda de las interacciones entre los factores ambientales y la genética microbiana en los ecosistemas acuáticos marinos. En última instancia, este estudio subraya la importancia de continuar investigando para comprender completamente la diversidad genética y ecológica de las actinobacterias marinas, así como la necesidad de expandir las bases de datos para abordar la complejidad genética de estas bacterias.

7. Referencias

1. Angel-Dapa, M. A., Arellano-Martínez, M., Ceballos-Vázquez, B. P., Acosta-Salmón, H., & Saucedo, P. E. (2017). Comparative analysis of the reproductive strategy of lion's paw scallop *Nodipecten subnodosus* in Baja California Sur, Mexico. *Latin American Journal of Aquatic Research*, 43(3), 616-620. <https://doi.org/10.3856/vol43-issue3-fulltext-25>
2. Baez, A., & Shiloach, J. (2014). Effect of elevated oxygen concentration on bacteria, yeasts, and cells propagated for production of biological compounds. *Microbial Cell Factories*, 13(1), 181. <https://doi.org/10.1186/s12934-014-0181-5>
3. Behera, S., & Das, S. (2023). Potential and prospects of Actinobacteria in the bioremediation of environmental pollutants: Cellular mechanisms and genetic regulations. *Microbiological Research*, 273, 127399. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2023.127399>
4. Beskrovnaya, P., Sexton, D. L., Golmohammadzadeh, M., Hashimi, A., & Tocheva, E. I. (2021). Structural, Metabolic and Evolutionary Comparison of Bacterial Endospore and Exospore Formation. *Frontiers in Microbiology*, 12, 630573. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.630573>
5. Breisch, J., Bendel, M., & Averhoff, B. (2022). The choline dehydrogenase BETA of *Acinetobacter baumannii*: A flavoprotein responsible for osmotic stress protection. *Environmental Microbiology*, 24(3), 1052-1061. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.15741>
6. Bucarey, S. A., Penn, K., Paul, L., Fenical, W., & Jensen, P. R. (2012). Genetic Complementation of the Obligate Marine Actinobacterium *Salinispora tropica* with the Large Mechanosensitive Channel Gene *mscL* Rescues Cells from Osmotic Downshock. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(12), 4175-4182. <https://doi.org/10.1128/AEM.00577-12>
7. Bull, A. T., Stach, J. E. M., Ward, A. C., & Goodfellow, M. (2005). Marine actinobacteria: Perspectives, challenges, future directions. *Antonie van Leeuwenhoek*, 87(1), 65-79. <https://doi.org/10.1007/s10482-004-6562-8>
8. Carro, L., Veyisoglu, A., Cetin, D., Igual, J. M., Klenk, H.-P., Trujillo, M. E., & Sahin, N. (2019). A study of three bacteria isolated from marine sediment and

- description of *Micromonospora globispora* sp. Nov. Systematic and Applied Microbiology, 42(2), 190-197. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2018.11.003>
9. Chater, K. F. (2016). Recent advances in understanding *Streptomyces*. F1000Research, 5, 2795. <https://doi.org/10.12688/f1000research.9534.1>
 10. Crack, J. C., Munnoch, J., Dodd, E. L., Knowles, F., Al Bassam, M. M., Kamali, S., Holland, A. A., Cramer, S. P., Hamilton, C. J., Johnson, M. K., Thomson, A. J., Hutchings, M. I., & Le Brun, N. E. (2015). NsrR from *Streptomyces coelicolor* Is a Nitric Oxide-sensing [4Fe-4S] Cluster Protein with a Specialized Regulatory Function. Journal of Biological Chemistry, 290(20), 12689-12704. <https://doi.org/10.1074/jbc.M115.643072>
 11. Dalmaso, G., Ferreira, D., & Vermelho, A. (2015). Marine Extremophiles: A Source of Hydrolases for Biotechnological Applications. Marine Drugs, 13(4), 1925-1965. <https://doi.org/10.3390/md13041925>
 12. Den Hengst, C. D., & Buttner, M. J. (2008). Redox control in actinobacteria. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects, 1780(11), 1201-1216. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2008.01.008>
 13. Dhakal, D., Pokhrel, A. R., Shrestha, B., & Sohng, J. K. (2017). Marine Rare Actinobacteria: Isolation, Characterization, and Strategies for Harnessing Bioactive Compounds. Frontiers in Microbiology, 8, 1106. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01106>
 14. Fleming, E. D., Bebout, B. M., & Castenholz, R. W. (2021). Photochemical changes during rehydration of an intertidal cyanobacterial mat exposed to variations in salinity and light intensity. Microbiology, 167(8). <https://doi.org/10.1099/mic.0.001075>
 15. Fuchino, K., Flärdh, K., Dyson, P., & Ausmees, N. (2017). Cell-Biological Studies of Osmotic Shock Response in *Streptomyces* spp. Journal of Bacteriology, 199(1). <https://doi.org/10.1128/JB.00465-16>
 16. Ghai, R., Pašić, L., Fernández, A. B., Martín-Cuadrado, A.-B., Mizuno, C. M., McMahon, K. D., Papke, R. T., Stepanauskas, R., Rodríguez-Brito, B., Rohwer, F., Sánchez-Porro, C., Ventosa, A., & Rodríguez-Valera, F. (2011). New Abundant Microbial Groups in Aquatic Hypersaline Environments. Scientific Reports, 1(1), 135. <https://doi.org/10.1038/srep00135>

17. Gribble, G. (2015). Biological Activity of Recently Discovered Halogenated Marine Natural Products. *Marine Drugs*, 13(7), 4044-4136.
<https://doi.org/10.3390/md13074044>
18. Guillot, A., Obis, D., & Mistou, M.-Y. (2000). Fatty acid membrane composition and activation of glycine-betaine transport in *Lactococcus lactis* subjected to osmotic stress. *International Journal of Food Microbiology*, 55(1-3), 47-51. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(00\)00193-8](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(00)00193-8)
19. Gutierrez-Galindo, E. A., Macias-Zamora, J. V., & Segovia-Zavala, J. A. (s. f.). Sources and factors influencing the spatial distribution of heavy metals in a coastal lagoon adjacent to the San Quintín volcanic field, Baja California, Mexico.
20. Hakiem, O. R., Parijat, P., Tripathi, P., & Batra, J. K. (2020). Mechanism of HrcA function in heat shock regulation in *Mycobacterium tuberculosis*. *Biochimie*, 168, 285-296. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2019.11.012>
21. Hassan, S. S. U., Wu, J., Li, T., Ye, X., Rehman, A., Yan, S., & Jin, H. (2024). Unlocking marine microbial treasures: New PBP2a-targeted antibiotics elicited by metals and enhanced by RSM-driven transcriptomics and chemoinformatics. *Microbial Cell Factories*, 23(1), 303. <https://doi.org/10.1186/s12934-024-02573-0>
22. Hesketh, A., Chen, W. J., Ryding, J., Chang, S., & Bibb, M. (2007). The global role of ppGpp synthesis in morphological differentiation and antibiotic production in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Genome Biology*, 8(8), R161. <https://doi.org/10.1186/gb-2007-8-8-r161>
23. Hou, D., Huang, Z., Zeng, S., Liu, J., Wei, D., Deng, X., Weng, S., He, Z., & He, J. (2017). Environmental Factors Shape Water Microbial Community Structure and Function in Shrimp Cultural Enclosure Ecosystems. *Frontiers in Microbiology*, 8, 2359. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02359>
24. Jagannathan, S. V., Manemann, E. M., Rowe, S. E., Callender, M. C., & Soto, W. (2021). Marine Actinomycetes, New Sources of Biotechnological Products. *Marine Drugs*, 19(7), 365. <https://doi.org/10.3390/md19070365>
25. Jensen, P. R., Chavarria, K. L., Fenical, W., Moore, B. S., & Ziemert, N. (2014). Challenges and triumphs to genomics-based natural product

- discovery. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 41(2), 203-209. <https://doi.org/10.1007/s10295-013-1353-8>
26. Le Rudulier, D., Strom, A. R., Dandekar, A. M., Smith, L. T., & Valentine, R. C. (1984). Molecular Biology of Osmoregulation. *Science*, 224(4653), 1064-1068. <https://doi.org/10.1126/science.224.4653.1064>
27. Li, J., Zou, Y., Li, Q., Zhang, J., Bourne, D. G., Lyu, Y., Liu, C., & Zhang, S. (2023). A coral-associated actinobacterium mitigates coral bleaching under heat stress. *Environmental Microbiome*, 18(1), 83. <https://doi.org/10.1186/s40793-023-00540-7>
28. Li, W., Yang, J., Chen, Y., Xu, N., Liu, J., & Wang, J. (2024). Thermo-adaptive evolution of *Corynebacterium glutamicum* reveals the regulatory functions of *fasR* and *hrcA* in heat tolerance. *Microbial Cell Factories*, 23(1), 294. <https://doi.org/10.1186/s12934-024-02568-x>
29. Marquis, R. E. (2004). Applied and Ecological Aspects of Oxidative-Stress Damage to Bacterial Spores and to Oral Microbes. *Science Progress*, 87(3), 153-177. <https://doi.org/10.3184/003685004783238544>
30. McParland, E. L., Alexander, H., & Johnson, W. M. (2021). The Osmolyte Ties That Bind: Genomic Insights Into Synthesis and Breakdown of Organic Osmolytes in Marine Microbes. *Frontiers in Marine Science*, 8, 689306. <https://doi.org/10.3389/fmars.2021.689306>
31. Meena, B., Anburajan, L., Vinithkumar, N. V., Kirubakaran, R., & Dharani, G. (2020). Molecular and functional characterization of major compatible solute in Deep Sea halophilic actinobacteria of active volcanic Barren Island, Andaman and Nicobar Islands, India. In *Physiological and Biotechnological Aspects of Extremophiles* (pp. 253-267). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-818322-9.00019-8>
32. Memar, M. Y., Ghotaslou, R., Samiei, M., & Adibkia, K. (2018). Antimicrobial use of reactive oxygen therapy: Current insights. *Infection and Drug Resistance, Volume 11*, 567-576. <https://doi.org/10.2147/IDR.S142397>
33. Milewska, K., Krause, K., & Szalewska-Pałasz, A. (2020). The stringent response of marine bacteria – assessment of (p)ppGpp accumulation upon stress conditions. *Journal of Applied Genetics*, 61(1), 123-130. <https://doi.org/10.1007/s13353-019-00531-w>

34. Mohammadipanah, F., & Wink, J. (2016). Actinobacteria from Arid and Desert Habitats: Diversity and Biological Activity. *Frontiers in Microbiology*, 6. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.01541>
35. Penn, K., & Jensen, P. R. (2012). Comparative genomics reveals evidence of marine adaptation in *Salinispora* species. *BMC Genomics*, 13(1), 86. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-13-86>
36. Poli, A., Finore, I., Romano, I., Gioiello, A., Lama, L., & Nicolaus, B. (2017). Microbial Diversity in Extreme Marine Habitats and Their Biomolecules. *Microorganisms*, 5(2), 25. <https://doi.org/10.3390/microorganisms5020025>
37. Qin, S., Li, W.-J., Klenk, H.-P., Hozzein, W. N., & Ahmed, I. (2019). Editorial: Actinobacteria in Special and Extreme Habitats: Diversity, Function Roles and Environmental Adaptations, Second Edition. *Frontiers in Microbiology*, 10, 944. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00944>
38. Quach, N. T., Vu, T. H. N., Bui, T. L., Le, T. T. X., Nguyen, T. T. A., Ngo, C. C., & Phi, Q.-T. (2022). Genomic and physiological traits provide insights into ecological niche adaptations of mangrove endophytic *Streptomyces parvulus* VCCM 22513. *Annals of Microbiology*, 72(1), 27. <https://doi.org/10.1186/s13213-022-01684-6>
39. Rasmussen, J. J., Vegge, C. S., Frøkiær, H., Howlett, R. M., Krogfelt, K. A., Kelly, D. J., & Ingmer, H. (2013). *Campylobacter jejuni* carbon starvation protein A (CstA) is involved in peptide utilization, motility and agglutination, and has a role in stimulation of dendritic cells. *Journal of Medical Microbiology*, 62(8), 1135-1143. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.059345-0>
40. Rasuk, M. C., Ferrer, G. M., Kurth, D., Portero, L. R., Farías, M. E., & Albarracín, V. H. (2017). UV-Resistant Actinobacteria from High-Altitude Andean Lakes: Isolation, Characterization and Antagonistic Activities. *Photochemistry and Photobiology*, 93(3), 865-880. <https://doi.org/10.1111/php.12759>
41. Roda-Garcia, J. J., Haro-Moreno, J. M., & López-Pérez, M. (2023). Evolutionary pathways for deep-sea adaptation in marine planktonic Actinobacteriota. *Frontiers in Microbiology*, 14, 1159270. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1159270>
42. Rodríguez-Valdez, G., Romero-Geraldo, R., Medina-Basulto, G., Reyes-Becerril, M., & Angulo, C. (2022). Immunostimulant Activity of Bacteria

Isolated from Extreme Environments in Baja California Sur, Mexico: A Bioprospecting Approach. *Indian Journal of Microbiology*, 62(2), 234-241. <https://doi.org/10.1007/s12088-022-01002-3>

43. Ruppel, S., Franken, P., & Witzel, K. (2013). Properties of the halophyte microbiome and their implications for plant salt tolerance. *Functional Plant Biology*, 40(9), 940. <https://doi.org/10.1071/FP12355>
44. Saadouli, I., Marasco, R., Mejri, L., Hamden, H., Guerfali, M. M., Stathopoulou, P., Daffonchio, D., Cherif, A., Ouzari, H.-I., Tsiamis, G., & Mosbah, A. (2022). Diversity and adaptation properties of actinobacteria associated with Tunisian stone ruins. *Frontiers in Microbiology*, 13, 997832. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.997832>
45. Sabry, S. A., Ghanem, N. B., Abu-Ella, G. A., Schumann, P., Stackebrandt, E., & Kroppenstedt, R. M. (2004). *Nocardiopsis aegyptia* sp. Nov., isolated from marine sediment. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 54(2), 453-456. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.02814-0>
46. Santini, T. C., Gramenz, L., Southam, G., & Zammit, C. (2022). Microbial Community Structure Is Most Strongly Associated With Geographical Distance and pH in Salt Lake Sediments. *Frontiers in Microbiology*, 13, 920056. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.920056>
47. Sasaki, Y., Oguchi, H., Kobayashi, T., Kusama, S., Sugiura, R., Moriya, K., Hirata, T., Yukioka, Y., Takaya, N., Yajima, S., Ito, S., Okada, K., Ohsawa, K., Ikeda, H., Takano, H., Ueda, K., & Shoun, H. (2016). Nitrogen oxide cycle regulates nitric oxide levels and bacterial cell signaling. *Scientific Reports*, 6(1), 22038. <https://doi.org/10.1038/srep22038>
48. Schultz, J. E., & Matin, A. (1991). Molecular and functional characterization of a carbon starvation gene of *Escherichia coli*. *Journal of Molecular Biology*, 218(1), 129-140. [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(91\)90879-B](https://doi.org/10.1016/0022-2836(91)90879-B)
49. Selim, M. S. M., Abdelhamid, S. A., & Mohamed, S. S. (2021). Secondary metabolites and biodiversity of actinomycetes. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 19(1), 72. <https://doi.org/10.1186/s43141-021-00156-9>
50. Shin, J.-H., Singh, A. K., Cheon, D.-J., & Roe, J.-H. (2011). Activation of the SoxR Regulon in *Streptomyces coelicolor* by the Extracellular Form of the Pigmented Antibiotic Actinorhodin. *Journal of Bacteriology*, 193(1), 75-81. <https://doi.org/10.1128/JB.00965-10>

51. Siculella, L., Damiano, F., Di Summa, R., Tredici, S. M., Alduina, R., Gnoni, G. V., & Alifano, P. (2010). Guanosine 5'-diphosphate 3'-diphosphate (ppGpp) as a negative modulator of polynucleotide phosphorylase activity in a 'rare' actinomycete. *Molecular Microbiology*, 77(3), 716-729. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2010.07240.x>
52. Straus, D., Walter, W., & Gross, C. A. (s. f.). DnaK, DnaJ[^] and GrpE heat shock proteins negatively regulate heat shock gene expression by controlling the synthesis and stability of a^{^^}.
53. Torres-Beltrán, M., Cardoso-Martínez, F., Millán-Aguíñaga, N., Becerril-Espinosa, A., & Soria-Mercado, I. (2012). Evaluation of the Gulf of California as a potential source of bioactive marine actinobacteria. *Ciencias Marinas*, 38(4), 609-624. <https://doi.org/10.7773/cm.v38i4.2131>
54. Tsang, J., & Hoover, T. R. (2014). Themes and Variations: Regulation of RpoN-Dependent Flagellar Genes across Diverse Bacterial Species. *Scientifica*, 2014, 1-14. <https://doi.org/10.1155/2014/681754>
55. Undabarrena, A., Ugalde, J. A., Seeger, M., & Cámara, B. (2017). Genomic data mining of the marine actinobacteria *Streptomyces* sp. H-KF8 unveils insights into multi-stress related genes and metabolic pathways involved in antimicrobial synthesis. *PeerJ*, 5, e2912. <https://doi.org/10.7717/peerj.2912>
56. Valdivieso-Ojeda, J. A., Huerta-Díaz, M. A., Delgadillo-Hinojosa, F., Otero, X. L., Arenas-Islas, D., & 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. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2021.112097>
57. Van De Guchte, M., Serror, P., Chervaux, C., Smokvina, T., Ehrlich, S. D., & Maguin, E. (2002). Stress responses in lactic acid bacteria. En R. J. Siezen, J. Kok, T. Abee, & G. Schasfsma (Eds.), *Lactic Acid Bacteria: Genetics, Metabolism and Applications* (pp. 187-216). Springer Netherlands. https://doi.org/10.1007/978-94-017-2029-8_12
58. Van Der Meij, A., Worsley, S. F., Hutchings, M. I., & Van Wezel, G. P. (2017). Chemical ecology of antibiotic production by actinomycetes. *FEMS Microbiology Reviews*, 41(3), 392-416. <https://doi.org/10.1093/femsre/fux005>
59. Von Rosen, T., Keller, L. M., & Weber-Ban, E. (2021). Survival in Hostile Conditions: Pupylation and the Proteasome in Actinobacterial Stress

Response Pathways. *Frontiers in Molecular Biosciences*, 8, 685757.

<https://doi.org/10.3389/fmolb.2021.685757>

60. Walter, J. M., De Oliveira, L. S., Tschoeke, D. A., Meirelles, P. M., Neves, M. H. C. B., Batista, D., Carvalho, A. P., Santos Costa, R. D., Dobretsov, S., Coutinho, R., Swings, J., Thompson, C. C., & Thompson, F. L. (2021). Metagenomic Insights Into Ecosystem Function in the Microbial Mats of a Large Hypersaline Coastal Lagoon System. *Frontiers in Marine Science*, 8, 715335. <https://doi.org/10.3389/fmars.2021.715335>
61. Wang, Z., Kumar, A., Singh, P., & Solanki, M. K. (2023). Editorial: Actinobacteria plant interaction: recent molecular tools and biology. *Frontiers in Microbiology*, 14, 1209699. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1209699>
62. Xu, D., Nepal, K. K., Chen, J., Harmody, D., Zhu, H., McCarthy, P. J., Wright, A. E., & Wang, G. (2018). Nocardiopeptidins A-C: New angucyclines with anti-MRSA activity isolated from a marine sponge-derived *Nocardiopeptidum* sp. HB-J378. *Synthetic and Systems Biotechnology*, 3(4), 246-251. <https://doi.org/10.1016/j.synbio.2018.10.008>
63. Yaradoddi, J. S., & Kontro, M. H. (2021). Actinobacteria: Basic Adaptation to Harsh Environments. En J. S. Yaradoddi, M. H. Kontro, & S. V. Ganachari (Eds.), *Actinobacteria* (pp. 69-88). Springer Nature Singapore. https://doi.org/10.1007/978-981-16-3353-9_5
64. Yukioka, Y., Tanahashi, T., Shida, K., Oguchi, H., Ogawa, S., Saito, C., Yajima, S., Ito, S., Ohsawa, K., Shoun, H., & Sasaki, Y. (2017). A role of nitrite reductase (NirBD) for NO homeostatic regulation in *Streptomyces oelicolor* A3(2). *FEMS Microbiology Letters*, 364(1), fnw241. <https://doi.org/10.1093/femsle/fnw241>
65. Zamora-Quintero, A. Y., Torres-Beltrán, M., Guillén Matus, D. 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). <https://doi.org/10.1099/mic.0.001144>
66. Zhang, M., Zhang, X., Tong, L., Wang, Y., Ou, D., Zhang, J., Wu, Q., & Ye, Y. (2018). Genes involved in tolerance to osmotic stress by random

mutagenesis in *Cronobacter malonaticus*. Journal of Dairy Science, 101(5), 3851-3858. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-13995>

Capítulo 5. Conclusiones generales

El presente trabajo de tesis se enfocó en la exploración filogenómica y del metabolismo secundario de 12 actinobacterias aisladas de sedimentos marinos de la Laguna Ojo de Liebre, México, un ambiente hipersalino único y poco explorado en términos de su diversidad microbiana. A través de la secuenciación y análisis filogenómicos y de minería genómica de estos genomas, se logró obtener una mejor comprensión de sus relaciones filogenéticas, su capacidad biosintética y conocer genes dentro del repertorio genético que les permiten adaptarse a las condiciones ambientales desafiantes de este ecosistema. Los hallazgos del estudio tienen implicaciones importantes para la taxonomía y filogenia, el potencial descubrimiento de fármacos, y el estudio de los mecanismos moleculares de adaptación al estrés en estas actinobacterias que puede ser útil para el desarrollo de estrategias biotecnológicas que permitan optimizar la producción de compuestos bioactivos.

Se destaca de esta investigación la caracterización filogenética de los 12 genomas pertenecientes a tres géneros: *Actinomadura* (2 genomas), *Nocardiopsis* (1 genoma) y *Micromonospora* (9 genomas). Los análisis de MLSA, ANI y dDDH, aplicados a los genomas de *Micromonospora*, permitieron identificar cinco cepas candidatas a nuevas especies. Este hallazgo subraya el potencial de la Laguna Ojo de Liebre como reservorio de novedosas cepas actinobacterianas aún por describir. Los resultados de ANI y dDDH para los genomas de *Actinomadura* confirmaron su afiliación a la especie *Actinomadura cremea*, previamente asignada mediante el análisis del gen 16S ARNr. En el caso del genoma de *Nocardiopsis*, los análisis filogenómicos sugieren la necesidad de realizar estudios adicionales para determinar si se trata de una nueva especie, a pesar de su alta similitud con *Nocardiopsis* sp. CNT-312.

También, resalta el análisis de minería genómica con el cual se identificó un total de 314 BGCs en los 12 genomas, lo que demuestra la notable capacidad biosintética de estas actinobacterias. Las principales clases de BGCs identificadas fueron terpenos, T1PKS, NRPS y RiPPs, las cuales se han asociado a la producción de diversos compuestos bioactivos con aplicaciones en medicina, agricultura y biotecnología. Los análisis de BiG-SCAPE permitieron agrupar los BGCs en familias

de grupos de genes (GCFs), revelando una alta diversidad en los patrones de distribución entre los diferentes géneros y subclados de *Micromonospora*. La baja similitud (<1%) de los GCFs identificados con las bases de datos de referencia sugiere un alto potencial para el descubrimiento de nuevos compuestos bioactivos a partir de estas actinobacterias.

Además, se identificaron genes relacionados con la respuesta al estrés y adaptación al ambiente marino incluyendo algunos implicados en la respuesta al estrés oxidativo, estrés osmótico, choque térmico, detección de inanición y captación de hierro. La presencia de genes como *soxR*, *soxS*, *oxyR*, *hmpA* y *betA* sugiere la existencia de sistemas de defensa antioxidante en estos microorganismos. La identificación de genes relacionados con la producción de osmoprotectores, como trehalosa y ectoína, destaca la importancia de estos compuestos para la adaptación a la alta salinidad de la laguna. La presencia del gen *(p)ppGpp* en todos los genomas analizados sugiere su posible influencia en la expresión de genes relacionados con la síntesis de antibióticos, lo que abre nuevas vías para la bioprospección de compuestos con potencial terapéutico.

Con base en lo anterior este trabajo de tesis contribuye significativamente al conocimiento de la diversidad y el potencial biotecnológico de las actinobacterias marinas, particularmente aquellas provenientes de ambientes hipersalinos poco explorados como la Laguna Ojo de Liebre. Adicionalmente, los resultados de esta tesis también son relevantes para comprender el papel ecológico de las actinobacterias en los ecosistemas marinos hipersalinos. La presencia de genes de estrés y adaptación sugiere que estos microorganismos juegan un papel importante en el funcionamiento de estos ecosistemas, al contribuir a la biodegradación de materia orgánica, la fijación de nitrógeno y la producción de compuestos bioactivos. La variabilidad en la distribución de los genes de estrés en las diferentes estaciones de muestreo de la Laguna Ojo de Liebre subraya la importancia de considerar los factores ambientales en el estudio de la diversidad y función de las comunidades microbianas.

Para futuras líneas de investigación, se propone realizar estudios polifásicos y quimiotaxonómicos adicionales para confirmar la delimitación de las nuevas especies de *Micromonospora* y *Nocardiopsis* propuestas en esta tesis.

Específicamente, propongo esta aproximación para las cepas de los genomas LOL-024 y LOL-025, y que se pueda evaluar su descripción como nuevas especies dentro del género *Micromonospora*. Además, sugiero aislar, purificar y caracterizar los metabolitos secundarios producidos por estas actinobacterias, con especial atención a aquellos que podrían tener aplicaciones biotecnológicas novedosas para los desafíos en salud, agricultura y medio ambiente actuales. Además de investigar la regulación de la expresión de los genes de estrés y adaptación que permitiría comprender mejor cómo estos microorganismos responden a las condiciones ambientales cambiantes. Finalmente, los hallazgos de este estudio demuestran el valor de la investigación genómica para explorar la diversidad y el potencial biotecnológico de las actinobacterias marinas, y abren nuevas vías para la búsqueda de soluciones innovadoras a los desafíos en salud, agricultura y medio ambiente.