

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA

FACULTAD DE CIENCIAS MARINAS



**DIFERENCIA EN LA PRODUCCION DE METABOLITOS
SECUNDARIOS POR *Salinispora arenicola* CUANDO ES
SOMETIDA A DIVERSAS CONDICIONES DE CULTIVO.**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

OCEANÓLOGA

PRESENTA

DULCE GUADALUPE GUILLÉN MATUS

ENSENADA, BAJA CALIFORNIA, MEXICO. ENERO DEL 2012

FACULTAD DE CIENCIAS MARINAS

OCEANOLOGÍA

**DIFERENCIA EN LA PRODUCCION DE METABOLITOS
SECUNDARIOS POR *Salinispora arenícola* CUANDO ES
SOMETIDA A DIVERSAS CONDICIONES DE CULTIVO.**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

OCEANÓLOGA

PRESENTA

DULCE GUADALUPE GUILLÉN MATUS

Aprobada por:



Dr. Irma E. Soria Mercado

Director de tesis



Dra. Graciela Guerra Rivas

Sinodal



MC. Ana María Íñiguez Martínez

Sinodal

RESUMEN.

Recientes estudios han revelado que el género *Salinispora* es un grupo selecto de actinomicetos marinos, considerado el primer género marino obligado y se caracteriza por producir metabolitos secundarios nuevos, con estructuras químicas únicas y que presentan actividades antitumorales, antivirales e inmunosupresoras.

Con el fin de obtener información que ayude al desarrollo de nuevos métodos de cultivo y tecnologías que permitan el acceso a nuevos compuestos químicos con aplicación biomédica. Además de una comprensión a las complejas adaptaciones que presentan el género *Salinispora* a la ecología química marina, en el presente trabajo se analiza la producción de metabolitos secundarios de dos cepas bioactivas de *Salinispora arenicola* (AMS300 y AMS22) aisladas de sedimentos del Golfo de California. Las cepas se sometieron a 10 diferentes condiciones de cultivo enriquecidos unos con avena y otros con medio A1, con una variación en el pH desde 5.5, 6.7, 7.2, 8.5 y 11. Los compuestos

producidos, a partir del quinto al decimo primer día, fueron monitoreados mediante su peso molecular, empleando un cromatógrafo de líquidos con detector de masas. Se compararon todos los cromatogramas y espectros de masas y se observó la correlación existente entre la producción de metabolitos secundarios y las variantes consideradas. Encontrando una diferencia en la producción de metabolitos secundarios entre cepas y un efecto en la producción de compuestos provocado por el pH y el medio de cultivo, señalando una compleja adaptación ecológica de *Salinispora arenicola*. La mayoría de los compuestos obtenidos son desconocidos, indicando que las cepas AMS300 y AMS22 de *Salinispora arenicola* son fuente de nuevos compuestos biológicamente activos.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue financiado con fondos de la XV Convocatoria Interna de la UABC.

INDICE

	Página
Índice.....	i
Lista de tablas.....	iv
Lista de figuras	v
1. Introducción	1
2. Antecedentes	4
2.1. <i>Salinispora</i>	4
2.2. Productos naturales producidos por <i>Salinispora</i>	5
2.3. Metabolitos secundarios.....	6
3. Hipótesis	8
4. Objetivos	8
4.1. Objetivo general.....	8
4.2. Objetivos particulares.....	8
5. Metodología	9
5.1. Activación y mantenimiento de cepas.....	9
5.2. Preparación de medios	10
5.3. Extracción y caracterización de compuestos.....	11

6. Resultados y discusión	13
6.1. Producción de metabolitos.....	13
6.2. Efectos de los tratamientos en la producción de Metabolitos Secundarios	15
6.3. Efectos del pH	17
6.4. Metabolitos bioactivos	27
7. Conclusiones	30
8. Referencias	31
9. Anexo	34

LISTA DE TABLAS

Tabla		Página
I	Medios de cultivo y pH utilizados en los tratamientos para cada cepa y la nomenclatura que se utilizó para su diferenciación.....	12
II	Abundancia relativa (%) de los compuestos producidos por la cepa AMS22 en medio A1 a un pH de 5.5.....	35
III	Abundancia relativa (%) de los compuestos producidos por la cepa AMS22 en medio A1 a un pH de 7.2.....	36
IV	Abundancia relativa (%) de los compuestos producidos por la cepa AMS22 en medio A1 a un pH de 8.5.	37
V	Abundancia relativa (%) de los compuestos producidos por la cepa AMS22 en medio A1 a un pH de 6.7.....	38
VI	Abundancia relativa (%) de los compuestos producidos por la cepa AMS22 en medio A1 a un pH de 11.....	39
VII	Abundancia relativa (%) de los compuestos producidos por la cepa AMS22 en medio Avena a pH de 5.5 a través de los días de cultivo.....	40

VIII	Abundancia relativa (%) de los compuestos producidos por la cepa AMS22 en medio Avena a pH de 6.7 a través de los días de cultivo.....	41
IX	Abundancia relativa (%) de los compuestos producidos por la cepa AMS22 en medio Avena a pH de 7.2 y 8.5 a través de los días de cultivo.....	42
X	Abundancia relativa (%) de los compuestos producidos por la cepa AMS300 en medio A1 a pH de 5.5.....	43
XI	Abundancia relativa (%) de los compuestos producidos por la cepa AMS300 en medio A1 a pH de 5.5 (Continuación).....	44
XII	Abundancia relativa (%) de los compuestos producidos por la cepa AMS300 en medio A1 a pH de 6.7.....	45
XIII	Abundancia relativa (%) de los compuestos producidos por la cepa AMS300 en medio A1 a pH de 7.2.....	46
XIV	Abundancia relativa (%) de los compuestos producidos por la cepa AMS300 en medio A1 a pH de 8.5.....	47

XV	Abundancia relativa (%) de los compuestos producidos por la cepa AMS300 en medio A1 a pH de 8.5. (Continuación).....	
XVI	Abundancia relativa (%) de los compuestos producidos por la cepa AMS300 en medio A1 a pH de 11.....	48
XVII	Abundancia relativa (%) de los compuestos producidos por la cepa AMS300 en medio Avena a pH de 5.5.....	49
XVIII	Abundancia relativa (%) de los compuestos producidos por la cepa AMS300 en medio Avena a pH de 5.5. (Continuación).....	50
XIX	Abundancia relativa (%) de los compuestos producidos por la cepa AMS300 en medio Avena a pH de 6.7.....	51
XX	Abundancia relativa (%) de los compuestos producidos por la cepa AMS300 en medio Avena a pH de 7.2.....	52
XXI	Abundancia relativa (%) de los compuestos producidos por la cepa AMS300 en medio Avena a pH de 8.5.....	53
XXII	Abundancia relativa (%) de los compuestos producidos por la cepa AMS300 en medio Avena a pH de 11.....	54

LISTA DE FIGURAS

Figura		Pagina
1	Cultivo de <i>Salinispora arenicola</i>	7
2	Obtención de los extractos crudos de las cepas AMS22 y AMS300....	11
3	Cromatogramas de los extractos AMS22d7a y AMS22d7f, del séptimo día de extracción a un pH de 5.5 en medio A1 (superior) y medio Avena (inferior) mostrando la diferencia en abundancia relativa para Desferripalmitoilcoprogen (m/e 965).....	17
4	Cromatogramas de los extractos AMS22d10b (superior) y AMS300d10c (inferior) en el décimo día de extracción a un pH de 7.2, ambos en medio A1. Se observa la diferencia en la producción de [Thr(2),Leu(5), Ala(10)] ciclosporina, entre cepas, con abundancias relativas de 22.63% para la cepa AMS22 y del 100% por la cepa AMS300.	18
5	Abundancia relativa del compuesto de peso molecular 662 (m/e), en	19

	medio A1 a un pH de 5.5 en los diferentes días de cultivo.....	
6	Concentración de Bemnamicina D (1007 m/e), en medio A1 a un pH de 8.5 en los diferentes días de cultivo.....	20
	Evolución de la abundancia relativa del compuesto	
7	Desferripalmitoicoprogeno (965 m/e), a través de los días de cultivo producido en medio A1, a un pH de 7.2 por la cepa AMS300 en los diferentes días de cultivo.....	21
8	Diferencia en la producción de Ciclosporina O (1160 m/e) por AMS22. Los números se refieren a los días de extracción, mientras que las letras al pH del medio de cultivo. Se observa como a un pH de 5.5 (letra A) la producción es mayor que a pH neutros, de 7.2 y 6.7 (letras B y D respectivamente). La letra E se refiere al pH de 11.....	22
9	Compuestos bioactivos producidos por <i>Salinispora arenicola</i> (AntimarinLit.).....	24
10	Estructura y patrón de fragmentación de la Ciclosporina O.....	24

11	Estructura y patrón de fragmentación de la w-hemiacetal-Rifamicina...	25
12	Estructura y patrón de fragmentación del Desferripalmitoicoprogen...	25
13	Estructura y patrón de fragmentación de la [Thr(2),Leu(5), Ala(10)] Ciclosporina (1176 m/e).....	26
14	Patrón de fragmentación del compuesto con peso molecular de 782 (m/e) tiempo de retención de 7.2 minutos.....	27
15	Patrón de fragmentación del compuesto con peso molecular 662 (m/e) y tiempo de retención de 22.6 minutos.....	27
16	Patrón de fragmentación del compuesto con peso molecular de 1385 (m/e) y tiempo de retención de 6.86 minutos.....	28
17	Patrón de fragmentación del compuesto de peso molecular 690 y tiempo de retención de 23.5 minutos.....	28
18	Patrón de fragmentación del compuesto de peso molecular 1323 y tiempo de retención 7.68 minutos.....	29
19	Patrón de fragmentación del compuesto de peso molecular 1423 y tiempo de retención 14.5 minutos.....	29

20	Patrón de fragmentación del compuesto con peso molecular 944 y tiempo de retención 24.8 minutos.....	30
21	Patrón de fragmentación del compuesto de peso molecular 764 y tiempo de retención de 26.7 minutos.....	30

INTRODUCCIÓN

Los océanos cubren más del 70% de la superficie terrestre incluyendo algunos de los ecosistemas más diversos del planeta; desde zonas tropicales, arrecifes de coral, trincheras, pozas de marea, entre otros. Con una biodiversidad de macro y microfauna muy superior a la existente en la tierra tanto en la zona pelágica como en el bentos, se estima que menos del 1% de los químicos potencialmente útiles se han descubierto en el ambiente marino, donde los productos de procedencia microbiológica representan el 1% del total (Jensen & Fenical, 1996; McClintock, 2001).

En las últimas cuatro décadas, el aislamiento y la elucidación estructural de productos naturales marinos biomédicamente importantes ha sido un área de investigación fructífera no solamente para los químicos orgánicos, sino para los bioquímicos, médicos y todos los especialistas en materia de salud. Solamente para el año 2006 un total de 779 compuestos provenientes de organismos marinos fueron descritos; incluyendo, hidroquinonas, indolocarbazoles, astaxantinas, compuestos sulfurados, alcalo-imidazoles, oxazoles y tiazoles, alcaloides heterocíclicos, diterpenoides y sesquiterpenoides (Blunt *et al.*, 2008). El extraordinario potencial biomédico de los productos naturales marinos está bien documentado; revisiones recientes proporcionan detalles de sus actividades citotóxicas, antitumorales, anticancerígenas, antivirales, antiinflamatorias, antiparásitos, antituberculares y antimaláricas. Sin embargo, algunos de estos efectos farmacológicos fueron serendípicas y otros pueden relacionarse con la función natural del metabolito *in situ* (Blunt *et al.*, 2008; Jensen & Fenical, 1996; McClintock, 2001).

Particularmente, los compuestos aislados de microorganismos marinos han demostrado actividad antibiótica, anticáncer, antiinflamatoria y otros usos farmacológicos; representando el 45 % de todos los metabolitos bioactivos reportados de origen microbiológico. Dentro de sus formas químicas se encuentran las antraciclinas, péptidos, ácidos aureólicos, enedinas, antimetabolitos como la pentostantina, carzinofilinas, mitomicinas, entre otros (Berdy, 2005; Newman *et al.*, 2007; Olano *et al.*, 2009).

Aunque se conoce muy poco acerca de la diversidad microbiana en los sedimentos marinos, se ha demostrado que contienen una amplia variedad de microorganismos que no están presentes en el ambiente terrestre, dentro de los cuales se encuentran las actinobacterias marinas, para las que se ha determinado que en al menos tres de cuatro casos se requiere algún componente del agua de mar para la producción de metabolitos bioactivos; de hecho, se ha reportado que la presencia de halógenos en posiciones específicas de la molécula ayuda o, en algunos casos hasta es requerido para que un compuesto presente una actividad biológica químicamente relevante (Jensen et al., 2006; Fenical & Jensen, 1996).

Las condiciones a las cuales los actinomicetos han tenido que adaptarse durante su evolución se ven reflejadas en la diversidad genética y metabólica que presentan; los ambientes que habitan son tan variados que van desde presiones extremadamente altas (llegando hasta 1100 atmósferas de presión) y condiciones anaeróbicas a temperaturas por debajo de cero grados en el fondo marino, hasta condiciones muy ácidas (pH 2.8) con temperaturas mayores a 100 °C cerca de las chimeneas hidrotermales en las trincheras (Lam 2006).

El proceso de síntesis química y degradación en los seres vivos es llamado metabolismo, e, invariablemente estos procesos están bajo el control enzimático. Un sistema de caminos biosintéticos bien definido es usado por todos los organismos para la producción de químicos que son esenciales para la sobrevivencia y bienestar del organismo. Estos químicos son conocidos como metabolitos primarios e incluyen lípidos, ADN, y proteínas. Desde tiempo atrás, se han aislado y caracterizado una gran cantidad de productos naturales provenientes de organismos tanto terrestres como marinos. Sin embargo, la razón de la presencia de estos compuestos en los organismos no ha sido descubierta totalmente. Estos compuestos no se parecen a la mayoría de los metabolitos primarios clásicos, por lo tanto, fueron nombrados como metabolitos secundarios. Pero, al parecer esta terminología subestima las importantes funciones de estos compuestos. De hecho, los metabolitos secundarios contribuyen a la sobrevivencia de los organismos tanto como

los metabolitos primarios. Pues, los protegen de riesgos como infecciones, predación o permitiéndoles competir por espacio, nutrientes, y recursos en el competitivo y complejo ambiente marino. Por su parte, el término producto natural, se aplica a aquellos compuestos orgánicos de origen natural que son específicos de un organismo o que son comunes a un pequeño número de organismos estrechamente relacionados; los productos naturales son mayormente metabolitos secundarios (McClintock, 2001; Anaya Lang, 2003).

Existen varias teorías de por qué los organismos marinos producen metabolitos secundarios. Las primeras teorías sugerían que los productos naturales representaban un lastre químico, desperdicio o exceso en los productos del metabolismo primario. Sin embargo, se ha incrementado la evidencia que muchos productos naturales marinos juegan papeles ecológicos fundamentales sugiriendo que son producidos de forma premeditada. Según Williams et al. (1989) Los productos naturales han evolucionado bajo la presión de la selección natural para unirse a receptores específicos, y por lo tanto, representan la respuesta ecológica de los organismos a sus ambientes. Aun así, los organismos pagan un precio por esta ventaja ecológica ya que las rutas bioquímicas generadoras de los productos naturales son complejas y se utilizan cantidades significantes de energía para su producción, cuando podrían ser utilizadas para el crecimiento o reproducción (Jensen & Fenical, 1996 & McClintock, 2001).

Los medios de cultivo proporcionan las condiciones físicas, químicas y nutritivas adecuadas para que los microorganismos puedan multiplicarse de forma controlada, así pues, un microorganismo necesita para crecer nutrientes que le aporten energía y elementos químicos para la síntesis de sus constituyentes celulares que el medio de cultivo les brinda de una forma asimilable. Existen muchos componentes que se pueden utilizar dentro de los medios de cultivo con este propósito, por ejemplo, la bacto-peptona que se utiliza como fuente de nitrógeno orgánico; el extracto de levadura que proporciona vitaminas hidrosolubles esenciales, aminoácidos, péptidos y carbohidratos; y el almidón como fuente de carbohidratos (energía).

Sin embargo, no todos los microorganismos conocidos son cultivables, esto debido a que no todos tienen los mismos requerimientos para su crecimiento, sin olvidar que un cultivo puro supone condiciones no naturales y que la fisiología que los microorganismos presentan puede ser diferente a la de su ambiente natural¹.

Por lo que también existen muchas variaciones en las condiciones de fermentación dependiendo de estos requerimientos, por ejemplo la presencia de sodio, de extracto de carne o de algas y caldos nutritivos como la avena que brinda carbohidratos, proteínas y diferentes vitaminas y minerales que ayudan al crecimiento bacteriano.

De ahí la importancia de los medios de cultivo en el estudio de los microorganismos y su influencia en los compuestos químicos que son producidos.

Con base en lo anterior, se estima que al variar las condiciones de cultivo tanto como sea posible se podrán observar variaciones en la producción de metabolitos secundarios, tanto en concentración, como en el tipo de compuestos. De esta manera se puede conocer el medio de cultivo óptimo para la producción del metabolito de interés.

ANTECEDENTES

Las actinobacterias son bacterias aerobias, gram-positivas con un contenido alto de Guanina + Citosina en ADN. Incluyen el orden *Actinomycetales* que está compuesto aproximadamente por ochenta géneros. La mayoría de ellos de origen terrestre y principalmente saprófitos (Stackebrandt et al., 1997 & Williams et al., 1984). Estos microorganismos tienen una habilidad incomparable para producir diversos metabolitos secundarios. Sobre todo, en los periodos de no crecimiento o limitación en el crecimiento bacteriológico, donde algunos productos residuales del metabolismo primario pueden ser utilizados por la célula para sintetizar los metabolitos secundarios (Singleton, 2003). Además son importantes transformadores de biopolímeros tales como la lignocelulosa, hemicelulosa, pectina, queratina y quitina en suelo terrestre (Mincer et al., 2002). En el caso de los actinomicetos acidófilos, se ha reportado en pruebas *in vitro*, que la actividad antifúngica es muy común; esto debido a que los hongos son los mayores competidores en ambientes ácidos (Khan & Williams, 1975).

SALINISPORA

Salinispora es el primer género marino obligado dentro del orden *Actinomycetales* Buchanan 1917, perteneciente a la familia *Micromonosporaceae* Stackebrand et al. 1997 y una fuente productiva de metabolitos secundarios biológicamente activos. El nombre *salinispora* proviene del latín *salinus*, salina y del griego *spora*, espora; el cual hace referencia a organismos formadores de esporas y de hábitat marino (Maldonado et al., 2005 & Mincer et al., 2005).

Estos microorganismos forman hifas extensamente ramificadas, aproximadamente de 0.25 a 0.5 µm de diámetro, con esporas de superficie lisa (0.8 a 3.8 µm de diámetro). Todas las cepas requieren agua de mar o un medio rico en sodio para crecer. Las primeras colonias aparecen después de tres a seis semanas, dependiendo del medio de crecimiento y se reconocen por su falta de hifas aéreas y su pigmentación, la cual va desde un naranja brillante o rosa, tornándose café oscuro o negro con el tiempo; las

hifas vegetativas son finamente ramificadas y no se fragmentan (Magarvey et al., 2004 & Maldonado et al., 2005).

Las esporas son sésiles, transmitidas individualmente o en grupos por pequeños esporóforos y las colonias adquieren un color oscuro durante la esporulación. Su crecimiento óptimo se da entre los 10 a 30 °C y pH de entre 7 a 12 con presencia de algún antibiótico como novobiomicina, penicilina G, rifampicina y sulfato de gentamicina, neomicina y estreptomicina. Se encuentra en abundancias mayores de 10⁴ UFC/ml en el sedimento marino (Maldonado et al., 2005).

Son bacterias degradadoras de dearbutina, caseína, elastina, gelatina y almidón; pero no de celulosa, quitina, tributirina o xilano. Además utilizan D-Celobiosa, x-lactosa, D-melexitosa y almidón como fuente de carbono (Maldonado et al., 2005).

Comparadas con sus familiares terrestres *Micromonospora*, *Dactylosporangium*, y *Actinoplanes*, *Salinispora* habita en un ambiente menos variable en términos de temperatura, salinidad e hidratación y, por tanto, posiblemente se encuentra influenciada por menos fuerzas selectivas que conducen a la especiación. Ha sido aislada de diferentes partes del mundo, incluyendo: el Mar Caribe, Mar rojo, El océano Atlántico tropical de las Bahamas, el océano Pacífico tropical de Guam, de una esponja perteneciente a la gran barrera de coral en Australia y del Golfo de California (Jensen *et al.*, 1991; Mincer *et al.*, 1995; Feling *et al.*, 2003). A pesar de ser un grupo único con una distribución amplia en los sedimentos marinos solo se ha cultivado a partir de las capas superficiales de sedimentos pertenecientes a latitudes tropicales y subtropicales con únicamente dos especies del género cultivadas, sugiriendo una diversidad limitada a nivel especie (Mincer et al., 2005).

Análisis filogenéticos han revelado tres especies distintas pero estrechamente relacionadas: *Salinispora arenicola* (especie tipo), *S. tropica* y una nueva, la cual ha sido propuesta como *S. pacifica*, pero aún no ha sido descrita formalmente. Siendo el tipo de metabolitos la mayor diferencia fenotípica entre las dos especies (Maldonado *et al.*, 2005).

El nombre de *S. arenicola* (Del latín *arena*, arena; *incola*, habitante) se debe a que fue aislada del sedimento marino. Las cepas tienen un requerimiento de un 25 a 50 % de agua de mar, o un medio enriquecido con sodio, y una temperatura 20 a 28 °C para un crecimiento óptimo. Asimismo, los cultivos pueden ser enriquecidos con Arbutina, L-prolina, D-salicina, L-threonina y L- triosina como única fuente de energía y carbono para el crecimiento (Maldonado et al., 2005). Mientras que *S. tropica* (Del latín *tropica*, tropical; proveniente de los trópicos) tiene un óptimo de temperatura en el rango de 15 a 28 °C; no crece en presencia de rifampicina y utiliza D-Galactosa e inulina como única fuente de energía y carbono (Maldonado et al., 2005).

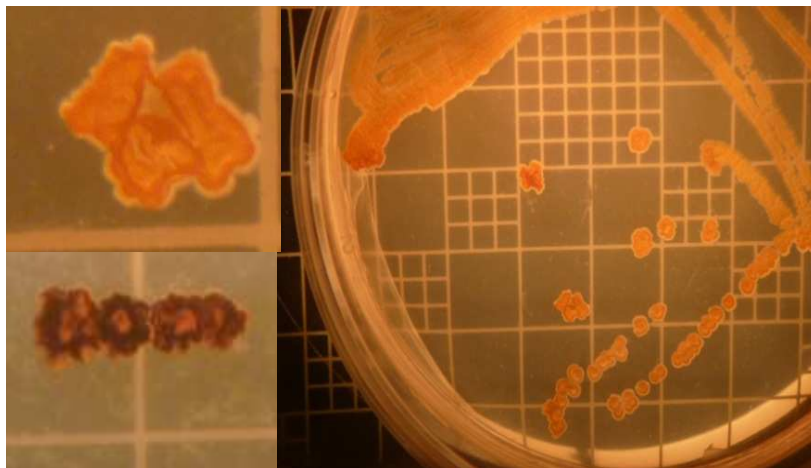


Figura 1. Cultivo de *Salinispora arenicola*.

PRODUCTOS NATURALES PRODUCIDOS POR *SALINISPORA*

Dentro de los productos naturales producidos por *Salinispora* se encuentra salinosporamida A, un potente inhibidor del proteasoma, el cual se encuentra en fase I de ensayos clínicos como agente anticáncer. Particularmente, a nivel especie *S. tropica* produce, además de salinosporamida A, una macromolécula derivada del policétido,

sporolida A con una actividad biológica desconocida. Además de linfostina y salinilactum (Maldonado et al., 2005).

Por su parte *S. arenicola* produce compuestos de la familia del rifampicina y la estaurosporina que es un inhibidor de la proteína quinasa, así como el nuevo compuesto bicíclico salinicetal que comparte algunas características biosintéticas con la rifampicina. También produce arenicolida A, el cual es un accesorio para el núcleo quimiotipo; y el péptido cíclico ciclomarina A, arenimicina y arenamida A (Maldonado et al., 2005; Williams et al., 2007).

METABOLITOS SECUNDARIOS

FACTORES QUE AFECTAN LA PRODUCCION DE METABOLITOS SECUNDARIOS

Los cambios ambientales pueden alterar la cantidad de material y energía disponible para ser utilizados en el crecimiento, reproducción y defensa. Algunos de estos factores ambientales podrían ser la competencia, salinidad, luz UV, temperatura, pH, nutrientes, humedad relativa, potencial redox, entre otros. Estos cambios provocan que los organismos se estresen, limitando su capacidad para adquirir recursos y resultando en una ineficaz condición fisiológica, lo que se cree que al final alterará la concentración y el tipo de metabolitos secundarios que producen, a esto se le conoce como teoría del estrés ambiental, la cual se basa en la premisa que un organismo en un estado estresado será menos capaz de adquirir recursos y distribuirá una proporción mayor de estos recursos reducidos para mantenerse, comparado con un organismo no estresado (McClintock, 2001).

Jensen y Fenical (1996) suponen que la tasa a la cual compuestos conocidos son aislados a partir de bacterias marinas está en función de: 1) el grado en que han sido estudiados los familiares taxonómicos del organismo productor; 2) Las condiciones de fermentación (por ejemplo, medio tradicional vs medio marino); y 3) las adaptaciones a los factores fisicoquímicos que afectan las rutas del metabolismo secundario.

HIPÓTESIS

La diferencia en la composición del medio de cultivo, el pH y el tiempo de cultivo ejercerá una variación en la proporción y tipo de metabolitos secundarios producidos por *Salinispora arenicola*.

OBJETIVO GENERAL

Determinar la variación en el tipo y la concentración de metabolitos secundarios producidos por *Salinispora arenicola* cuando es sometida a diferentes tratamientos de cultivo; e identificar cuáles de los metabolitos que se producen están reportados como bioactivos.

OBJETIVOS PARTICULARES

- Analizar el efecto de ambientes ácidos y básicos en la producción de metabolitos secundarios por el actinomiceto marino *Salinispora arenicola*.
- Identificar la variación en la producción de metabolitos secundarios modificando las condiciones de fermentación con medio A1 y medio Avena.
- Determinar si existe variación en el tipo y concentración de metabolitos que se producen en los tratamientos utilizados a través de los días de cultivo.
- Identificar cuáles de los metabolitos que se producen están reportados como bioactivos.

METODOLOGÍA

ACTIVACIÓN Y MANTENIMIENTO DE CEPAS.

Las cepas utilizadas para este trabajo fueron las cepas nombradas AMS300 y AMS22 identificadas previamente según el 16S como *Salinispora arenicola* secuencia tipo A provenientes del cepario de actinobacterias del laboratorio de Química Marina de la Facultad de Ciencias Marinas que se mantienen criopreservadas a -75°C en glicerol al 30%.

Para la activación de las cepas se tomaron 500 μl del criopreservado, se inocularon en 10 ml de medio líquido A1 y se pusieron en agitación constante a 210 rpm. El tiempo de escalamiento a 100 ml varió de 7 días a un mes dependiendo de la velocidad de crecimiento de cada cepa. En algunos casos fue necesario un escalamiento intermedio de 50 ml. Las bacterias se mantuvieron en matraces erlenmeyer de 250 ml con 100ml de medio líquido A1 mientras duró el experimento, renovando el cultivo aproximadamente cada 3 semanas.

PREPARACIÓN DE MEDIOS.

La composición particular de los medios de cultivo que se utilizaron es la siguiente:

Medio A1. 10 gramos de Almidón, 4 gramos de extracto de levadura y 2 gramos de peptona por litro de agua de mar.

Medio A1 Solido. 10 gramos de Almidón, 4 gramos de extracto de levadura, 2 gramos de peptona y 16 gramos de agar por litro de agua de mar.

Medio Avena. 20 g de avena molida pura por litro de agua de mar.

Ambos medios fueron enriquecidos con 5 ml de sulfato férrico ($\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$) por cada litro de medio de cultivo. Después de preparados los medios, se utilizó HCl y NaOH concentrados para adecuar el pH del medio y se esterilizó a 15 libras de presión a 121°C durante 30 minutos.

El medio Avena se preparó hirviendo los granos de avena en el agua de mar durante 20 minutos aproximadamente y se filtró a través de gasas para obtener solamente el caldo.

EXTRACCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE COMPUESTOS.

Para la caracterización de los compuestos producidos se utilizaron diez tratamientos en total que consistieron en medio líquido A1 o Avena con un intervalo de pH con valores de 5.5, 6.7, 7.2, 8.5 y 11 (Tabla I). Se inocularon 20 mL del cultivo mantenido en 80 ml del tratamiento respectivo dentro de un matraz erlenmeyer, y se mantuvieron en agitación constante a 210 rpm a una temperatura de 28 °C durante los once días del ensayo.

Diariamente, a partir del quinto y hasta el décimo primer día, se extrajeron 30 mL del cultivo y se agregaron 20mL de acetato de etilo. Se hizo una extracción líquido-líquido en un embudo de separación de 125 mL separando la fase orgánica de la acuosa, se agregaron nuevamente 20 mL del disolvente a la fase orgánica restante para obtener un total de 40 mL de extracto.



Figura 2. Obtención de los extractos crudos de las cepas AMS22 y AMS300.

Para el análisis de los extractos, se obtuvo el peso seco de cada uno, concentrándolos hasta sequedad mediante destilación a presión reducida con un rotaevaporador marca Heidolph Collegiate modelo WBEco. Después se analizaron empleando un cromatógrafo de líquidos con detector de masas (LC/MS Agilent 1100). Una vez, obtenidos los espectros de masa de cada extracto, se identificaron de manera preliminar asociándolos por familia de compuestos; a partir de comparaciones de su peso molecular, tiempo de retención y patrón de fragmentación con bases de datos de productos naturales actualizada (Antimarin Lit). Para poder comparar la concentración de cada compuesto, entre días y tratamientos se calculó la abundancia relativa de cada compuesto y así se determinó la correlación existente entre la producción de metabolitos secundarios y las variantes consideradas.

Tabla I. Medios de cultivo y pH utilizados en los tratamientos para cada cepa y la nomenclatura que se utilizó para su diferenciación.

Cepa	Medio	pH	Extracto
AMS22	A1	5.5	AMS22d5a - AMS22d11a
		7.2	AMS22d5b-AMS22d11b
		8.5	AMS22d5c-AMS22d11c
		6.7	AMS22d5d-AMS22d11d
		11	AMS22d5e-AMS22d11e
	Avena	5.5	AMS22d5f-AMS22d11f
		6.7	AMS22d5g-AMS22d11g
		7.2	AMS22d5h-AMS22d11h
		8.5	AMS22d5i-AMS22d11i
		11	AMS22d5j-AMS22d11j
AMS300	A1	5.5	AMS300d5a-AMS300d11a
		6.7	AMS300d5b-AMS300d11b
		7.2	AMS300d5c-AMS300d11c
		8.5	AMS300d5d-AMS300d11d
		11	AMS300d5e-AMS300d11e
	Avena	5.5	AMS300d5f-AMS300d11f
		6.7	AMS300d5g-AMS300d11g
		7.2	AMS300d5h-AMS300d11h
		8.5	AMS300d5i-AMS300d11i
		11	AMS300d5j-AMS300d11j

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

PRODUCCION DE METABOLITOS

Los extractos con los que se trabajaron fueron extractos crudos, por lo que se puede tener una aproximación a la familia de compuestos a la que pertenecen los metabolitos aislados. Además, el peso molecular y el patrón de fragmentación pueden variar, pues los cromatogramas no fueron corridos exactamente en las mismas condiciones.

Se obtuvieron 140 extractos crudos de los cuales 97 fueron analizados mediante LC/MS, 37 extractos para la cepa AMS22 y 60 para la cepa AMS300, a partir de los cuales se realizó una identificación preliminar de 154 compuestos, 47 para la cepa AMS22 y 107 para la cepa AMS300. Es decir, que la cepa AMS300 produjo el doble de compuestos que la cepa AMS22 aun cuando se tratan de la misma especie, de los cuales 21 están reportados como bioactivos.

Esta diferencia podría estar asociada a la zona de colecta del sedimento del que fue aislada cada cepa. Pues, aunque las dos son provenientes del Golfo de California; la cepa AMS300 fue colectada en la playa de la Isla Danzantes en Loreto, a una profundidad de cero a diez metros, a diferencia de la cepa AMS22 que fue aislada también en Loreto pero de sedimentos de 300 m de profundidad (Becerril, 2011).

Jensen et al. (2006) encontró que la producción de metabolitos secundarios específicos para la especie *S. arenicola*, tales como la Rifamicina y la Ciclomarina, era independiente del sitio de colecta. En este caso, los compuestos que se observan son derivados de dichos productos naturales, pero la concentración a la que se presentan varía, implicando que los metabolitos secundarios tienen funciones importantes en la sobrevivencia de los microorganismos productores y apoyando la posibilidad de una diversificación debida a la adaptación de la especie a diferentes ambientes.

Sin embargo, en el caso particular de los resultados con medio Avena no se puede asegurar que la cepa AMS22 sea menos productiva, pues una buena parte de los

cromatogramas de los extractos obtenidos a partir del ensayo con medio Avena no pudieron utilizarse en la comparación ya que las muestras no se analizaron en las mismas condiciones que los demás, esto provoca una subestimación en la producción de la cepa AMS22 en medio Avena al compararla con la cepa AMS300.

Hablando acerca de la diferencia en la cantidad de compuestos producidos por las cepas, podría deberse a que la cepa de *S. arenicola* AMS300, fue aislada de una zona mucho más cambiante que la cepa AMS22. Teniendo un método de defensa químico más especializado, que se refleja una amplia producción de compuestos químicos que le permiten adaptarse o cambiar las condiciones ambientales que lo rodean. A diferencia de la cepa aislada a 300 metros de profundidad, que se encuentra en un ambiente más estable, fisicoquímicamente hablando.

Antes se creía que las bacterias sintetizaban compuestos dependiendo el medio en el que se cultivaban. Después de observar una gran especificidad en la producción de metabolitos secundarios entre especies del género *Salinispora*, se conoce que existen genes que codifican para la producción de ciertos compuestos en los microorganismos. De ahí que algunos compuestos, como Ciclosporina O (m/e 1160), Desferripalmitoylcoprogen (m/e 965), 8-Deoxyrifamicina S (m/e 679), [Thr(2),Leu(5),Ala(10)] Ciclosporina (m/e 1176) y Bacitracina I (m/e 1391), entre otros, se mantuvieron presentes en los diferentes tratamientos a los que fue sometida *Salinispora arenicola*, variando su concentración entre cepas.

Algo que se debe resaltar es que gran parte de los compuestos encontrados son desconocidos, pues los iones moleculares no coinciden con la literatura del Antimarin, que fue la base de datos utilizada para la identificación de los compuestos, posiblemente las cepas estén produciendo compuestos nuevos biológicamente activos.

En el anexo de tablas (Tabla II a la XIX) se muestra de forma detallada los compuestos producidos por las cepas de *S. arenicola* durante el ensayo, mostrando el peso molecular (PM) aproximado, el tiempo de retención (TR) y las abundancias relativas para cada

compuesto. Algunos tienen más de un nombre, esto se debe a que al compartir el peso molecular, y tener una estructura similar, los datos que se tienen no son suficientes para distinguir entre ambos compuestos.

Efectos de los tratamientos en la producción de Metabolitos Secundarios

Efecto del medio de Cultivo.

En general los cultivos en medio A1 fueron más productivos, pues presentaron una mayor cantidad de metabolitos secundarios y abundancias relativas que en el medio Avena. Del total de los 47 compuestos encontrados en la cepa AMS22, 40 se presentaron en medio A1 y 20 estuvieron presentes en el medio Avena. Mientras que en la cepa AMS300 del total de 107 compuestos producidos, 79 se presentaron en medio A1 y en el medio Avena solo 26; entre los que se encuentran Bacitracina D y H (m/e 1394), Rifamicina w-hemiacetal (m/e 846) y 4,8-Di-g-hidroxy-melev-ciclosporina A (m/e 1276). Este efecto podría deberse a que el medio A1 está conformado por una mezcla de peptona, almidón y levadura; componentes ampliamente utilizados en el cultivo de microorganismos y que proveen los nutrientes que las bacterias necesitan para que el cultivo crezca de manera eficiente. A diferencia del caldo de avena que aunque también es fuente de nutrientes esenciales para el crecimiento bacteriano, la forma en que se encuentran en el medio puede no ser la mejor para su asimilación.

Hablando de abundancias relativas, en la cepa AMS22 se observó una diferencia en la producción de Desferripalmitoicoprogen (m/e 965), el cual incrementó su producción de ~50% en medio A1 a un 100% en medio Avena (Fig.3). Aunque la presencia de este compuesto fue más exclusiva, pues solo se encontró en los extractos AMS22d7f, AMS22d6g, AMS22d7g y AMS22d6i. Esto no sucedió en la cepa AMS300, pues el compuesto que presentó una abundancia de 100% en todos los extractos del medio Avena excepto AMS300d5f, fue la Rifamicina w-hemiacetal (m/e 846). Cabe mencionar que este efecto solamente se observó con estos compuestos, pues en los demás, las

abundancias relativas permanecieron igual o en algunos casos su producción se redujo en medio Avena. Aun así, el medio A1 presentó porcentajes mayores a los del medio Avena.

Aunque la cantidad de compuestos producidos en medio Avena fue mucho menor, algunos como Rifamicina R (m/e 711), Hidroxyprotorifamicina (m/e 655), Bacitracina F/ X (m/e 1419), fueron exclusivos para los extractos de Avena.

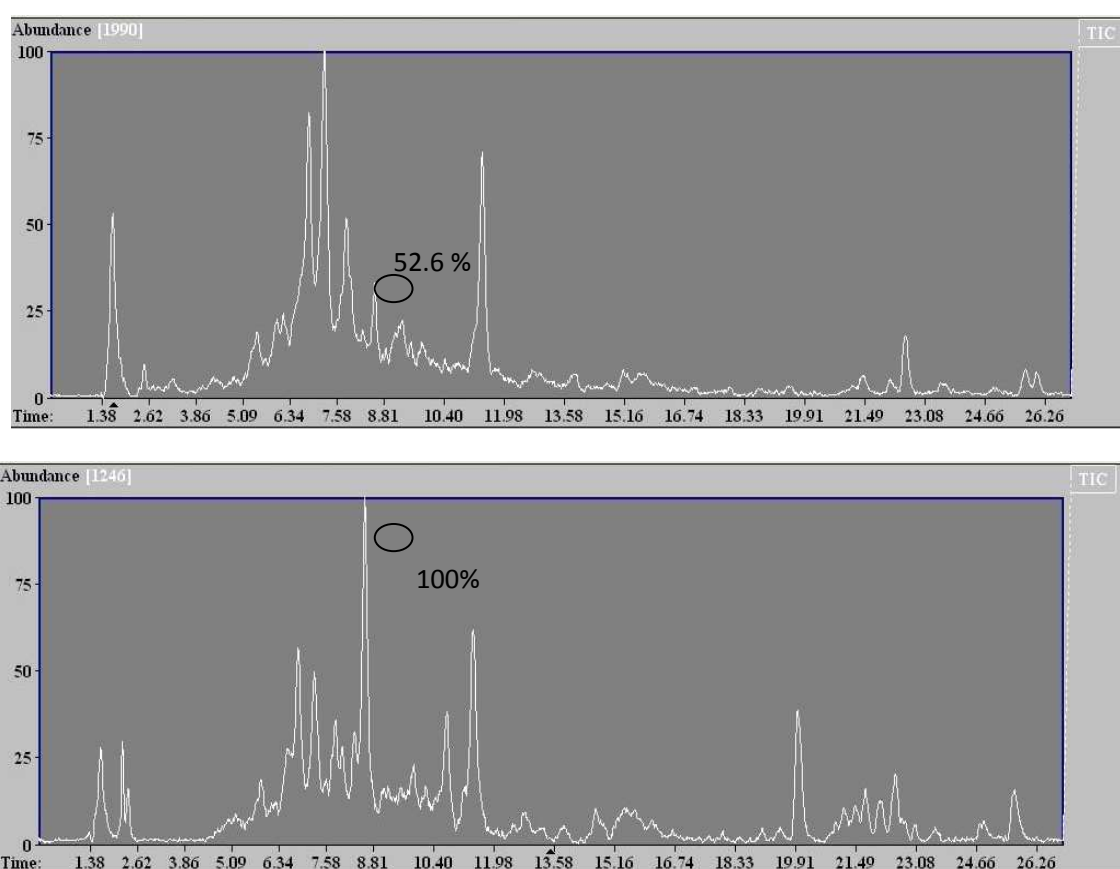


Figura 3. Cromatogramas de los extractos AMS22d7a y AMS22d7f, del séptimo día de extracción a un pH de 5.5 en medio A1 (superior) y medio Avena (inferior) mostrando la diferencia en abundancia relativa para Desferripalmitoilcoprogen (m/e 965).

Es importante mencionar que a diferencia de la cepa AMS22, la cual no presentó una diferencia en la producción de [Thr(2),Leu(5), Ala(10)] ciclosporina (m/e 1176) por

cambios en las condiciones de fermentación, pues mantuvo una abundancia relativa del 20% en promedio, tanto para el medio A1 como para el medio Avena. Con la cepa AMS300 si hubo diferencias ya que en medio A1 las abundancias fueron de 100%, mientras que en medio Avena se redujo a la mitad. Mostrando nuevamente que aun siendo de la misma especie las cepas tienen una producción diferente (Fig. 4).

Tal vez, el cambio de la concentración de los compuestos se deba a que aun cuando, las bacterias presentan genes que codifican para la producción de metabolitos secundarios determinados, si no existen los componentes para su producción, la bacteria no podrá producirlo, y en su lugar tendría que utilizar alguna ruta metabólica alterna y producir otro compuesto que cumpla con el mismo objetivo que debía cumplir el otro metabolito.

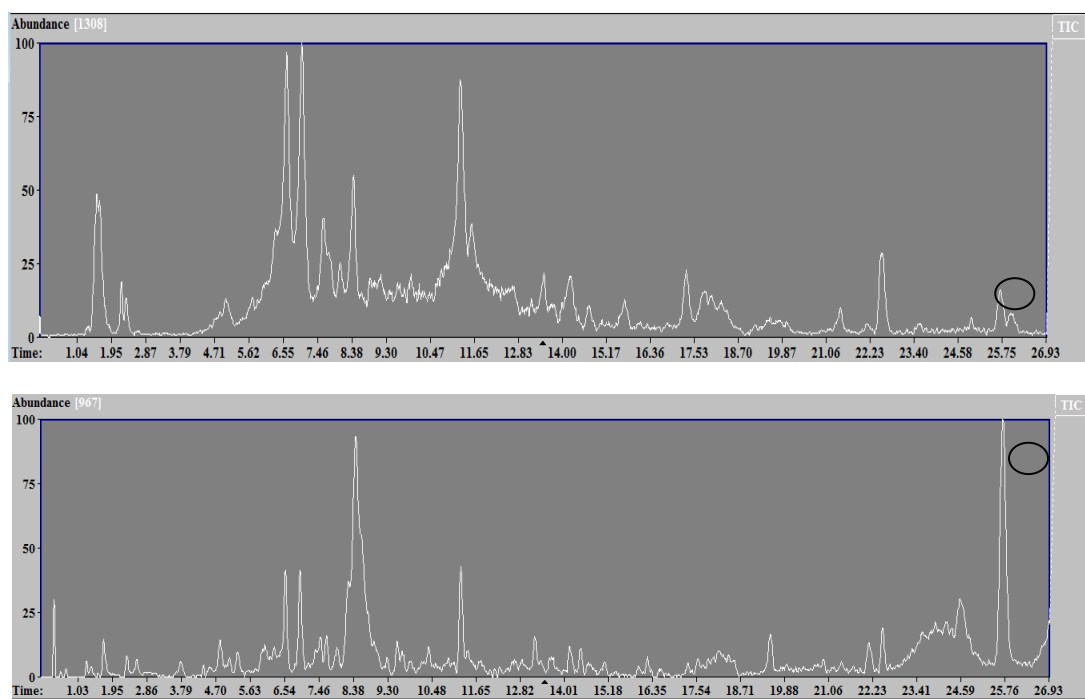


Figura 4. Cromatogramas de los extractos AMS22d10b (superior) y AMS300d10c (inferior) en el décimo día de extracción a un pH de 7.2, ambos en medio A1. Se observa la diferencia en la producción de [Thr(2),Leu(5), Ala(10)] ciclosporina, entre cepas, con abundancias relativas de 22.63% para la cepa AMS22 y del 100% por la cepa AMS300.

Además de las diferencias de concentración (abundancias relativas) de los compuestos entre los medios de cultivo, también se encuentran diferencias entre los días de extracción. Un ejemplo de esto es el compuesto producido por la cepa AMS22 de peso molecular de 662 (m/e) (Fig. 5) que presenta un incremento de concentración a través de los días de cultivo, en medio A1 y pH de 5.5.

Así mismo, también algunos compuestos disminuyeron su concentración a medida que el tiempo del ensayo avanzaba, tal es el caso de Bemnamicina D (1007 m/e) (Fig. 6), producido por AMS300, a pH de 8.5, también en medio A1. La mayor producción se observa a partir del séptimo día de cultivo, llegando a un máximo los días nueve y diez, y decreciendo en el décimo primer día.

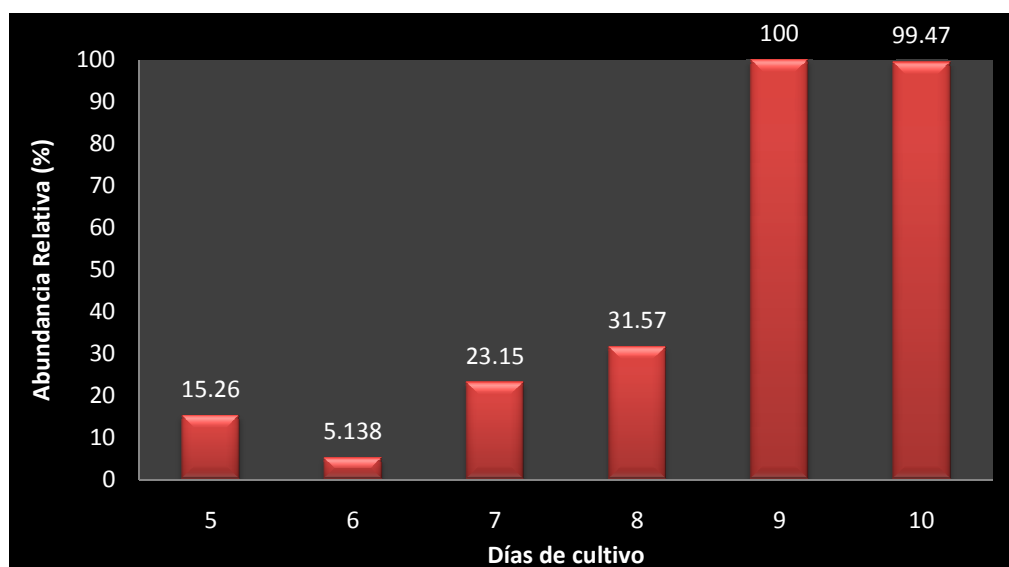


Figura 5. Abundancia relativa del compuesto de peso molecular 662 (m/e), en medio A1 a un pH de 5.5 en los diferentes días de cultivo.

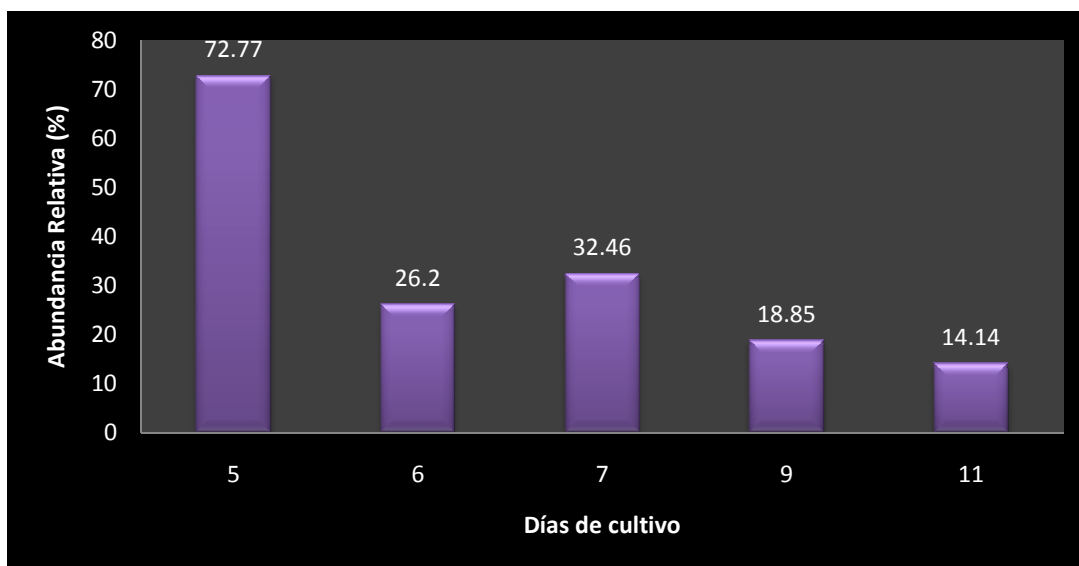


Figura 6. Concentración de Bemnamicina D (1007 m/e), en medio A1 a un pH de 8.5 en los diferentes días de cultivo.

Otros compuestos como el Desferripalmitoicoprogeno (965 m/e), presentan una producción tipo campana, con concentraciones mayores durante los días siete y ocho del ensayo, disminuyendo al inicio y hacia el final del tratamiento, así lo muestra la figura 7.

Algunos compuestos fueron particulares para un sólo día y medio de cultivo por ejemplo, el 4,8-Di-g-hidroxy-meleu-ciclosporina A (m/e 1276) y 3,11-Dihidroxyestaurosporina (m/e 498), pero la mayoría tuvo una evolución a través de los días del ensayo.

Como se mencionó antes, las bacterias comienzan a producir metabolitos secundarios en su fase estacionaria, pues durante la fase de crecimiento toda la energía es utilizada para la multiplicación (Singleton, 2003), cuando se inicia la fase estacionaria la energía es utilizada para sobrevivencia. Por esta razón se decidió comenzar las extracciones el quinto día. La evolución de los compuestos a través de los días del ensayo era variable, mientras algunos se producían en otros se iban degradando.

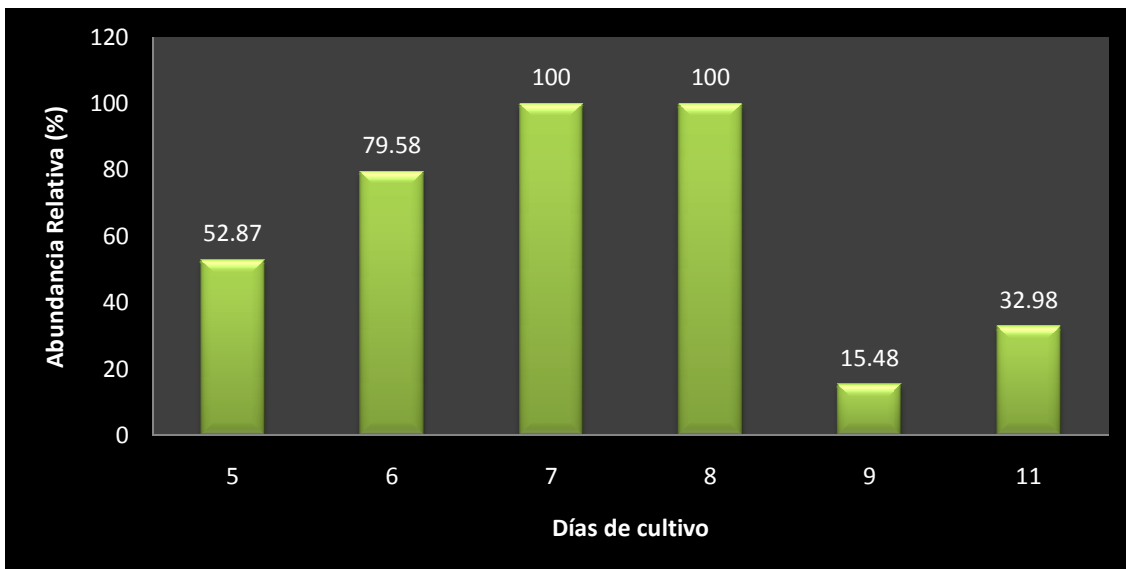


Figura 7. Evolución de la abundancia relativa del compuesto Desferripalmitoicoprogeno (965 m/e), a través de los días de cultivo producido en medio A1, a un pH de 7.2 por la cepa AMS300 en los diferentes días de cultivo.

Efecto del pH

Hablando acerca de las diferencias de producción a los diferentes pH utilizados, la cepa AMS22 presentó una mayor producción de compuestos a un pH de 5.5 en medio A1 y la cepa AMS300 a un pH de 8.5 para el mismo medio. Mientras que en medio Avena, ambas cepas tuvieron mayor producción a pH de 5.5.

Por otro lado, el pH que presentó menor producción de compuestos fue el pH de 6.7 en medio A1 para las dos cepas probadas. Mientras que en medio avena el pH que presentó menor producción fue 7.2, también en las dos cepas.

La cepa que resultó más sensible a los cambios de pH, fue AMS22, pues las diferencias en concentración debido a este cambio son más evidentes. Como en el caso de la Ciclosporina O (1160 m/e) (Fig. 8) que en medios ácidos, tiene mayor concentración que en medios neutros.

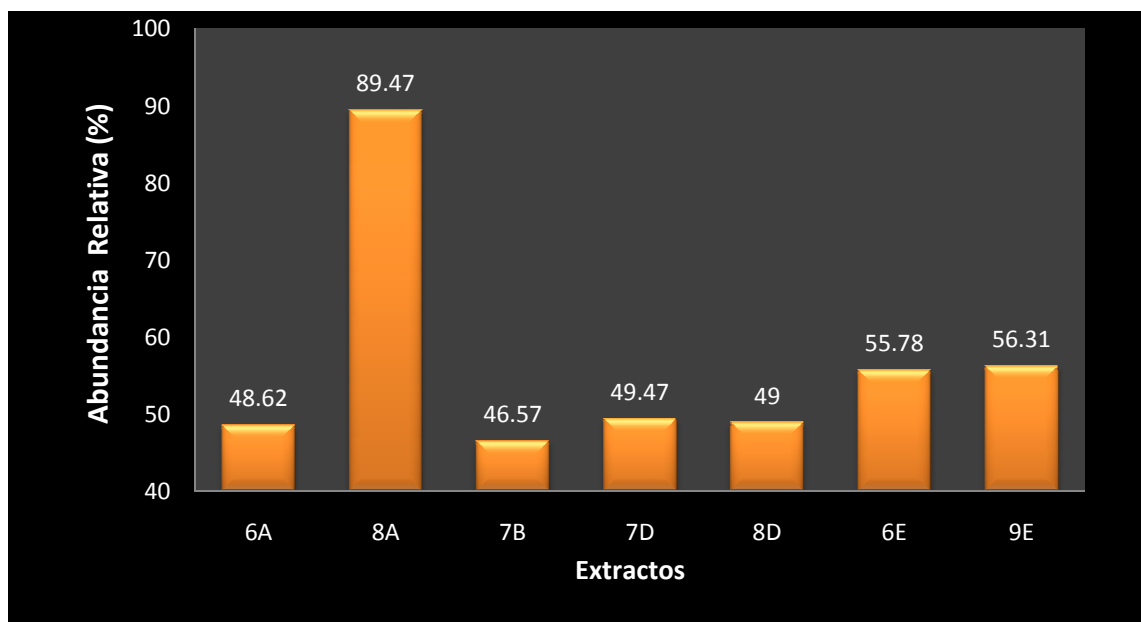


Figura 8. Diferencia en la producción de Ciclosporina O (1160 m/e) por AMS22. Los números se refieren a los días de extracción, mientras que las letras al pH del medio de cultivo. Se observa como a un pH de 5.5 (letra A) la producción es mayor que a pH neutros, de 7.2 y 6.7 (letras B y D respectivamente). La letra E se refiere al pH de 11.

El pH de crecimiento óptimo de *Salinispora sp* se encuentra entre 7 a 12. Por lo que el tratamiento que ejercería un mayor estrés sobre las cepas es el del pH de 5.5, lo que concuerda con la mayor producción de compuestos por la cepa AMS22.

También podría deberse a que a pH's ácidos los principales competidores en el sedimento marino son hongos (Khan & Williams, 1975), y la alta producción de compuestos a pH de 5.5 refleje esta situación.

Sin embargo, con la cepa AMS300 el pH más productivo fue el de 8.5. McClintock (2001) menciona que como consecuencia del metabolismo, el pH del medio de crecimiento suele disminuir durante el cultivo. Así mismo, esta disminución en el pH provocada por el metabolismo de los microorganismos les confiere una ventaja selectiva frente a otros microorganismos competidores. Por lo que probablemente en el caso de la cepa

AMS300, el incremento en la producción de compuestos a pH de 8.5, se deba a un intento de bajar el pH.

También podría ser efecto de la profundidad en que fue colectada la cepa AMS300, debido a que en aguas superficiales el pH tiene a ser ligeramente más ácido, por la productividad del fitoplancton, entonces, un pH de 8.5 en el medio, podría ser un ambiente estresante en el medio. Además ya que en ningún caso el pH de 11 represento un mínimo de producción, sino al contrario presenta concentraciones parecidas al pH de 5.5 y 6.7, los ambientes básicos también ejercen un estrés en las cepas, las cuales responden intentando bajar el pH de su medio para poder sobrevivir.

En general, el pH interno en la mayoría de los microorganismos se encuentra entre 6 y 7. Así que a un pH de 6.7 probablemente *S. arenicola* se encuentra en un ambiente más agradable para su crecimiento, al igual que en un pH neutro, permitiéndole bajar sus defensas lo que deriva en una menor producción de metabolitos secundarios.

METABOLITOS BIOACTIVOS.

Metabolitos reportados como bioactivos.

Dentro de los compuestos bioactivos que se produjeron se encuentran antibióticos de la familia de la rifamicina, simociclinina, arenimicina, naftomicina y bacitracina. También inmunosupresores como la ciclosporina (Fig. 9).

De los 21 compuestos reportados como bioactivos, 15 fueron producidos por la cepa AMS300, y 18 se presentaron en los extractos de la cepa AMS22. Siendo los derivados de la Rifamicina los compuestos dominantes.

Los compuestos bioactivos que estuvieron presentes en la mayoría de los extractos fueron la ciclosporina O (1160 m/e) (Fig. 10), que presentó concentraciones mayores en la cepa AMS22 a comparación de AMS300.

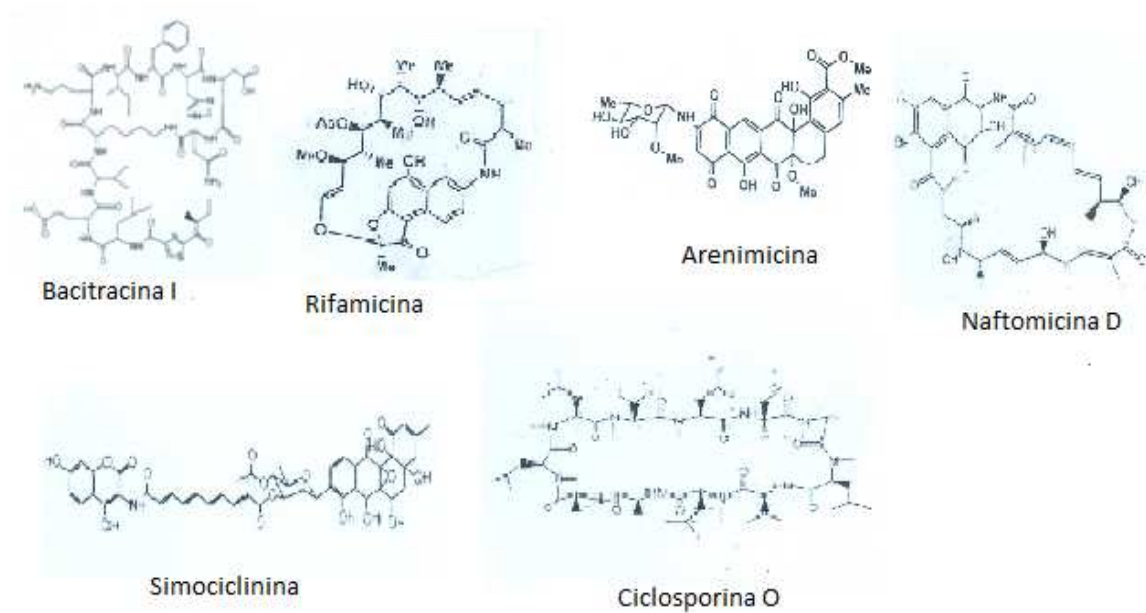


Figura 9. Compuestos bioactivos producidos por *Salinispora arenicola* (AntimarinLit.).

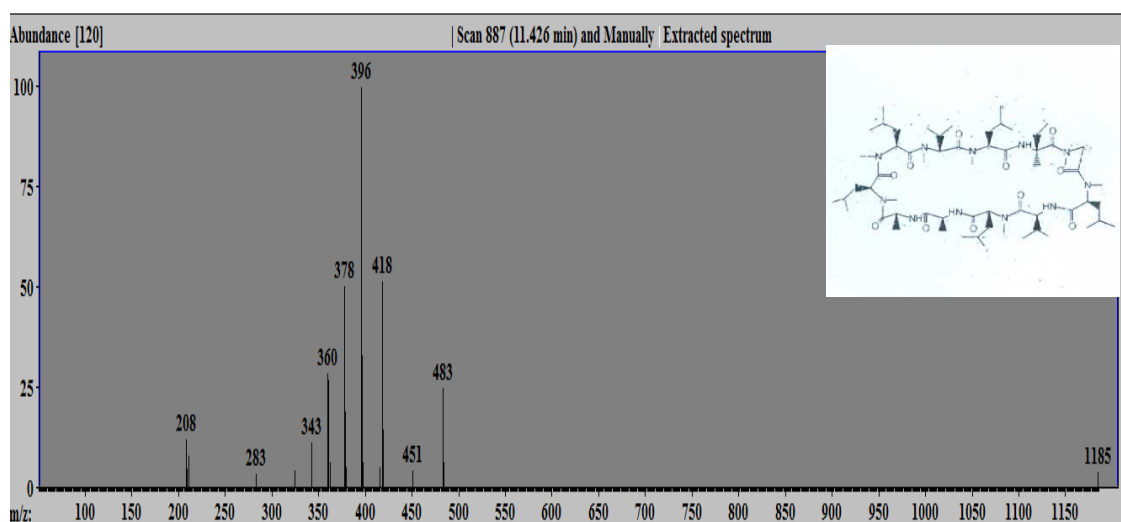


Figura 10. Estructura y patrón de fragmentación de la Ciclosporina O.

Con la cepa AMS300, hubo compuestos que también se vieron afectados por el medio de cultivo como W-hemiacetal-Rifamicina (653 m/e) y [Thr(2),Leu(5), Ala(10)] Ciclosporina (1176 m/e) (Fig. 11 y 13, respectivamente) que tuvieron concentraciones de 100% en medio Avena y A1, respectivamente sin verse realmente afectados por el pH.

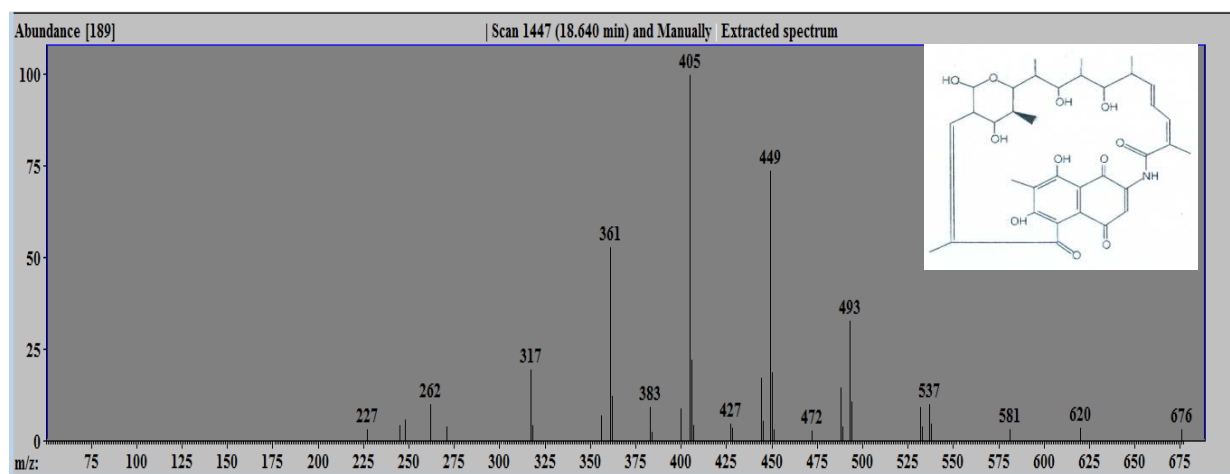


Figura 11. Estructura y patrón de fragmentación de la w-hemiacetal-Rifamicina.

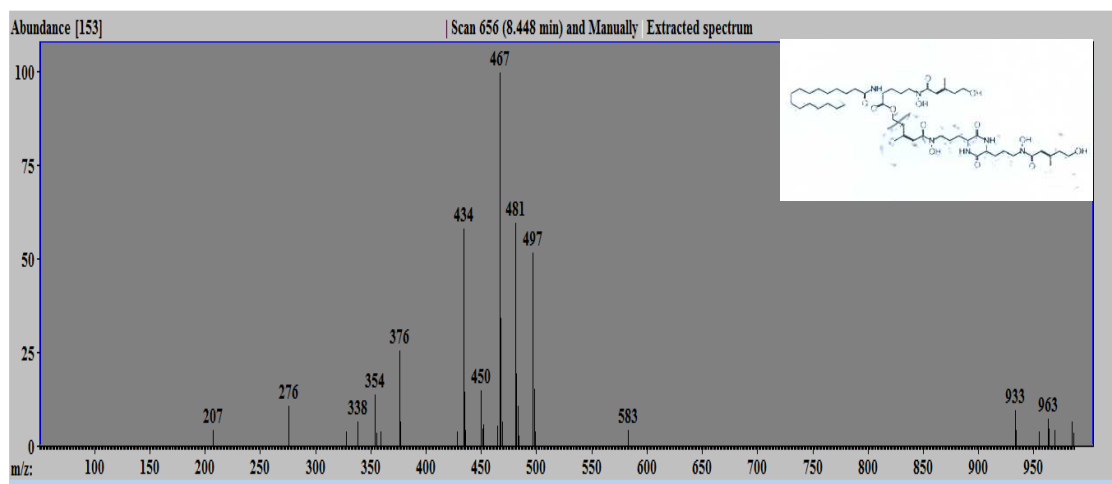


Figura 12. Estructura y patrón de fragmentación del Desferripalmitoicoprogen.

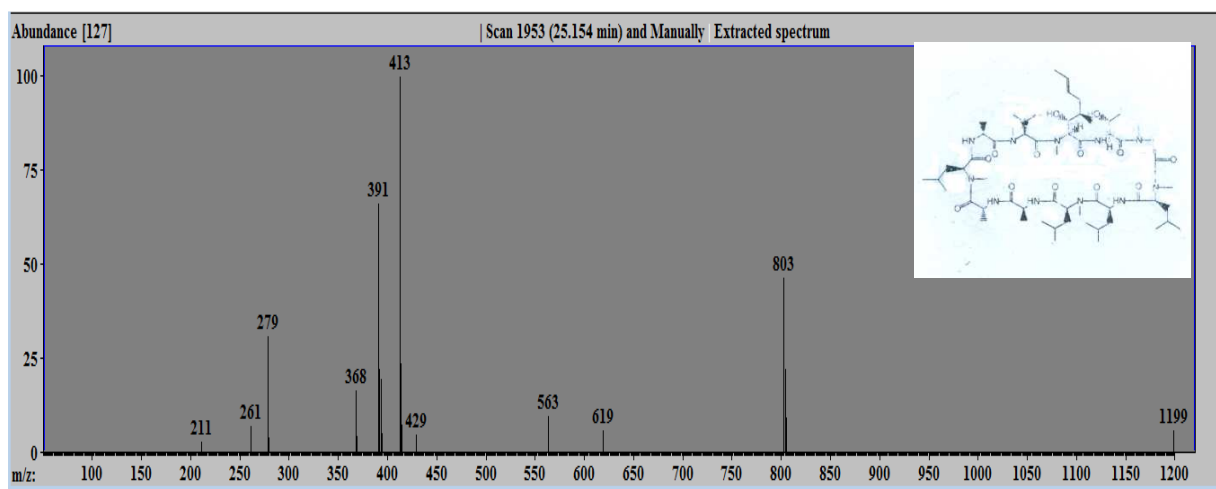


Figura 13. Estructura y patrón de fragmentación de la [Thr(2),Leu(5),Ala(10)] Ciclosporina (1176 m/e)

En el caso de la cepa AMS22 se encontró un compuesto identificado como Desferripalmitoicoprogénico (965 m/e), que tuvo concentraciones del 100% en todos los tratamientos de medio avena, sin haber cambios significativos en su concentración causados por el pH.

Metabolitos de interés para su elucidación.

Una considerable cantidad de compuestos producidos por *Salinispora arenicola*, no pudieron asociarse por peso molecular con los compuestos existentes en la base de datos del Antimarin Lit. Sin embargo, muchos de estos presentaron intensidades relativas menores al 20% y en este escrito solo se presentan los iones moleculares pertenecientes a los compuestos que tuvieron concentraciones mayores al 60% y que se vieron influenciados con los cambios en el medio de cultivo.

Los extractos de la cepa AMS300 presentaron una mayor cantidad de compuestos desconocidos. Un total de 92 compuestos contra 27 de la cepa AMS22. Esto no quiere decir que la cepa AMS22 sea menos productiva, pues, al perderse la mayoría de los extractos en medio Avena para esta cepa, se está subestimando su producción.

Uno de los más importantes es el compuesto con peso molecular de 662 (m/e) y tiempo de retención de 22.5 minutos (Fig.15), pues solamente en el extracto AMS22d9a, presenta una intensidad relativa del 100%. Aun cuando también la cepa AMS300 lo produce, no supera el 30% de abundancia relativa.

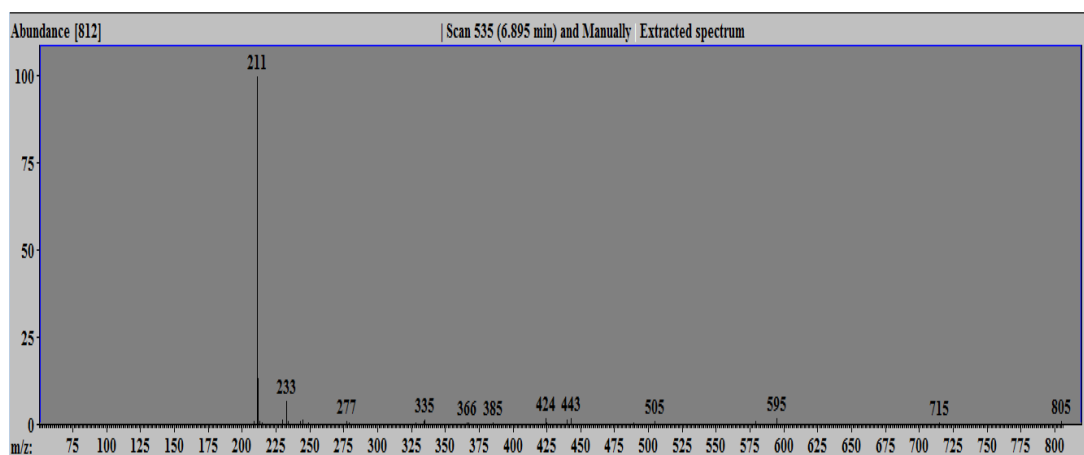


Figura 14. Patrón de fragmentación del compuesto con peso molecular de 782 (m/e) tiempo de retención de 7.2 minutos.

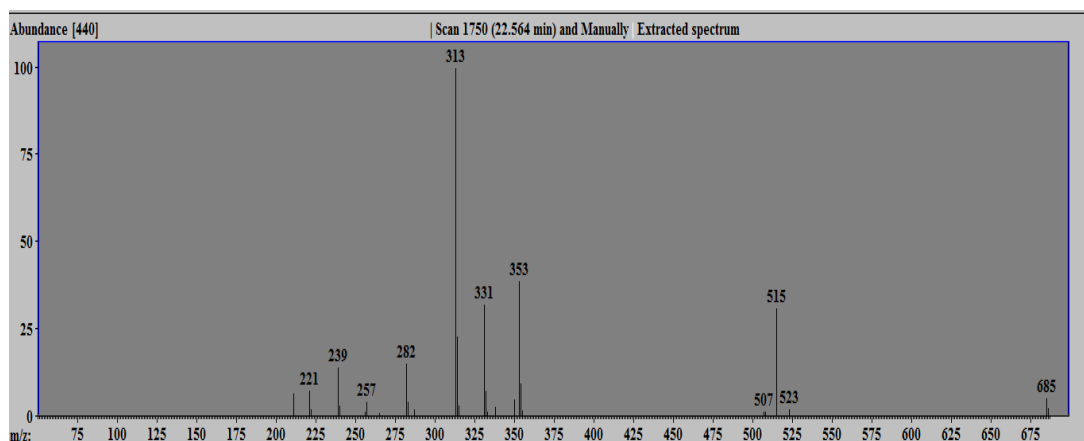


Figura 15. Patrón de fragmentación del compuesto con peso molecular 662 (m/e) y tiempo de retención de 22.6 minutos.

Otros cuyo comportamiento llama la atención fueron los compuestos de peso molecular 782 (m/e) y tiempo de retención de 7.2 minutos y el compuesto de peso 1385 (m/e) y tiempo de retención de 6.86 minutos (Fig. 14 y 16 respectivamente), debido a que en gran

número de extractos producidos por la cepa AMS22 en medio A1 tuvieron el 100% de producción. Lo que no sucedió en medio Avena, ni con los productos de la cepa AMS300. Como se menciona anteriormente, la cepa AMS300 fue la que produjo mayor cantidad de compuestos desconocidos, pero de todos los compuestos producidos sólo unos pocos alcanzaron abundancias relativas mayores al 40% de entre los cuales sobresalen el compuesto de peso molecular de 1423 (m/e) y tiempo de retención de 14.5 minutos (Fig. 19) que alcanza un máximo de 84.8% el sexto día del cultivo en medio A1 y pH de 6.7, pero que no es producido por la cepa AMS22.

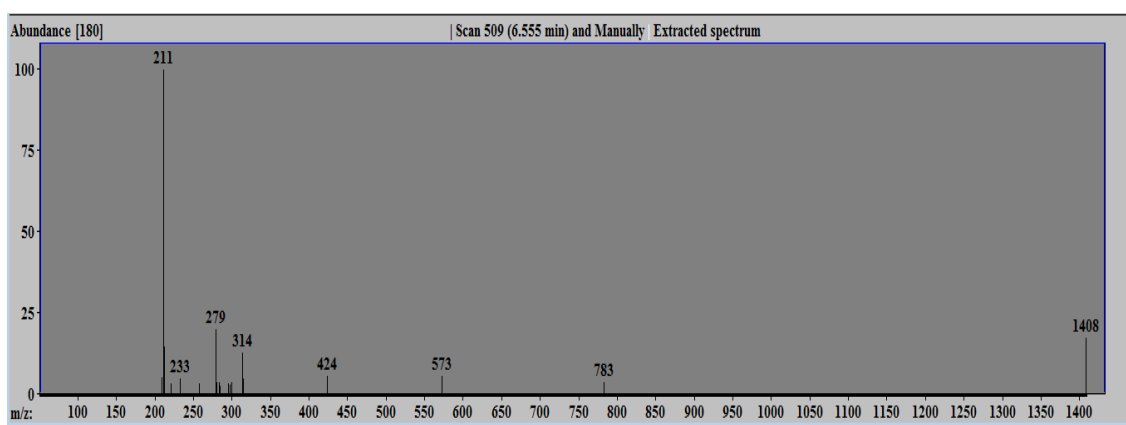


Figura 16. Patrón de fragmentación del compuesto con peso molecular de 1385 (m/e) y tiempo de retención de 6.86 minutos.

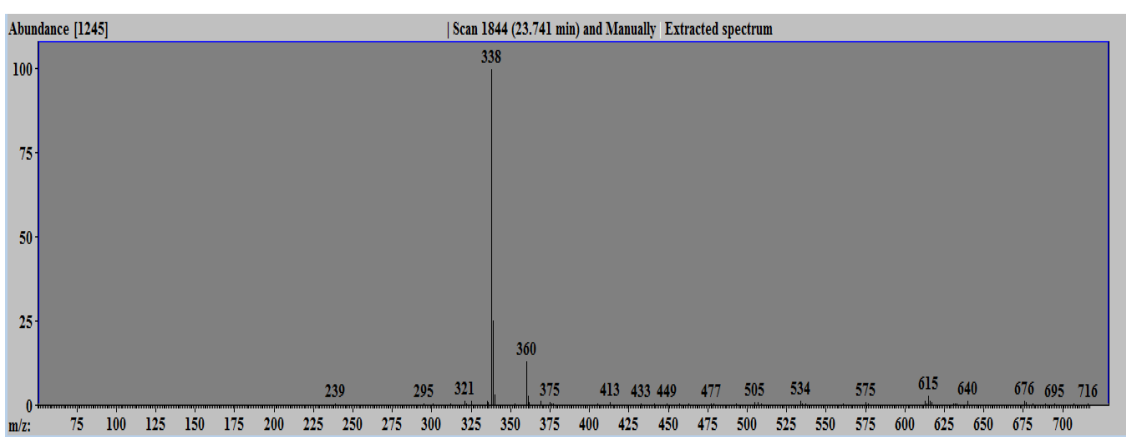


Figura 17. Patrón de fragmentación del compuesto de peso molecular 690 y tiempo de retención de 23.5 minutos.

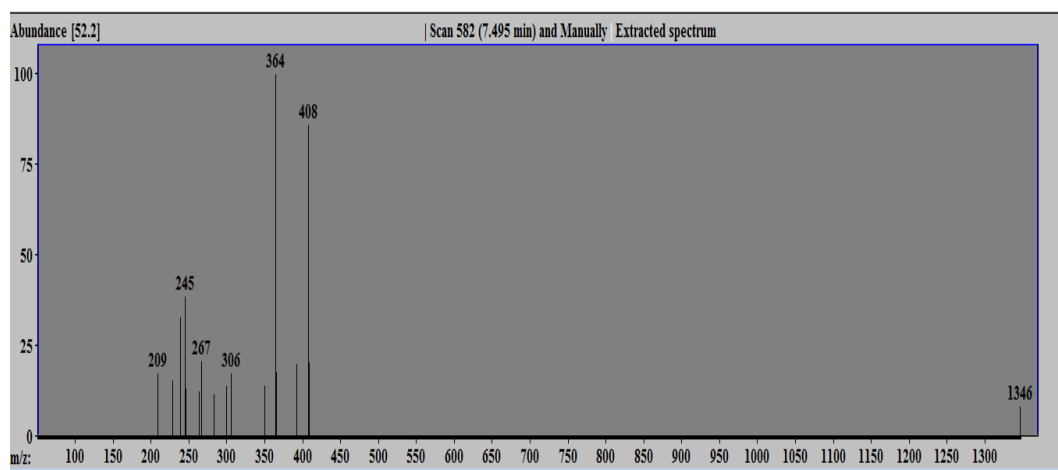


Figura 18. Patrón de fragmentación del compuesto de peso molecular 1323 y tiempo de retención 7.68 minutos.

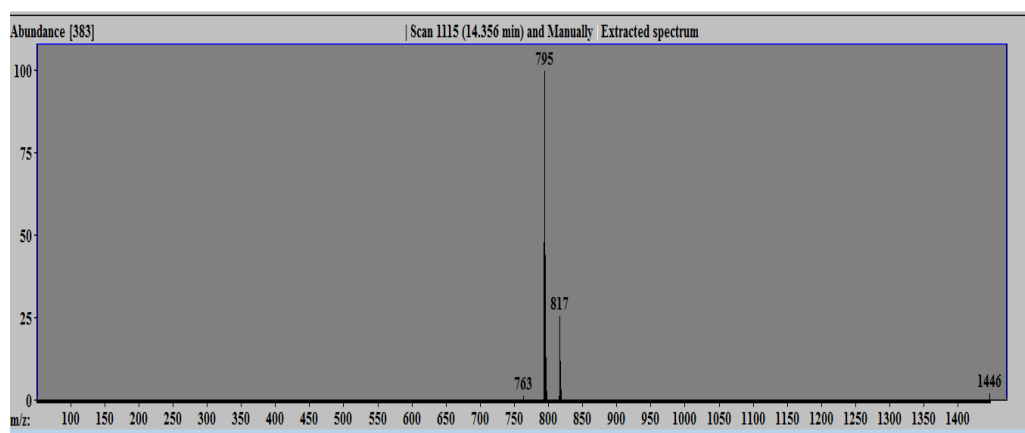


Figura 19. Patrón de fragmentación del compuesto de peso molecular 1423 y tiempo de retención 14.5 minutos.

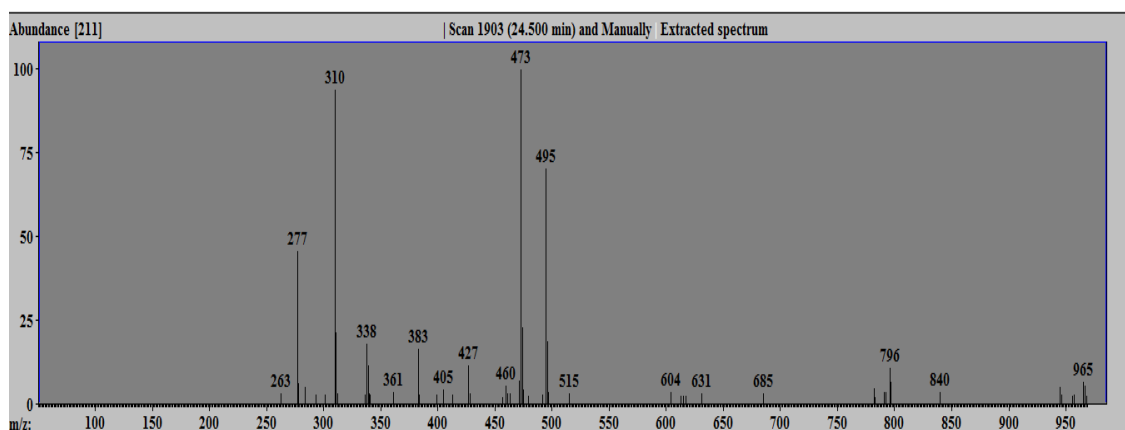


Figura 20. Patrón de fragmentación del compuesto con peso molecular 944 y tiempo de retención 24.8 minutos.

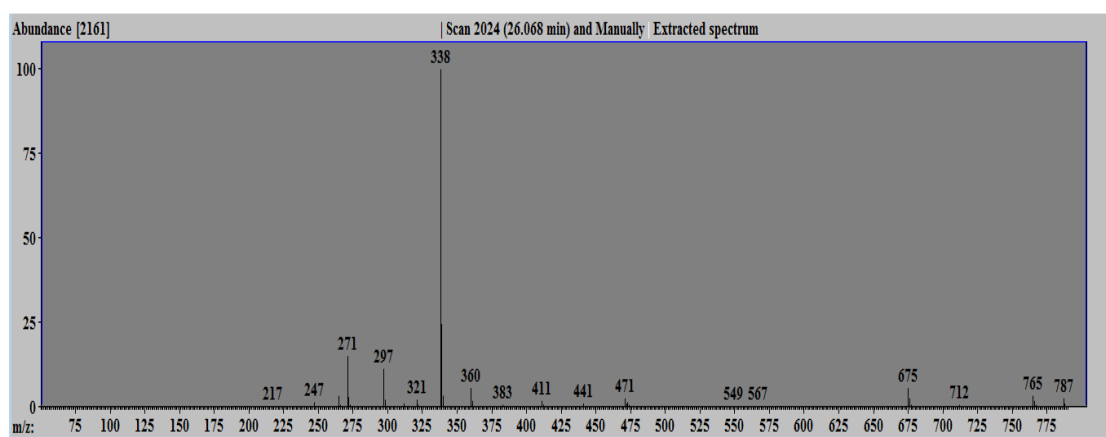


Figura 21. Patrón de fragmentación del compuesto de peso molecular 764 y tiempo de retención de 26.7 minutos.

Otros compuestos que también son exclusivos para la cepa AMS300, son el de peso molecular de 944 (m/e) y tiempo de retención de 24.8 minutos (Fig. 20), con un máximo de 92.7% en medio A1 a un pH de 8.5; y el de 764 (m/e) de peso molecular con un tiempo de retención de 26.7 minutos (figura 21) con intensidades relativas mayores al 50% en medio Avena a pH's de 6.7 en adelante a partir del octavo día. Desgraciadamente, la mayoría de los compuestos fue corrido un tiempo aproximado de 25 minutos, por lo que se puede estar subestimando la presencia de este compuesto.

CONCLUSIONES

1. Se obtuvieron un total de 154 compuestos, 47 para la cepa AMS22 y 107 para la cepa AMS300. De los cuales 21 están reportados como bioactivos.
2. Se observa una diferencia en la producción de metabolitos secundarios entre cepas aun cuando son de la misma especie, señalando una adaptación ecológica de *Salinispora arenicola*.
3. Se observó un efecto en la producción de metabolitos secundarios, por la variación en el pH, siendo la cepa AMS22 la más sensible a estos cambios.
A) Los pH's en los que se observó mayor producción de compuestos fueron: Para la cepa AMS22 el pH de 5.5 en medio A1 y en medio Avena; mientras que para la cepa AMS300 el pH de 8.5 en medio A1 y en medio Avena a pH de 5.5.
B) Por otro lado, los pH's menos productivos fueron en medio A1, el pH de 6.7 y para el medio Avena el pH de 7.2, tanto para la cepa AMS22 como para AMS300.
4. Los cultivos en medio A1 presentaron una mayor cantidad de metabolitos secundarios y abundancias relativas que el medio Avena.
5. Los 21 compuestos reportados como bioactivos son en su mayoría antibióticos derivados de la Rifamicina.
6. La mayoría de los compuestos obtenidos son desconocidos, indicando que las cepas AMS300 y AMS22 de *Salinispora arenicola* son fuente de nuevos compuestos biológicamente activos.

REFERENCIAS

- Anaya Lang A. L. 2003. Ecología Química . PYB México D. F. 349 pp.
- Becerril Espinoza A. 2011. Actinobacterias aisladas del sedimento marino del Golfo de California y de bahía todos santos: diversidad, bioactividad y dominios cetosintetasa. Tesis de Doctorado. UABC, FCM, IIO.
- Berdy J. 2005. Bioactive microbial metabolites . J. Antibiot. 58: 1-26.
- Blunt J. W., Copp B. R., Hu W. P., Munro M. H. G., Northcote P. T., Prinsep M. R. 2008. Marine Natural Products. Nat. Prod. Rep., 25(1): 35-94.
- Feling R. H., Buchanan G. O., Mincer T. J., Kauffman C. A., Jensen P. R., Fenical W. 2003. Salinosporamide A: a highly cytotoxic proteasome inhibitor from a novel microbial source, a marine bacterium of the new genus *Salinospira*. Angew. Chem. Int. Ed. 42: 355-357.b
- Jensen P. R., Dwight R., Fenical W. 1991. Distribution of actinomycetes in near-shore marine sediments. Appl. Environ. Microbiol. 57: 1102-1108.
- Jensen P. R., Fenical W. 1996. Marine bacterial diversity as a resource for novel microbial products. J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 17: 346-351.
- Jensen P.R., Williams P. G., Oh D. C., Zigler L., Fenical W. 2006. Species-Specific Secondary Metabolite Production in Marine Actinomycetes of the Genus *Salinispora*. Appl. Environ. Microbiol. 73(4): 1146-1152.
- Khan M. R., Williams S. T. 1975. Distribution and Characteristics of Acidophilic Actinomycetes. Soil. Biol. Biochem. 7: 345-348.
- Lam K. S. 2006. Discovery of novel metabolites from marine actinomycetes. Ecology and Industrial microbiology. 9: 245-251.

- Magarvey N. A., Keller J. M., Bernan V., Dworkin M., Sherman D. V. 2004. Isolation and Characterization of Novel Marine-Derived Actinomycete Taxa Rich in Bioactive Metabolites. *Appl. Environ. Microbiol.* 70(12): 7520-7529.
- Maldonado L . A., Fenical W., Jensen P. R., Kauffman C. A., Mincer T. J., Ward A. C., Bull A. T., Goodfellow M. 2005. *Salinispora arenicola* gen. nov., sp. nov. and *Salinispora tropica* sp. nov., obligate marine actinomycetes belonging to the family *Micromonosporaceae*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 55: 1759-1766.
- McClintock J. B., Baker B. J. 2001. *Marine Chemical Ecology*. CRC Press LLC. Nueva York. 610 pp.
- Mincer T. J., Fenical W., Jensen P. R. 2005. Culture-Dependent and Culture-Independent Diversity within the Obligate Marine Actinomycete Genus *Salinispora*. *Appl. Environ. Microbiol.* 71(11): 7019-7028.
- Mincer T. J., Jensen P. R., Kauffman C. A., Fenical W. 2002. Widespread and Persistent Populations of a Major New Marine Actinomycete Taxon in Ocean Sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* 68 (10): 5005-5011.
- Newman D. J., Cragg G. M. 2007. Natural Products as source of new drugs over the last 25 years. *J. Nat. Prod.* 70: 461-477.
- Olano C., Méndez C., Salas J. A. 2009. Antitumor Compounds from Marine Actinomycetes. *Review. Mar. Drugs* 7: 210-248.
- Singleton P. 2003. *Bacteria in Biology, Biotechnology and Medicine*. 5º Ed. John Wiley & Sons. Ltd. Baffins Lane, Chinchester, West Sussex, England 515 pp.
- Stackerbrandt E., Rainey F. A., Ward-Rainey N. L., 1997. Proposal for a new hierarchic classification system. *Actinobacteria classsis* nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 47: 479-491.

Williams D. H., Stone M. J., Hauck P. R., Rahman S. K. 1989. Why are secondary metabolites (natural products) biosynthesized? J. Nat. Prod. 52(6): 1189-1208.

Williams PG, Asolkar RN, Kondratyuk T, Pezzuto JM, Jensen PR, Fenical W. 2007a. Saliniketals A and B, bicyclic polyketides from the marine actinomycete *Salinispora arenicola*. J Nat Prod. 70:83-88.

Williams S. T., Lanning S., Wlington M. H., 1984. Ecology of actinomycetes, 481-528. En Magarvey N. A., Keller J. M., Bernan V., Dworkin M., Sherman D. V. 2004. Isolation and Characterization of Novel Marine-Derived Actinomycete Taxa Rich in Bioactive Metabolites. Appl. Environ. Microbiol. 70(12): 7520-7529.

¹<http://www.unavarra.es/genmic/microgral/Tema%2002.%20Cultivo%20de%20microorganismos.pdf>

ANEXO

Tabla II. Abundancia relativa (%) de los compuestos producidos por la cepa AMS22 en medio A1 a un pH de 5.5.

Compuestos	PM	T.R	Días de Cultivo					
			5 (%)	6 (%)	7 (%)	8 (%)	9 (%)	10 (%)
Desconocido	580	24.766				16.31	50	11.58
Rifamicina	625	19.588		7.5				
27-Demethyl-25-desacethylrifamycin-SV	641	17.953						
Desconocido	662	22.575	15.26	5.14	23.15	31.57	100	99.47
Arenimicina	665	20.942				14.21	21.58	
Desconocido	690	23.452				11.56	32.63	33.68
Rifamycin; Rifamycin-SV; Rifacin; NSC-133100/ 16,17-Dihydrorifamycin S	699	18.056		9.48				
Rifamycin B; Nancimycin; C-521-B/ Rifamycin L; Rifamycin SV 4- glycolate	755	12.688	18.42					
Desconocido	763	9.289		30.7				
Desconocido	787	18.687				15.78		
Desconocido	795	21.442			8.42	16.31	27.36	29.47
Desconocido	814	18.779					25.78	
Rifamycin w-hemiacetal	653	17.878					20.53	34.21
Simocyclinone/ Simocyclinone D4	898	15.7			14.21	18.94	21.56	23.16
Desconocido	1084	10.744		31.49		46.84		46.57
Cyclosporin-O	1162	11.413	55.52	90.94	81.31	100	26.31	81.57
[Thr(2),Leu(5), Ala(10)] cyclosporin	1176	25.639	23.68	9.88	17.36		26.31	20.52
Desconocido	1303	14.879					27.37	35.78
Desconocido	1306	15.108			10.53	17.36	28.42	25.26
Desconocido	1321	13.267		31.49	20.52	37.1		
Desconocido	1323	7.68	41.57	48.62	52.36	48.68		58.15
Desconocido	1355	1.642	32.63	31.29	50.78	37.89	27.1	63.42
Desconocido	1365	11.941	24.73					
Bacitracin I1/ I2/ I3	1390	17.35		25.19	21.84	30.78	46.31	68.42
Bacitracin D1/ D2/ D3	1394	14.271		16.2	11.57	27.89	35.79	38.42
Desconocido	1416	13.846	15.78	17.39		23.68	51.57	46.57
Desconocido	1385	6.856	78.15	73.62	78.94	65.78		86.57
Desconocido	782	7.204	100	100	100	89.47		100
Desferripalmitoylcoprogen	965	8.594	42.36	57.48	52.63	57.36	32.89	66.31

Tabla III. Abundancia relativa (%) de los compuestos producidos por la cepa AMS22 en medio A1 a un pH de 7.2

Compuesto	PM	T.R	Días de Cultivo				
			7 (%)	8 (%)	9 (%)	10 (%)	11 (%)
Desconocido	662	22.575	21.05		30.53	28.42	36.31
3,31-Dihydroxyrifamycin S; 1:1-Desoxy-1-oxarifamycin	727	19.562	29.21				
Desconocido	795	21.442	20.26				
Desconocido	919	18.378	64.21	45.78	47.89		
Cyclosporin-O	1162	11.413	56.84	80	51.05	87.36	100
[Thr(2),Leu(5), Ala(10)] cyclosporin	1176	25.639	22.63			16.31	
Desconocido	1323	7.68	46.57	41.57	32.63	37.89	43.15
Desconocido	1355	1.642	35.26	36.31		48.94	37.89
Bacitracin I1/ I2/ I3	1390	17.35				22.63	64.47
Bacitracin H1/ H2/ H3	1406	12.675		48.15			
Desconocido	1385	6.856	97.36	92.1	97.36	96.57	75.7
Desconocido	782	7.204	100	100	100	100	83.68
Desferripalmitoylcoprogen	965	8.594	41.57	47.89	40	55	53.68

Tabla IV. Abundancia relativa (%) de los compuestos producidos por la cepa AMS22 en medio A1 a un pH de 8.5.

Compuesto	PM	T.R	Días de Cultivo			
			8 (%)	9 (%)	10 (%)	11 (%)
Desconocido	662	22.575			52.63	58.68
Desconocido	795	21.442				28.68
Desconocido	814	18.779				
Rifamycin w-hemiacetal	653	17.878				40
Desconocido	1103	11.98	27.89			
Cyclosporin-O	1162	11.413	58.94	79.73	91.05	71.05
Desconocido	1355	1.642	21.57	33.42	45.26	
Desconocido	1415	12.993	27.89			
Desconocido	782	6.354	62.1	66.31	64.21	61.05
Desconocido	1385	6.856	75.26	100	100	100
Desconocido	782	7.204	100	78.42	82.1	82.1
Desferripalmitoylcoprogen	965	8.594	52.63	48.94	69.47	64.21

Tabla V. Abundancia relativa (%) de los compuestos producidos por la cepa AMS22 en medio A1 a un pH de 6.7.

Compuesto	PM	T.R	Días de Cultivo			
			7 (%)	8 (%)	9 (%)	10 (%)
Desconocido	313	2.235			21.47	
Desconocido	580	24.766		21.57		
Desconocido	662	22.575		20		34.21
Desconocido	919	18.378	70			
Cyclosporin-O	1162	11.413	85.75			94.73
Desconocido	1323	7.68	49.47	49		37.36
Desconocido	1355	1.642	36.31	46.31		40
Bacitracin I1/ I2/ I3	1390	17.35	39.47	32.1	23.68	
Desconocido	1415	12.993	68.42			
Desconocido	1385	6.856	90	87.36		81.57
Desconocido	782	7.204	100	100		100
Desferripalmitoylcoprogen	965	8.594	55.26	49.21		

Tabla VI. Abundancia relativa (%) de los compuestos producidos por la cepa AMS22 en medio A1 a un pH de 11.

Compuesto	PM	T.R	Días de Cultivo			
			5 (%)	6 (%)	7 (%)	9 (%)
Desconocido	313	2.235	51.31	32.63	58.12	18.68
Desconocido	1473	6.006				41.57
Desconocido	580	24.766				10.52
Rifamicina	625	19.588	10			
27-Demethyl-25-desacetyl-rifamycin-SV	641	17.953				13.16
Desconocido	662	22.575		6.84		
Arenimicina	665	20.942				13.16
Rifamycin B; Nancimycin; C-521-B/ Rifamycin L; Rifamycin SV 4- glycolate	755	12.688	12.1			
Desconocido	795	21.442		10		
Simocyclinone/ Simocyclinone D4	898	15.7		17.36		
[Thr(2),Leu(5), Ala(10)] cyclosporin	1176	25.639	26.84	5.8		40.52
4,8-Di-g-hydroxy-Meleu-cyclosporin A	1276	11.156	33.15			
Desconocido	1323	7.68	48.94	55.78		56.31
Desconocido	1355	1.642	31.57	46.05		24.73
Desconocido	1385	6.856	70	68.42		66.05
Desconocido	782	7.204	100	100		100

Tabla VII. Abundancia relativa (%) de los compuestos producidos por la cepa AMS22 en medio Avena a pH de 5.5 a través de los días de cultivo.

Compuesto	PM	T.R	Días de Cultivo				
			6 (%)	7 (%)	8 (%)	10 (%)	11 (%)
Desconocido	313	2.235	34.5	22	19.9	16.9	56
Desconocido	686	21.59				15.3	
Desconocido	651	9.515				41.4	22.8
Rifamycin R	709	19.961		29			
Desconocido	1084	10.744		44			
Desconocido	1124	14.258		39			
Cyclosporin-O	1162	11.413	40.8	65			
[Thr(2),Leu(5), Ala(10)] cyclosporin	1176	25.639		24		75.3	
Desconocido	1319	12.817	55.3				
Desconocido	1323	7.68		31			
Desconocido	1355	1.642	42.1			31.4	41.9
Bacitracin I1/ I2/ I3	1390	17.35	13.2	28			
Bacitracin F; Bacitracin X	1418	17.837		29			
Desconocido	782	6.354				12.2	
Desconocido	1385	6.856	42.6	43		8.23	27.8
Desconocido	782	7.204	40	42		7.83	35.1
Desferripalmitoylcoprogen	965	8.594	100	100		100	100

Tabla VIII. Abundancia relativa (%) de los compuestos producidos por la cepa AMS22 en medio Avena a pH de 6.7 a través de los días de cultivo.

Compuesto	PM	T.R	6.7			
			6 (%)	7 (%)	9 (%)	11 (%)
Desconocido	313	2.235	20.5			56
Desconocido	690	23.452				37.7
Desconocido	931	13.57			60.7	19.4
Desconocido	1124	14.258		23.7		
Cyclosporin-O	1162	11.413	35	50.5	95.8	28.3
[Thr(2),Leu(5), Ala(10)] cyclosporin	1176	25.639	21.6		29.3	25.3
Desconocido	1323	7.68			91.6	
Desconocido	1355	1.642	23.9	21.1	44	41.9
Bacitracin I1/ I2/ I3	1390	17.35	6.3	20		
Desconocido	782	6.354			100	
Desconocido	1385	6.856	28.7	35.8	88.5	35.1
Desconocido	782	7.204	29.5	32.9		
Desferripalmitoylcoprogen	965	8.594	100	100	76.4	100

Tabla IX. Abundancia relativa (%) de los compuestos producidos por la cepa AMS22 en medio Avena a pH de 7.2 y 8.5 a través de los días de cultivo.

Compuesto	PM	T.R	Ph			
			7.2	8.5		
			7 (%)	6 (%)	8 (%)	10 (%)
Desconocido	686	21.59				27.7
Desconocido	840	22.028				14.7
Desconocido	651	9.515				46.6
Rifamycin W / 13-Hydroxyprotorifamycin I/ 30-Hydroxyprotorifamycin I	655	16.73		16.3		
Desconocido	662	22.575				13.1
Desconocido	690	23.452				100
Desconocido	763	9.289			11	
Desconocido	1124	14.258	27.89			
Cyclosporin-O	1162	11.413	87.36	100	49.2	46.6
[Thr(2),Leu(5), Ala(10)] cyclosporin	1176	25.639	26.84	31.6	66	89
Desconocido	1306	15.108		16.8		
Desconocido	1323	7.68			20.9	
Desconocido	1350	13.447	33.15	21.1		
Desconocido	1355	1.642	16.31			
Bacitracin I1/ I2/ I3	1390	17.35	48.42	26.8		
Desconocido	1415	12.993		32.6		
Desconocido	1416	13.846		15.8		
Desconocido	782	6.354				21.2
Desconocido	1385	6.856			35.1	29.8
Desconocido	782	7.204	53.42			13.6
Desferripalmitoylcoprogen	965	8.594	100	89.5	100	96.6

Tabla X. Abundancia relativa (%) de los compuestos producidos por la cepa AMS300 en medio A1 a pH de 5.5.

Compuesto	PM	T.R	Días de Cultivo			
			7 (%)	9 (%)	10 (%)	11 (%)
Rifamycin R	709	19.961			8.32	
Desconocido	772	15.81	19.11	17.8	43.97	10.47
Desconocido	795	21.442	11.52	16.23	42.56	
Desconocido	798	11.691			29.08	
Desconocido	812	19.776	10.47			
Desconocido	840	22.221			15.18	
Desconocido	853	10.648			11.51	
Desconocido	886	17.575				9.42
Desconocido	940	23.341			14.66	12.04
Desconocido	944	24.757			16.75	15.18
Desconocido	916	24.101			16.23	11.52
Desconocido	948	8.962			26.96	
Desconocido	964	8.833			26.96	
Desferripalmitoylcoprogen	965	8.594	17.54		30.36	
Desconocido	988	18.378	22.77	21.98	25.91	
Beminamycin D	1006	9.644		18.32	25.65	
Desconocido	1034	11.472			35.17	
Cyclosporin-O	1162	11.413	38.48	39.26	57.59	72.25
[Thr(2),Leu(5), Ala(10)] cyclosporin	1176	25.639	100		100	100
Desconocido	1177	2.088			14.14	
Desconocido	1179	3.31			15.18	
Desconocido	1182	2.525			14.65	
4,8-Di-g-hydroxy-Meleu-cyclosporin A	1278	13.635		19.11	30.89	9.42
Desconocido	1306	1.431			31.41	
8-Deoxyrifamycin S	1323	7.68		58.9		
Desconocido	1355	1.642	63.07			
Desconocido	1362	16.866	16.75	18.85	29.05	8.9
Desconocido	1368	5.461		20.42		
Desconocido	1371	3.941			26.43	
Desconocido	1385	6.856	10.47	65.18	16.49	
Desconocido	1411	2.268		82.19		
Desconocido	1417	2.384			47.67	
Desconocido	1423	14.472	36.13	19.37		8.4

Tabla XI. Abundancia relativa (%) de los compuestos producidos por la cepa AMS300 en medio A1 a pH de 5.5 (Continuación).

Compuesto	PM	T.R	Días de Cultivo			
			7 (%)	9 (%)	10 (%)	11 (%)
Desconocido	1429	1.264			15.7	
Desconocido	1442	0.285			15.12	
Desconocido	1450	4.673		46.86		
Desconocido	1456	5.1		37.17	11.51	
Desconocido	692/782	7.204		14.13	23.29	

Tabla XII. Abundancia relativa (%) de los compuestos producidos por la cepa AMS300 en medio A1 a pH de 6.7.

Compuesto	PM	T.R	Días de cultivo		
			9 (%)	10 (%)	11 (%)
Desconocido	772	15.81	20.31	12.56	16.75
Desconocido	853	10.648	21.35		14.14
Desconocido	886	17.575	14.06		13.6
Desconocido	948	8.962	16.14	21.98	
Desferripalmitoylcoprogen	965	8.594	22.92	18.32	19.57
Desconocido	988	18.378	14.06		12.56
Bemnamycin D	1006	9.644	18.23	14.14	14.14
Cyclosporin-O	1162	11.413	29.16	16.75	32.98
Desconocido	1167	3.246			
[Thr(2),Leu(5), Ala(10)] cyclosporine	1176	25.639	81.77	100	100
4,8-Di-g-hydroxy-Meleu-cyclosporin A	1278	13.635	19.27	15.18	16.23
Desconocido	1297	3.941			
Desconocido	1303	2.156	64.06		
8-Deoxyrifamycin S	1323	7.68	14,23	9.95	11.52
Desconocido	1362	16.866			13.1
Desconocido	1385	6.856	12.5	17.8	
Bacitracin I1/ I2/ I3	1390	17.35			
Bacitracin D1/ D2/ D3	1394	14.271	15.1		
Desconocido	1423	14.472	15.1	17.27	21.98
Desconocido	1445	3.942	100		
Desconocido	1450	4.673	22.96		
Desconocido	1452	2.693	56.25		
Desconocido	1475	1.573	70.83		
Desconocido	692/782	7.204	15.63	11.52	

Tabla XIII. Abundancia relativa (%) de los compuestos producidos por la cepa AMS300 en medio A1 a pH de 7.2.

Compuesto	PM	T.R	Días de cultivo						
			5 (%)	6 (%)	7 (%)	8 (%)	9 (%)	10 (%)	11 (%)
Rifamycin W / 13-Hydroxyprotorifamycin I / 30-Hydroxyprotorifamycin I	655	16.73					17.26		
Desconocido	772	15.81							14.34
Desconocido	782	6.354					36.9		
Desconocido	795	21.442						13.11	12.56
Desconocido	799	19.325		12.56	12.04	22.51		16.23	
Desconocido	802	12.515	21.46	34.03	17.27	19.89	16.66		
Desconocido	840	22.221		18.32			22.62	18.85	
Desconocido	853	10.648	24.08 1	28.27	21.98	23.04	31.54		17.27
Desconocido	886	17.575					11.3		30.36
Desconocido	898	22.575							10.47
Desconocido	940	23.341		13.61					
Desconocido	944	24.757					11.01	29.84	
Desconocido	948	8.962					11.9	12.67	23.03
Desferripalmitoylcoprogen	965	8.594	52.87	79.58	100	100	15.48		32.98
Desconocido	988	18.378	10.99	44.5	16.23	29.32	11.3	9.95	12.04
Bemnamycin D	1006	9.644	54.45		26.7	25.13			22.51
Desconocido	1157	20.741		25.65	10.99	12.04			
Cyclosporin-O	1162	11.413	40.83	65.99 6	47.64	67.03	58.92	42.4	40.83
[Thr(2),Leu(5), Ala(10)] cyclosporin	1176	25.639	70.68	100	65.44	94.24	62.5	100	100
4,8-Di-g-hydroxy-Meleu-cyclosporin A	1278	13.635			15.18	21.98	19.05	15.18	93.71
Desconocido	1316	0.375						29.58	
8-Deoxyrifamycin S	1323	7.68		26.18			15.19	15.18	18.84
Desconocido	1355	1.642	18.32	18.32	40.83	13.35	22.02	14.39	32.46
Desconocido	1362	16.866							11.52
Desconocido	1368	5.461					12.51		
Desconocido	1385	6.856	100		49.63	28.27	15.48	41.36	20.94
Bacitracin D1/ D2/ D3	1394	14.271					14.28	11.78	
Desconocido	1423	14.472		84.82	44.5	56.28	9.52	10.99	
Desconocido	1450	4.673		53.14	26.7	28.79	55.35		
Desconocido	1452	2.693					100		
Desconocido	1456	5.1		70.15	31.41		15.47		
Desconocido	1473	6.006					14.88		
Desconocido	782	7.204			47.64	19.63	17.86	41.1	19.89

Tabla XIV. Abundancia relativa (%) de los compuestos producidos por la cepa AMS300 en medio A1 a pH de 8.5.

Compuesto	PM	T.R	Días de cultivo						
			5 (%)	6 (%)	7 (%)	8 (%)	9 (%)	10 (%)	11 (%)
Rifamycin Z; Rifamycin W-lactone	651	9.515							17.8
Rifamycin W / 13-Hydroxyprotorifamycin I/ 30-Hydroxyprotorifamycin I	655	16.73				10.99			
Desconocido	764	26.715					12.57		
Desconocido	772	15.81	12.56						14.92
Desconocido	662	20.942				25.13			
Desconocido	782	6.354						23.56	
Desconocido	795	21.442			28.27				
Desconocido	798	11.691	25.65	12.82	52.02		47.64		
Desconocido	799	19.325				17.8			12.04
Desconocido	802	12.515		14.66	23.03	21.46	10.99	15.7	56.54
Desconocido	812	19.776				23.04			
Desconocido	824	13.287						23.56	
Desconocido	847	12.18						15.18	42.4
Desconocido	853	10.648	20.94	15.7	23.03				10.47
Desconocido	886	17.575		17.97					11.52
Desconocido	898	22.575	16.23		12.56	17.8	45.81		24.08
Desconocido	934	15.09						13.61	15.18
Desconocido	940	23.341			26.18	18.06			
Desconocido	944	24.757			14.14	27.22	92.67		
Desconocido	948	8.962	38.74	31.41	40.31	62.3	42.4	19.89	15.18
Desconocido	960	7.932	50.78		31.93	26.18	50.7	26.78	19.1
Desconocido	964	8.833						21.47	

Tabla XV. Abundancia relativa (%) de los compuestos producidos por la cepa AMS300 en medio A1 a pH de 8.5. (Continuación).

Compuesto	PM	T.R	Días de cultivo						
			5 (%)	6 (%)	7 (%)	8 (%)	9 (%)	10 (%)	11 (%)
Desconocido	964	8.833						21.47	
Desferripalmitoylcoprogen	965	8.594	57.59	79.05	100		46.11	52.1	33.5
Desconocido	988	18.378			11.52	18.85	11.52		
Bemnamycin D	1006	9.644	72.77	26.2	32.46		18.85		14.14
Cyclosporin-O	1162	11.413	80.1	83.77	80.62	46.07	61.25	100	95.28
[Thr(2),Leu(5), Ala(10)] cyclosporin	1176	25.639	100	100	25.49	100	100	74.6	100
4,8-Di-g-hydroxy-Meleu-cyclosporin A	1278	13.635	15.71	13.1	34.04	18.05	11.51	24.6	100
Desconocido	1319	12.817						16.75	
8-Deoxyrifamycin S	1323	7.68	44.5			21.98	39.26	23.13	18.85
Desconocido	1355	1.642	19.85	18.85	23.03	18.85	42.4	20.16	17.8
Desconocido	1362	16.866							14.66
Desconocido	1385	6.856	67.56			21.98	31.93	30.14	13.61
Bacitracin I1/ I2/ I3	1390	17.35							20.16
Bacitracin D1/ D2/ D3	1394	14.271						23.29	
Desconocido	1423	14.472	12.56	39.8	55.49	42.93	37.17		
Desconocido	1445	3.942				17.8	16.75		
Desconocido	1450	4.673	43.45	21.98	52.35	21.98	15.7		10.99
Desconocido	1452	2.693	25.65	11.52	25.65	13.61	91.62		
Desconocido	1456	5.1		22.51					
Desconocido	1473	6.006					17.27		
Desconocido	692/78 2	7.204	69.11	25.13	44.05	18.85			16.75

Tabla XVI. Abundancia relativa (%) de los compuestos producidos por la cepa AMS300 en medio A1 a pH de 11.

Compuesto	PM	T.R	Días de cultivo					
			5 (%)	6 (%)	7 (%)	8 (%)	9 (%)	11 (%)
Desconocido	690	23.452			12.56		59.162	21.98
Rifamycin S/8-Deoxy-3-hydroxyrifamycin S	695	22.853		11.52	21.2			
3,31-Dihydroxyrifamycin S; 1:1-Desoxy-1-oxarifamycin	727	19.562	11.52		20.42	29.31		
Desconocido	764	26.715	16.75					
Desconocido	662	20.942					23.56	17.28
Desconocido	782	6.354	14.92					
Desconocido	795	21.442	15.78	9.42	19.63			
Rifamycin w-hemiacetal	653	17.878			100	100	100	100
Desconocido	853	10.648	23.04		12.04			
Desconocido	898	22.575		12.56	17.27	18.48	19.89	18.84
Desconocido	941	9.361						21.98
Desconocido	948	8.962	15.18					
Desconocido	960	7.932						13.1
Desferripalmitoylcoprogen	965	8.594			16.23		18.32	
Desconocido	988	18.378	16.23					
Bemnamycin D	1006	9.644	17.01			33.5	13.61	18.32
Desconocido	1032	3.774	30.36					
Desconocido	1099	2.912	23.56					
Desconocido	1100	3.246	47.12					
Desconocido	1106	2.268	59.16					
Cyclosporin-O	1162	11.413	14.66		10.99	12.04		
Desconocido	1167	3.246	61.78					
[Thr(2),Leu(5), Ala(10)] cyclosporin	1176	25.639	100	51.3	53.4	54.45	40.83	31.9
Desconocido	1251	2.796	20.42					
8-Deoxyrifamycin S	1323	7.68	36.12					
Desconocido	1336	24.423	20.94				20.42	
Desconocido	1346	1.56	38.74					
Desconocido	1385	6.856	11.25				12.56	
Desconocido	1422	1.032	13.61					
Desconocido	1436	3.98	13.6		17.8	12.04		
Desconocido	1450	4.673	13.6					
Desconocido	1454	0.71	57.69					
Desconocido	692/782	7.204	13.01				9.68	

Tabla XVII. Abundancia relativa (%) de los compuestos producidos por la cepa AMS300 en medio Avena a pH de 5.5.

Compuesto	PM	T.R	Días de cultivo					
			5 (%)	6 (%)	7 (%)	8 (%)	9 (%)	11 (%)
Rifamycin R	709	19.961	10.5	8.64			18.9	17.3
3,31-Dihydroxyrifamycin S; 1:1-Desoxy-1-oxarifamycin	727	19.562	25.7	20.9	22			
Desconocido	770	21.23					15.7	
Desconocido	782	6.354	23.6					
Desconocido	798	11.691	16.2				15.7	
Desconocido	819	0.865	36.6					
Desconocido	840	22.221			11			11.5
Rifamycin w-hemiacetal	653	17.878		100	100	26.2	100	100
Desconocido	853	10.648	32.9					29.3
Desconocido	888	23.277	60.2	17.3			10.5	13
Desconocido	898	22.575	31.4	7.85	17			13
Desconocido	899	6.696				12		10.5
Desconocido	944	24.757	28.3				12	11
Desconocido	960	7.932	30.9	10.5	16			23.6
Desferripalmitoylcoprogen	965	8.594	17.8					24.1
Desconocido	988	18.378	34					
Desconocido	992	9.541			17		17.8	
Desconocido	1002	9.915			13		21.5	31.9
Desconocido	1098	0.182				26.7		
Desconocido	1102	2.873				18.3		
Desconocido	1106	2.268				100		
Desconocido	1143	23.973	51.3	15.2				
Desconocido	1151	6.284		10.5				
Cyclosporin-O	1162	11.413	35.6	14.1	15		21.5	36.7
Desconocido	1167	3.246						
[Thr(2),Leu(5), Ala(10)] cyclosporin	1176	25.639	100	34.4	57		35.1	25.8
Desconocido	1186	3.8	23.6					
Desconocido	1188	2.628				34		
Desconocido	1230	2.216	24.6					
Desconocido	1242	2.989				21.5		
4,8-Di-g-hydroxy-Meleu-cyclosporin A	1278	13.635						15.7
Desconocido	1297	3.941	21.5					
Desconocido	1304	4.122				15.7	22	
Desconocido	1309	1.62				33.2		

Tabla XVIII. Abundancia relativa (%) de los compuestos producidos por la cepa AMS300 en medio Avena a pH de 5.5. (Continuación)

Compuesto	PM	T.R	Días de cultivo					
			5 (%)	6 (%)	7 (%)	8 (%)	9 (%)	11 (%)
Desconocido	1309	1.62				33.2		
Desconocido	1313	3.118	19.4					
Desconocido	1319	12.817						17.3
8-Deoxyrifamycin S	1323	7.68						
Desconocido	1324	4.855	15.2					
Desconocido	1332	3.632				35.6	21.7	
Desconocido	1334	3.774				22.8		
Desconocido	1336	24.423					12.6	11.5
Desconocido	1349	3.388				32.5		
Desconocido	1355	1.642			15			
Desconocido	1384	0.723				12.6		
Desconocido	1385	6.856	18.3					
Desconocido	1417	2.384				59.2	37.2	
Desconocido	1423	14.472						12.6
Desconocido	1432	3.195				51.3		
Desconocido	1448	0.517				26.4		
Desconocido	1449	0.929				16.8		
Desconocido	692/782	7.204	15.7					14.7

Tabla XIX. Abundancia relativa (%) de los compuestos producidos por la cepa AMS300 en medio Avena a pH de 6.7.

Compuesto	PM	T.R	Dias de cultivo						
			5 (%)	6 (%)	7 (%)	8 (%)	9 (%)	10 (%)	11 (%)
Naphthomycin D	701	21.59	11						
Rifamycin R	709	19.961	32.5	24.1		34.7	11.5		16.8
Desconocido	736	20.175		22.5	11				
Desconocido	764	26.715	9.95			69.1			10.5
Desconocido	770	21.23	10.5						
Desconocido	772	15.81		12.6					
Desconocido	798	11.691				47.6	31.3	60.7	
Desconocido	840	22.221	12			14.9			10.5
Rifamycin w-hemiacetal	653	17.878	100	100	100	100	100	100	100
Desconocido	853	10.648							24.8
Desconocido	888	23.277		20.4	11.8	18.3			14.1
Desconocido	898	22.575		26.2					
Desconocido	899	6.696	11.5						
Desconocido	944	24.757		22					
Desferripalmitoylcoprogen	965	8.594							9.42
Desconocido	1002	9.915							19.9
Desconocido	1103	11.98	11.5	23			13	13	8.38
Desconocido	1143	23.973		20.9	30.6	19.4			16.8
Desconocido	1157	20.741		18.3					
Cyclosporin-O	1162	11.413		29.6	14.1	30.9	31.3	31.9	8.38
[Thr(2),Leu(5), Ala(10)] cyclosporine	1176	25.639	16.8	17.8		25	12	11	16.2
4,8-Di-g-hydroxy-Meleu-cyclosporin A	1278	13.635		15.7				11	14.7
Desconocido	1306	15.108							15.2
Desconocido	1319	12.817						9.95	14.7
8-Deoxyrifamycin S	1323	7.68	13.6	12					14.1
Desconocido	1336	24.423	17.3			20.9	12	12.6	19.9
Desconocido	692/782	7.204							11.5

Tabla XX. Abundancia relativa (%) de los compuestos producidos por la cepa AMS300 en medio Avena a pH de 7.2.

Compuesto	PM	T.R	Dias de cultivo						
			5 (%)	6 (%)	7 (%)	8 (%)	9 (%)	10 (%)	11 (%)
Naphthomycin D	701	21.59					10.47		
Rifamycin R	709	19.961	20.42	14.14	18.84	15.18	27.75		20.42
Desconocido	736	20.175			19.37				
Desconocido	764	26.715	20.94			73.83	82.72		10.99
Desconocido	772	15.81	8.9						
Desconocido	795	21.442			9.94				
Desconocido	798	11.691					32.98	57.33	
Desconocido	840	22.221	19.37				11.52		
Rifamycin w-hemiacetal	653	17.878	100	100	100	100	100	100	100
Desconocido	847	12.18							
Desconocido	853	10.648			16.75	10.47	17.8	21.98	71.72
Desconocido	888	23.277	26.18	13.61		10.99			14.14
Desconocido	898	22.575	18.48			10.99	19.37		16.73
Desconocido	960	7.932		16.23					
Desferripalmitoylcoprogen	965	8.594					11.52		35.01
Desconocido	1103	11.98		10.99					
Desconocido	1143	23.973	20.42			12.56			24.1
Cyclosporin-O	1162	11.413	17.8	16.23	45.03	37.17	28.79	32.15	
[Thr(2),Leu(5), Ala(10)] cyclosporin	1176	25.639	35.01	15.18	11.42			13.1	15.7
8-Deoxyrifamycin S	1323	7.68				27.22	12.04	11.52	
Desconocido	1336	24.423	20.42	15.71		11.22	19.89	15.7	27.74
Desconocido	1423	14.472	8.9						42.4
Desconocido	692/782	7.204					9.95		

Tabla XXI. Abundancia relativa (%) de los compuestos producidos por la cepa AMS300 en medio Avena a pH de 8.5.

Compuesto	PM	T.R	Días de cultivo					
			6 (%)	7 (%)	8 (%)	9 (%)	10 (%)	11 (%)
Naphthomycin D	701	21.59				16.2		
Rifamycin R	709	19.961		14.7	16.8			40.3
Desconocido	736	20.175	14.6	15.2		44.5		
Desconocido	764	26.715	11.3		69.1	10.5		93.7
Desconocido	772	15.81	10.5			15.7		8.9
Desconocido	795	21.442						19.9
Desconocido	798	11.691			18.8		36.7	
Desconocido	802	12.515	14.1			10.9	15.2	
Desconocido	840	22.221				20.4	10.5	
Rifamycin w-hemiacetal	653	17.878	100	100	100	100	100	100
Desconocido	853	10.648	11.5	10.5	22			
Desconocido	888	23.277	14.6			11.5		
Desconocido	898	22.575	15.2			37.7	13.1	19.4
Desconocido	960	7.932			10.5	10.5		
Desferripalmitoylcoprogen	965	8.594				10.5		16.8
Desconocido	1103	11.98					25.1	
Desconocido	1157	20.741			10.5			38.2
Cyclosporin-O	1162	11.413	26.2	22.5	15.7	10.5	36.7	29.3
[Thr(2),Leu(5), Ala(10)] cyclosporine	1176	25.639	15.7	7.85	14.7	20.9	12	93.7
4,8-Di-g-hydroxy-Meleu-cyclosporin A	1278	13.635	11					9.95
Desconocido	1304	4.122				14.7		
8-Deoxyrifamycin S	1323	7.68				17.3		20.9
Desconocido	1336	24.423	12.6			23.6	12.6	16.8
Desconocido	1385	6.856	28.8					
Desconocido	692/782	7.204	13.1		11.5			18.1

Tabla XXII. Abundancia relativa (%) de los compuestos producidos por la cepa AMS300 en medio Avena a pH de 11.

Compuesto	PM	T.R	Días de cultivo					
			5 (%)	6 (%)	7 (%)	9 (%)	10 (%)	11 (%)
Desconocido	690	23.452	15.2	10.5	14.1			
Rifamycin S/8-Deoxy-3-hydroxyrifamycin S	695	22.853			13.6			11
Naphthomycin D	701	21.59	15.7					
Rifamycin R	709	19.961	15.2	70.2	65.4	24.1		
Desconocido	736	20.175						24
Desconocido	764	26.715		63.1	90.1	26.9	72	
Desconocido	772	15.81			14.7			
Desconocido	662	20.942	12.6		28.8			
Desconocido	795	21.442		16.8	51.8			
Desconocido	798	11.691				14.1		65
Desconocido	802	12.515				9.42		
Desconocido	840	22.221		14.1		24.1		
Rifamycin w-hemiacetal	653	17.878	100	100	100	100	100	100
Desconocido	847	12.18						41
Desconocido	853	10.648		9.95		14.7	34	24
Desconocido	888	23.277		11.9	13.1			
Desconocido	898	22.575	36.7		33.8	21.5		
Desconocido	916	24.101			18.9		11	
Desconocido	960	7.932						13
Desconocido	1103	11.98					12	
Desconocido	1143	23.973	20.4	15.7		22.5		
Cyclosporin-O	1162	11.413	12	12.6	24.3	32.5	43	53
[Thr(2),Leu(5), Ala(10)] cyclosporin	1176	25.639	25.7	24.6	26.2	49.2	12	11
4,8-Di-g-hydroxy-Meleu-cyclosporin A	1278	13.635				14.1		
Desconocido	1306	15.108			12.6			
8-Deoxyrifamycin S	1323	7.68	12			14.1		12
Desconocido	1336	24.423						10
Desconocido	1423	14.472			9.95			
Desconocido	692/782	7.204	7.8		12.6	10.5		