



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

Unidad Xochimilco

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD DEPARTAMENTO DE SISTEMAS BIOLÓGICOS LICENCIATURA QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

ESCRITO FINAL DEL SERVICIO SOCIAL

Nombre del alumno: Mundo Hernández Juan Daniel

Matrícula: 2192033553

Correo institucional:

2192033553@alumnos.xoc.uam.mx

Nombre del proyecto:

**“Potencial biosintético y taxonomía de actinobacterias
aisladas de suelo contaminado”**

Etapa: Diseño y desarrollo de productos biológicos por métodos
biotecnológicos o de ingeniería genética

Fecha de inicio y de terminación: 19 de Julio 2022 al 02 de junio
del 2023

Lugar de realización:

Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Xochimilco.
Laboratorio 202, edificio N. Calzada del hueso 1100. Colonia Villa
Quietud.

Alcaldía de Coyoacán, Ciudad de México.

QFB. Nora Lidia Sánchez Saucedo

Vo. Bo del asesor interno: Laboratorio
de Producción de Biológicos,
Universidad Autónoma Metropolitana
Número económico: 18752

Dra. Janette B. González Nava

Vo. Bo del asesor externo: Laboratorio de
Microbiología Médica y Ambiental, Universidad
Autónoma del Estado de México
No. de Cédula: 12744827

CDMX

Agosto 2023

Resumen

Las actinobacterias son un grupo de bacterias que se caracterizan por crecer con estructura en forma de micelio, son organismos de vida libre; se encuentran distribuidas en ecosistemas terrestres y acuáticos, debido a su diversidad metabólica, son potencialmente productoras de metabolitos secundarios como antibióticos y enzimas. Tienen una importancia biotecnológica para diferentes ramas científicas (farmacéutica, medicina, agricultura etc.).

Su genoma es distinguido por tener un conjunto de genes capaces de codificar para la producción de los diferentes metabolitos secundarios, a estos genes se les denomina sistemas biosintéticos, entre los más estudiados se encuentran los denominados péptidos sintetados no ribosomales (NRPS) y policétido sintasa (PKS).

El trabajo consto de las siguientes etapas: caracterización macroscópica y microscópica, sensibilidad a antibióticos, actividad antimicrobiana, amplificación del gen 23S y amplificación de sistemas biosintéticos NRPS y PKS que se realizaron a 11 cepas aisladas de suelo contaminado y con ello, determinar su potencial biosintético y taxonomía.

Palabras clave: actinobacterias, metabolitos secundarios, sistemas biosintéticos NRPS y PKS.

Abstract

Actinobacteria are a group of bacteria that are characterized by growing with a mycelium-shaped structure, they are free-living organisms; They are distributed in terrestrial and aquatic ecosystems, due to their metabolic diversity, they are potentially producers of secondary metabolites such as antibiotics and enzymes. They have biotechnological importance for different scientific branches (pharmaceutical, medicine, agriculture, etc.).

Its genome is distinguished by having a set of genes capable of coding to produce different secondary metabolites, these genes are called biosynthetic systems, among the most studied are the so-called non-ribosomal peptide synthetases (NRPS) and polyketide synthase (PKS).

The work consisted of the following stages: macroscopic and microscopic characterization, sensitivity to antibiotics, antimicrobial activity, amplification of the 23S gene and amplification of NRPS and PKS biosynthetic systems that were carried out on 11 strains isolated from contaminated soil and with this, determine their biosynthetic potential. and taxonomy.

Abstract

Keywords: actinobacteria, secondary metabolites, NRPS and PKS biosynthetic systems.

Índice

| | |
|---|----|
| Introducción | 6 |
| Infecciones causadas por actinobacterias | 12 |
| Sistemas biosintéticos | 13 |
| Sistemas biosintéticos NRPS | 14 |
| Sistemas biosintéticos PKS | 16 |
| Identificación de actinobacterias | 18 |
| Herramientas bioinformáticas para la búsqueda de sistemas biosintéticos de péptidos no ribosómicos (NRP) y policétidos (PK) | 19 |
| Cepas de estudio | 21 |
| Planteamiento del problema | 21 |
| Justificación | 22 |
| Objetivos | 22 |
| Objetivo general | 22 |
| Objetivos específicos | 22 |
| Metodología | 23 |
| Activación y siembra de cepas de estudio | 23 |
| Caracterización macroscópica y microscópica | 24 |
| Sensibilidad a antibióticos | 25 |
| Actividad antimicrobiana | 26 |
| Extracción de ADN de las cepas de estudio | 26 |
| Amplificación del gen 23S a las cepas de estudio | 28 |
| Amplificación de sistemas PKS1 y PKS2 | 29 |
| Amplificación de sistema NRPS1 | 30 |
| Resultados y discusión | 31 |
| Objetivos y metas alcanzadas | 39 |
| Conclusiones | 39 |
| Recomendaciones | 39 |
| Bibliografía | 40 |

Índice de ilustraciones

| | |
|---|----|
| Ilustración 1. Microfotografía de una colonia joven de una actinobacteria del género <i>Nocardia</i> . ----- | 7 |
| Ilustración 2. Microfotografía de <i>Streptomyces</i> . ----- | 7 |
| Ilustración 3. Ilustraciones de diferentes tipos de cadenas de esporas producidas por actinobacterias. ----- | 8 |
| Ilustración 4. (a) Esquema taxonómico del filo <i>Actinobacteria</i> basado en árboles de ARNr 16S del Manual de Bacteriología Sistemática de Bergey sobre Actinobacterias. ----- | 9 |
| Ilustración 5. Fotografía de una persona que padece Micetoma causado por <i>Nocardia</i> . ----- | 12 |
| Ilustración 6. Organización de módulo de péptidos sintetasa no ribosomales NRPS. ----- | 15 |
| Ilustración 7. Arquitectura de un péptido sintetasa trimodular no ribosómico. ----- | 16 |
| Ilustración 8. Organización de módulos de policétido sintetasas de tipo I. ----- | 17 |
| Ilustración 9. Organización de dominios de los diferentes tipos de PKS. ----- | 18 |
| Ilustración 10. Fotografías coloniales realizadas a las cepas de estudio aisladas de suelo contaminado con hidrocarburos. ----- | 32 |
| Ilustración 11. Fotografía microscópica de las tinciones de Gram realizadas a las cepas de estudio aisladas de suelo contaminado con hidrocarburos. ----- | 33 |
| Ilustración 12. Fotografía de la prueba de sensibilidad a antibióticos realizadas a las cepas de estudio. ----- | 35 |
| Ilustración 13. Fotografía de la prueba de actividad antimicrobiana realizada a las cepas de estudio. ----- | 36 |
| Ilustración 14. Fotografía de electroforesis en gel de agarosa realizada a las cepas de estudio, para visualizar la amplificación del gen 23S. ----- | 37 |
| Ilustración 15. Fotografía de electroforesis en gel de agarosa realizara a las cepas de estudio, para visualizar la amplificación de sistemas NRPS1----- | 38 |

Índice de Tablas

| | |
|--|----|
| Tabla 1. Diferentes grupos de actinobacterias. ----- | 10 |
| Tabla 2. Ejemplos de antibióticos producidos por <i>Streptomyces sp.</i> ----- | 11 |
| Tabla 3. Ejemplos de diferentes tipos de metabolitos secundarios producidos por Actinomycetes. ----- | 12 |
| Tabla 4. Actinobacterias identificadas en casos de micetoma. ----- | 13 |

| | |
|---|----|
| Tabla 5. Compuestos naturales con diferente bioactividad sintetizados por sistemas biosintéticos péptidos sintetetasas no ribosómicas (NRPS).----- | 14 |
| Tabla 6. Compuestos naturales con diferente bioactividad sintetizados por sistemas biosintéticos policétido sintetasas (PKS).----- | 16 |
| Tabla 7. Herramientas bioinformáticas utilizadas para la consulta, predicción e identificación de sistemas biosintéticos NRPS y PKS, así como la predicción de metabolitos (2). ----- | 20 |
| Tabla 8. Colección de cepas de actinobacterias aisladas de tierra contaminada con hidrocarburos conservadas en el laboratorio de Producción de Biológicos en la Universidad Autónoma Metropolitana unidad Xochimilco. ----- | 21 |
| Tabla 9. Sensidiscos con antibióticos comerciales y su abreviación que se utilizaron para la prueba de sensibilidad a antibióticos realizada a las cepas de estudio. ----- | 25 |
| Tabla 10. Materiales de biología molecular para realizar el mix de PCR para la amplificación del gen 23S y los volúmenes utilizados. ----- | 28 |
| Tabla 11. Materiales de biología molecular para realizar el mix de PCR para la amplificación del sistema PKS1 y los volúmenes utilizados. ----- | 29 |
| Tabla 12. Materiales de biología molecular para realizar el mix de PCR para la amplificación del sistema NRPS1 y los volúmenes utilizados. ----- | 30 |
| Tabla 13. Resultados de la caracterización macroscópica realizados a las 11 cepas de estudio. ----- | 31 |
| Tabla 14. Resultados de caracterización microscópica realizada a las 11 cepas de estudio. ----- | 32 |
| Tabla 15. Resultados obtenidos de la prueba de sensibilidad a antibióticos.----- | 34 |
| Tabla 16. Resultados obtenidos de la prueba de actividad antimicrobiana.----- | 35 |
| Tabla 17. Resultados obtenidos de la amplificación del gen 23S realizado a las cepas de estudio. ----- | 36 |
| Tabla 18. Resultados obtenidos de la amplificación del sistema NRPS1 realizado a las cepas de estudio. ----- | 37 |
| Tabla 19. Resultados obtenidos de la amplificación del sistema PKS-I y PKS-II realizado a las cepas de estudio.----- | 38 |

Introducción

Las actinobacterias son un grupo de bacterias con gran capacidad biosintética, contienen genes que codifican para metabolitos secundarios de interés biotecnológico como antibióticos, antifúngicos, anticancerígenos, enzimas degradadoras, etc. Se caracterizan por ser Gram positivas, algunas especies presentan crecimiento micelial o filamentoso (Ilustración 1), con alto contenido de Guanina más Citocina en su ADN y tienen la capacidad de degradar una amplia diversidad de compuestos como, lignocelulosas y otros polímeros que se encuentran en el suelo y basura, así como compuestos xenobióticos (3).

Estos microorganismos son de vida libre, debido a que se encuentran distribuidos en ecosistemas terrestres y acuáticos, la mayoría presentan una respiración aeróbica, pero puede haber excepciones, pueden ser heterótrofos o quimioautótrofos, pero generalmente son quimioheterótrofos, su nutrición suele ser muy diversa, donde se incluyen polisacáridos complejos (3).

Entre los géneros principales de actinobacterias filamentosas, se encuentra *Streptomyces* donde, se han llegado a conocer a más de 500 especies, caracterizadas por sus filamentos que van de un tamaño de 0.5 y 1.0 μm de diámetro y carecen de septos en la fase vegetativa. *Streptomyces* tiende a ramificarse, cuando la colonia envejece se forman filamentos aéreos llamados esporóforos formando esporas (ilustración 2) (23).

Estas bacterias debido a su diversidad metabólica son una gran fuente de producción de enzimas líticas, antibióticos y otros compuestos bioactivos de interés en medicina, agricultura, remediación e industria. Por ello, más de la mitad de los antibióticos naturales descubiertos son producidos por actinobacterias y continúan siendo evaluados en busca de nuevos compuestos útiles (12).

Algunas actinobacterias tienen capacidad productora variable dependiendo de sus condiciones de crecimiento; así, aquellas cepas aisladas de suelos "raros" como los suelos contaminados con hidrocarburos, pueden demostrar potencial para degradar compuestos orgánicos. La mayoría de las actinobacterias contienen genes biosintéticos que codifican a metabolitos secundarios (3).

La clasificación morfológica y química de esta especie de microorganismos, ha tenido avances importantes y cuestionables, derivado de datos taxonómicos moleculares de los cuales, son resultado de los rápidos avances en la secuenciación del genoma (3).

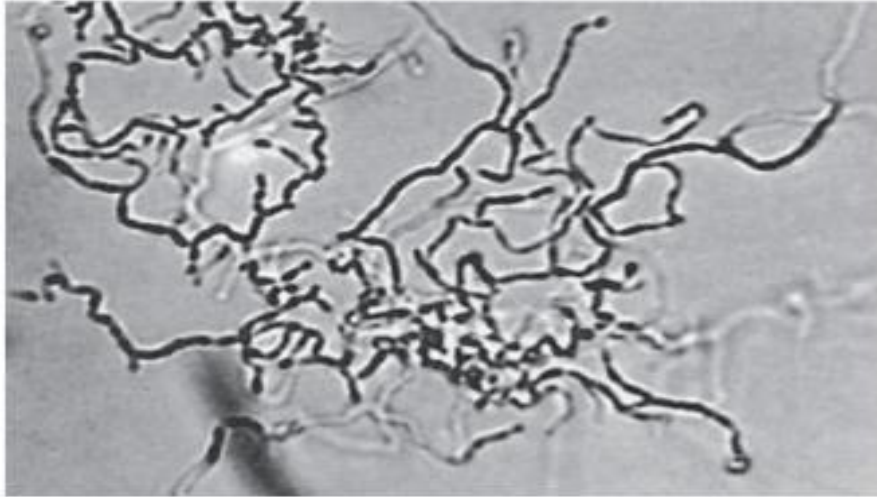


Ilustración 1. Microfotografía de una colonia joven de una actinobacteria del género *Nocardia*. Se observa el característico crecimiento micelial o filamentososo, el tamaño de cada filamento es de 0,8 y 1 μm de diámetro (23).

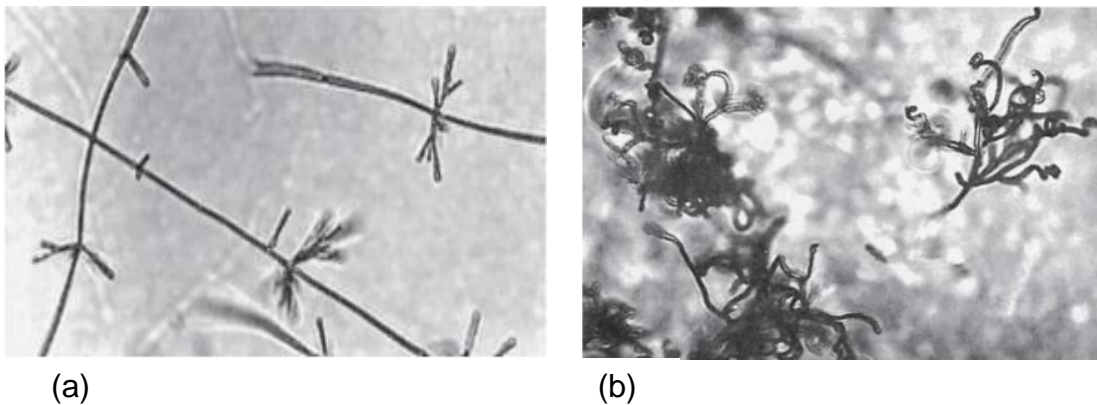
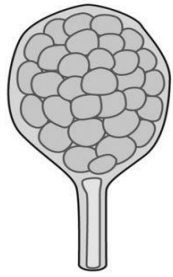


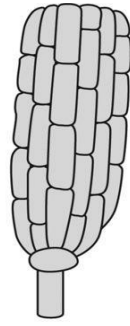
Ilustración 2. Microfotografía de *Streptomyces*. Se observan filamentos aéreos que miden aproximadamente 0,8 μm de ancho que forman esporas. (a) es un *Streptomyces* de tipo monovercillado y (b) es un *Streptomyces* tipo espiral cerrado (23).

La clasificación morfológica de *Actinobacteria* se exhiben en una amplia variedad, pero principalmente hay dos tipos, difiriendo a la presencia o ausencia de un micelio, el color del micelio, la producción de pigmentos melanoides difusibles, la estructura y apariencia de sus esporas (3).

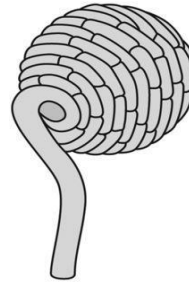
Las esporas son muy importantes en la taxonomía de *Actinobacteria*, en fases iniciales de la esporulación pueden considerarse procesos de gemación, fundamental para su reproducción. Las esporas tienen formas y tamaños variados (Ilustración 3) así como el número de esporas que va a depender ampliamente de un género a otro (8 & 19).



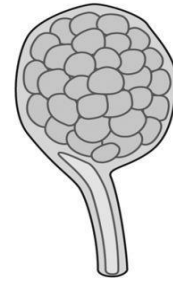
Actinoplanes



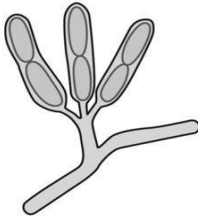
Pilimelia



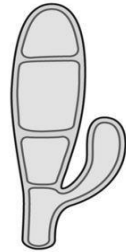
Spirilospora



Streptosporangium



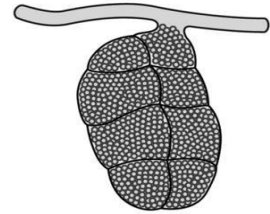
Ampullariella



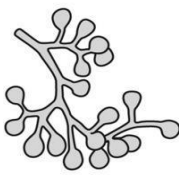
Dactylosporangium



Planomonospora



Frankia



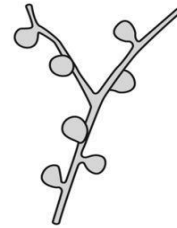
Micromonospora



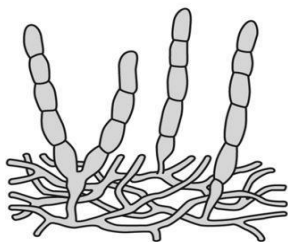
Thermomonospora



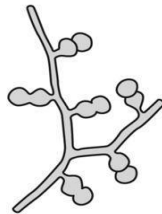
Saccharomonospora



Thermoactinomyces



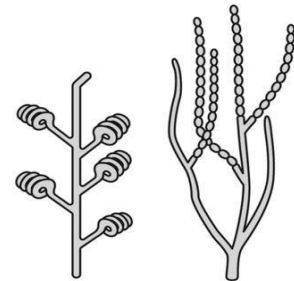
Catellatospora



Microbispora



Microtetraspora



Streptomyces

Ilustración 3. Ilustraciones de diferentes tipos de cadenas de esporas producidas por actinobacterias, se puede observar una amplia variedad, como forma y tamaño, que va a depender del tipo de género (1).

El *phylum Actinobacteria* se distingue en función de su posición de ramificación en arboles de genes ARNr 16S. Se divide en cinco subclases: *Actinobacteridae*, *Acidimicrobidae*, *Coriobacteridae*, *Nitriliruptoridae* y *Rubrobacteridae* (Ilustración 4), a su vez se divide en órdenes y subórdenes (11).

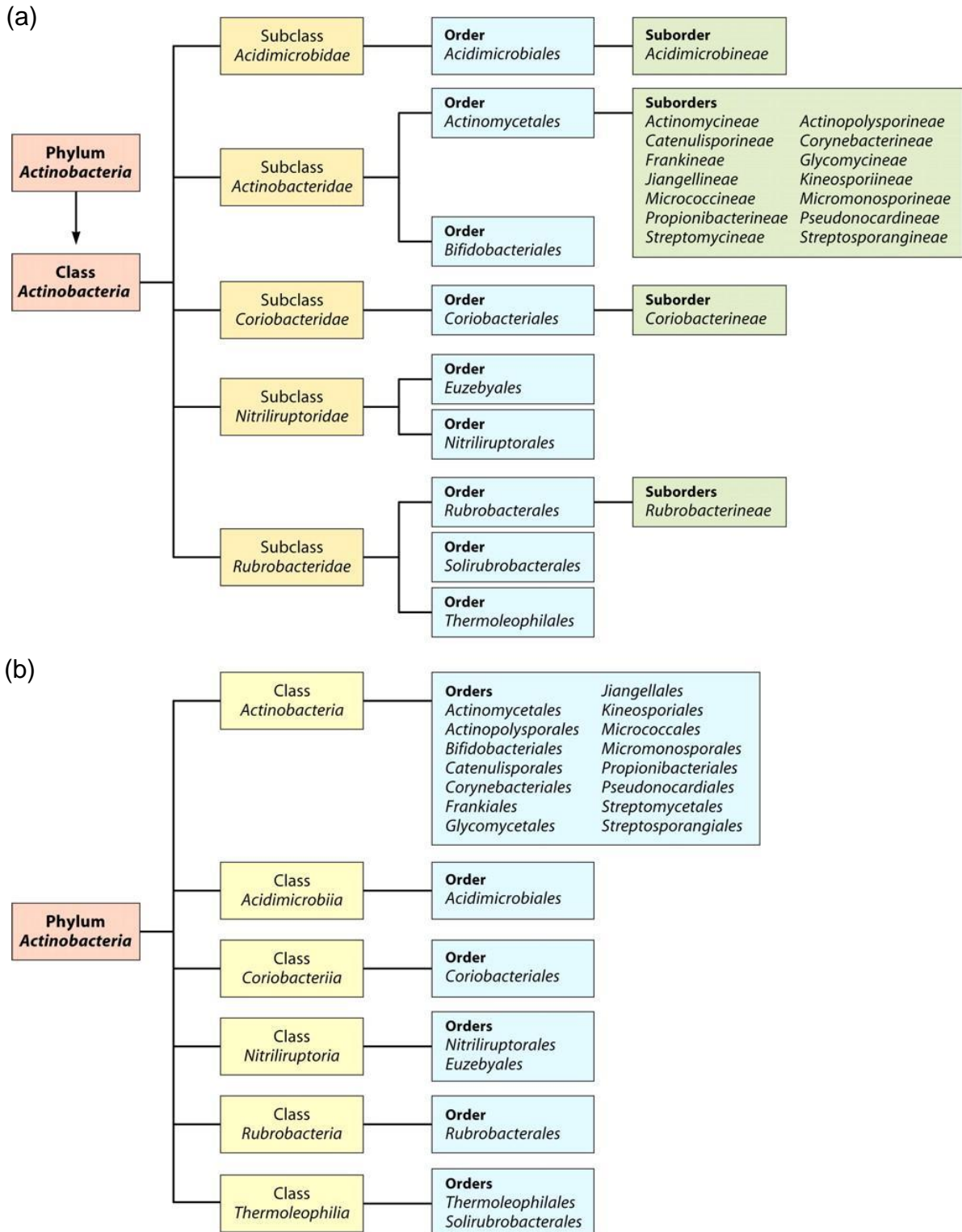


Ilustración 4. (a) Esquema taxonómico del filo Actinobacteria basado en árboles de ARNr 16S del Manual de Bacteriología Sistemática de Bergey sobre Actinobacterias. En la taxonomía se eliminan los intervalos taxonómicos de subclases y subórdenes y se utilizan los intervalos de clases y órdenes respectivamente como se observa en el esquema (b) (11).

A partir de criterios morfológicos y químicos realizados al filo *Actinobacteria*, las actinobacterias se han agrupado en diferentes géneros (Tabla 1), sin embargo, el género que más se ha aislado es *Streptomyces*; debido a que presentan gran importancia en distintas áreas científicas como la médica, la ecológica y biotecnológica (21).

| Sección | Características |
|--|---|
| Nocardioformactinomicetos | Presenta una respiración aeróbica, puede ser ácido-alcohol resistente; proliferan de distintas formas y tamaños principalmente en forma de cocos y filamentos que se ramifican y forman un micelio aéreo que se fragmenta, presentan una pared celular tipo IV que contiene ácidos micólicos. |
| Actinobacterias con esporangios multiloculares | Presenta una respiración aeróbica y anaerobia facultativa; La estructura del micelio se divide en todos los planos, no presenta hifas aéreas y presentan una pared tipo III. |
| Actinoplanes | También denominadas esporaactinobacterias aerobias, no presentan movilidad, algunas esporas se encuentran encerradas dentro de vesículas, no presentan micelio aéreo y presentan una pared celular tipo II. |
| <i>Streptomyces</i> y géneros relacionados | Esporoactinobacterias que presentan una respiración aerobia; forman filamentos ampliamente ramificados y un micelio aéreo |
| Thermomonospora y géneros relacionados | También denominados esporaactinobacterias, tienen una respiración aeróbica; forman filamentos ampliamente ramificados y un micelio aéreo, el micelio puede portar una cadena de esporas que presentan movilidad, tienen una pared celular tipo III |
| Termoactinobacterias | Presentan filamentos estables que producen un crecimiento aéreo, portan esporas individuales denominadas endosporas. Todas las especies son termófilas, presentan una pared celular que contiene ácido diaminopimélico, pero no contiene aminoácidos ni azúcares |
| Otros géneros | Su principal característica es que todos producen cadenas de esporas portadoras de crecimiento aéreo |

Tabla 1. Diferentes grupos de actinobacterias La información del cuadro se obtuvo a partir de criterios morfológicos y químicos realizados al filo Actinobacteria que, a partir de los resultados obtenidos, se seccionaron y se relacionaron con las características correspondientes (21).

Las actinobacterias son un blanco importante de investigación para el ser humano, debido a que producen una gran variedad de metabolitos secundarios que, potencialmente tienen diversos efectos biológicos y una actividad antimicrobiana contra agentes patógenos. Se ha estimado que este grupo de bacterias es responsable de producir más de 10,000 agentes antimicrobianos de uso farmacéutico (22).

Los antibióticos son compuestos bioactivos que tienen importancia en la terapéutica contra agentes patógenos, el 75 % de estos compuestos son producidos por las actinobacterias, donde muestran una amplia gama de actividades, siendo efectivos contra una gran variedad de bacterias grampositivas y gramnegativas (15).

El grupo *Streptomyces* tiene el mayor porcentaje de nuevos antibióticos descubiertos en comparación con otro tipo de bacterias y hongos, siendo así el 45 % de los metabolitos bioactivos conocidos; se aislaron más de 10,000 compuestos que, aproximadamente el 34 % se produjeron por *Streptomyces* (Tabla 2), el 11 % por otros *Streptomyces* (4).

| <i>Streptomyces sp.</i> | Antibiótico | <i>Streptomyces sp.</i> | Antibiótico |
|-------------------------|--|-------------------------|----------------------------------|
| <i>S. orquídea</i> | Cicloserina N | <i>S. erythraeus</i> | Eritromicina |
| <i>S. orientalis</i> | Vancomicina | <i>S. vensuella</i> | Cloranfenicol |
| <i>S. fradiae</i> | Neomicina, Actinomicina, Fosfomicina | <i>S. aureofaciens</i> | Clortetraciclina, Dimeticloro |
| <i>S. nodoso</i> | Anfotricina B | <i>S. ambofaciens</i> | Espiramicina |
| <i>S. noursei</i> | Nistatina | <i>S. avermitilis</i> | Avermicina |
| <i>S. mediterráneo</i> | Rifampicina | <i>S. alboniger</i> | Puromicina |
| <i>S. griseus</i> | Estreptomina | <i>S. niveus</i> | Novobicina |
| <i>S. knnamyceticus</i> | Kanamicina | <i>S. platensis</i> | Plantenmicina |
| <i>S. tenebrarius</i> | Tobramicina | <i>S. roseosporus</i> | Daptomicina |
| <i>S. spectabilis</i> | Espectinomicina | <i>S. ribosidificus</i> | Ribostamicina |
| <i>S. viridifaciens</i> | Tetraciclina | <i>S. garyphalus</i> | Cicloserina |
| <i>S. lincolensis</i> | Lincomicina y Clindamicina | <i>S. vinaceus</i> | Viomicina |
| <i>S. rimosus</i> | Oxitetraciclina | <i>S. clavuligerus</i> | Cefalosporina |

Tabla 2. Ejemplos de antibióticos producidos por *Streptomyces sp.* En la tabla se enlistan ejemplos de antibióticos y la actinobacteria que lo produce, estos compuestos bioactivos son utilizados en la terapéutica contra una gran variedad patógenos de importancia clínica (15).

Las actinobacterias tienen el potencial de producir otro tipo de metabolitos secundarios importantes, uno de ellos son los compuestos antitumorales, ya que estos tienen la capacidad de producir compuestos citotóxicos que promueven actividad anticancerígena (14). En la tabla número 3 se muestran ejemplos de metabolitos secundarios que son producidos por actinobacterias.

| Otros metabolitos secundarios producidos por <i>Streptomyces</i> sp. | | | | |
|--|---------------------|---------------------------|---------|-----------|
| Agentes bioplagicidas | Agentes antivirales | Agentes antiinflamatorios | Enzimas | Pigmentos |

Tabla 3. Ejemplos de diferentes tipos de metabolitos secundarios producidos por *Actinomycetes*. Además de producir en su mayoría antibióticos, los metabolitos sintetizados por *Actinomycetes* tienen una diversidad de diversos efectos biológicos, como se enlista en la tabla: Agentes bioplagicidas, agentes antitumorales, agentes antiinflamatorios, enzimas, pigmentos, sin embargo, estos son solo algunos ejemplos, ya que existen aún una gran variedad de metabolitos (21).

Infecciones causadas por actinobacterias

Estas bacterias tienen una baja prevalencia en muestras clínicas, sin embargo, pueden causar infecciones al ser humano que son potencialmente mortales, principalmente a personas susceptibles como receptores de trasplante, personas que están en tratamiento médico con medicamentos inmunosupresores, personas con VIH, personas con cáncer y diabetes, también pueden llegar a afectar a otro tipo de animales (1).

Entre los síntomas más comunes derivado de las infecciones por actinobacterias son, granulomas o formación de abscesos (Ilustración 5), también existen otro tipo de síntomas como tos, dificultad para respirar, dolor torácico, hemoptisis, fiebre, sudoración durante la noche, pérdida de peso y fatiga para el caso clínico de nocardiosis pulmonar (1, 25).



Ilustración 5. Fotografía de una persona que padece Micetoma causado por *Nocardia*. La mujer adulta contrajo esta infección debido a un traumatismo derivado de cargar fardos de madera sobre sus hombros y espalda. En los resultados de la biopsia de estas lesiones se aislaron muestras de *N. brasiliensis* y *N. asteroides* (24).

México es un país endémico para el micetoma, enfermedad infecciosa crónica, donde los agentes causales pueden ser actinobacterias (Tabla 4), estas infecciones fueron identificadas en varios casos de actinomictoma que, se caracteriza por síntomas como, hinchazones similares a tumores y la formación de granos, su causa es debido a traumatismos en el pie, posteriormente el agente patógeno se introduce en el tejido subcutánea y eventualmente el hueso del individuo es invadido formando una lesión grave, llevando a la amputación del pie (24).

| Especies | Color del grano | Número de aislamientos | Porcentaje | Prevalencia |
|---------------------------------|-----------------|------------------------|------------|-------------|
| <i>Actinomycetoma</i> | | 4832 | 50.84 | |
| <i>Actinomadura madurae</i> | S/S/P | 594 | 10.21 | C |
| <i>Streptomyces somaliensis</i> | Y/Br | 677 | 10.16 | C |
| <i>Actinomadura pelletieri</i> | R | 594 | 6.71 | C |
| <i>Nocardia brasiliensis</i> | W | 1946 | 5.78 | C |
| <i>Nocardia asteroides</i> | W | 108 | 5.58 | C |
| <i>Nocardia atidiscaviarum</i> | W/Y | 51 | 1.08 | C |
| <i>Actinomyces israelí</i> | W/Y | 1 | 0.07 | R |
| <i>Nocardia spp</i> | W/Y | 371 | 4.64 | |
| Actinos no identificados | W/Y | 590 | 6.60 | |

Tabla 4. Actinobacterias identificadas en casos de micetoma. Color del grano: negro (B), marrón (Br), verde (G), rosa (P), rojo (R), blanco (W), amarillo (Y). Prevalencia: común (C); especie aislada >5%; ocasional; especies raras aisladas <1%. En todos los casos de actinomycetoma el agente causal fue un actino, sin embargo, en algunos casos los agentes causales no se identificaron a nivel de especie (24).

Sistemas biosintéticos

Existe una variedad de metabolitos secundarios producidos por microorganismos, las actinobacterias son un ejemplo de ello, debido a que presentan una importante producción de estos compuestos orgánicos, su función principal es para supervivencia, si bien no están directamente involucrados en el crecimiento y desarrollo, cumplen funciones auxiliares como la defensa y comunicación, algunos de estos compuestos son sintetizados por enzimas multimodulares denominados péptidos sintetasa no ribosomales (NRPS) y policétido sintasa (PKS) (5).

Los genomas bacterianos están compuestos por genes, algunos conjuntos de genes se llaman sistemas biosintéticos y son capaces de codificar metabolitos secundarios con actividad antibiótica, antifúngica, anticancerígena, etc. Los sistemas biosintéticos mejor conocidos son los PKS (policétido sintasa) y los NRPS (sintetasas de péptido no ribosomales). La capacidad de tener genes PKS y NRPS aumenta cuando el tamaño del genoma es mayor, como lo presentan las actinobacterias (5).

Sistemas biosintéticos NRPS

Los sistemas biosintéticos NRPS son enzimas multimodulares capaces de sintetizar una amplia variedad de metabolitos secundarios (tabla 5) como los péptidos no ribosómicos (NRP) que pueden actuar como antibióticos, compuestos inmunosupresores, agentes antitumorales, toxinas entre otros (2).

| Nombre del compuesto bioactivo | Bioactividad | Tipo de NRPS |
|--------------------------------|-------------------------|-------------------------|
| Daptomicina | Antibiótico | NRPS lineal. Tipo A |
| Vancomicina | Antibiótico | NRPS lineal. Tipo A |
| Teicoplanina | Antibiótico | NRPS lineal. Tipo A |
| Quinoxalinas | Antitumoral y antiviral | NRPS iterativos. Tipo B |
| Capreomicina | Antibiótico | NRPS no lineal. Tipo C |
| Beomicina | Anticancerígeno | NRPS no lineal. Tipo C |

Tabla 5. Compuestos naturales con diferente bioactividad sintetizados por sistemas biosintéticos péptidos sintetizados no ribosómicos (NRPS) En la tabla se encuentran los nombres de algunos productos naturales sintetizados por uno de los tres diferentes tipos de NRPS: NRPS lineal, NRPS iterativo y NRPS no lineal (9).

La constitución de NRPS consta de unidades catalíticas denominadas módulos, los módulos se caracterizan por tener una longitud de 1000 a 1100 aminoácidos. Existe una regla denominada colinealidad que, de acuerdo con la regla, se va a definir el número y el orden de módulos por el número y orden de los aminoácidos en los sistemas NRPS (2).

Las enzimas multimodulares NRPS contienen tres dominios catalíticos principales (Ilustración 6) sin embargo un módulo puede incorporar dominios auxiliares, el primer dominio que es el de adenilación (A) es responsable del reconocimiento y la activación de un aminoácido seguido de la transferencia del sustrato activo al dominio transportador de péptidos (tiolación) del mismo módulo. El dominio de condensación (C) forma el enlace Carbono-Nitrógeno entre la cadena alargada y el aminoácido activado, este dominio puede incorporar dominios auxiliares: dominio de epimerización (E) que cambia un L-aminoácido en un D- aminoácido, así como los dominios duales de epimerización (E/C) responsables de la epimerización y condensación. Se han detectado dominios de ciclación (Cy), estos pueden reemplazar a los dominios C responsables de la incorporación de cisteína, serina o treonina. El dominio de oxidación (Ox) generalmente se encuentra abajo del dominio PCP o en el extremo C del dominio A que cataliza la formación de un tiazol aromático mediante la oxidación de un anillo de tiazolina (2).

Los dominios de tioesterasa (TE) generalmente se encuentran en el módulo NRPS final, estos dominios liberan el producto peptídico final de la enzima mediante ciclación o hidrólisis (2).

Generalmente un módulo de NRPS consta de tres dominios principales: C, A y T,

cada uno cumple una función específica descritos en la siguiente lista (2).

1. (C) o dominio de condensación es responsable de la formación del enlace Carbono y Nitrógeno entre la cadena alargada y el aminoácido activado.
2. (A) o dominio de adenilación es responsable de activar su aminoácido relacionado y cataliza la transferencia del sustrato activado al dominio de tiolación.
3. (T) o dominio de tiolación es responsable de portar los péptidos de este módulo.

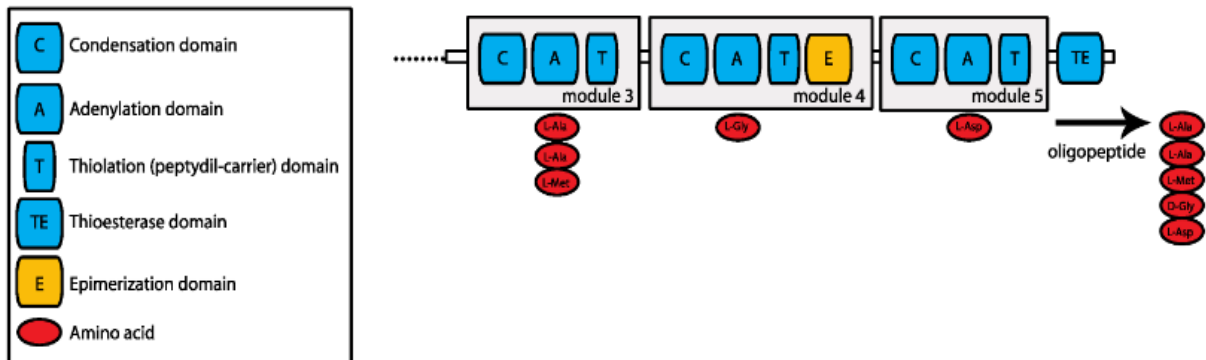


Ilustración 6. Organización de módulo de péptidos sintetasas no ribosomales NRPS. En la ilustración se observa la arquitectura y función de cada dominio, los dominios están representados de color azul y con una letra de acuerdo su función, en total hay 4 dominios: C, A, T, TE. También se observa un dominio auxiliar denominado (E) o dominio de epimerización que cumple la función de cambiar un L-aminoácido en un D-aminoácido. También se observan los aminoácidos presentes en la arquitectura del módulo, representados con círculos de color rojo (2).

Los sistemas NRPS se clasifican en tres tipos:

1. NRPS lineales o de tipo A (ilustración 7): se caracterizan por que sintetizan sus productos de forma colineal y cada módulo reconoce e incorpora específicamente un sustrato en el péptido de crecimiento. Este tipo de NRPS puede consistir en una sola proteína que alberga todos los módulos y dominios necesarios para realizar el proceso de síntesis complejo o, con mayor frecuencia, varias proteínas donde, cada una proporciona sustratos activados o intermediarios para el ensamblaje gradual del producto peptídico final (16).
2. NRPS iterativos o de tipo B: se caracterizan por que pueden reutilizar módulos específicos durante un ciclo biosintético, dando como resultado que ciertos módulos incorporen el mismo sustrato varias veces. Ocasionalmente este mecanismo lleva a la formación de compuestos simétricos, como el antibiótico gramicidina S y los depsipéptidos bassianolida, eniatina y beuvaricina. Como consecuencia de la naturaleza de su ciclo biosintético, este tipo de NRPS requiere una posición de almacenamiento para los intermedios que se ensamblan, a su vez estos intermedios pueden almacenarse en el dominio PCP (16).

La activación de iterativa y la incorporación de un sustrato pueden durar hasta 5

ciclos de elongación en ciertos tipos de NRPS, siendo el péptido de liberación que desencadene el paso final de descarga debido a la longitud que tomo durante el crecimiento (16).

- NRPS no lineales o de tipo C: se caracterizan por que ensamblan su producto utilizando un mecanismo similar a la de los NRPS iterativos, sin embargo, no se trata de un módulo específico que se reutiliza varias veces, sino de un dominio individual. Generalmente, este es un dominio A que proporciona aminoacil-AMP a otros dominios además de su dominio PCP afín. Incluso a diferentes NRPS (16).

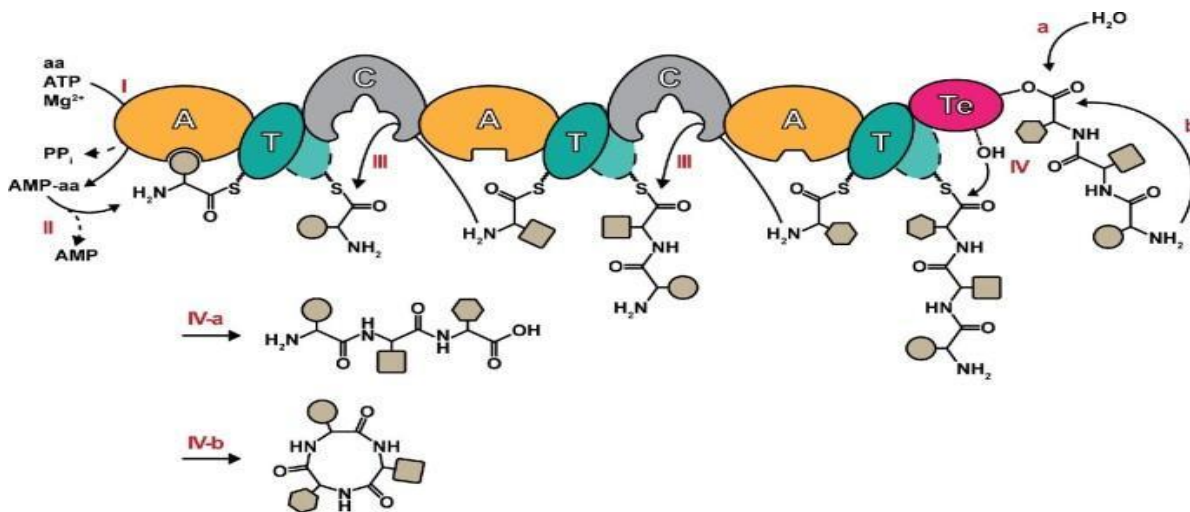


Ilustración 7. Arquitectura de un péptido sintetasa trimodular no ribosómico. Se observa el ciclo de este tipo de enzimas, siendo el más simple entre los NRPS. La síntesis NRP da inicio con los dominios de adenilación activando sustratos específicos usando ATP, generando aminoacil-AMP (16).

Sistemas biosintéticos PKS

Los sistemas biosintéticos policétido sintasa (PKS), son una familia de catalizadores multifuncionales que tienen la capacidad de sintetizar una gran variedad de productos naturales complejos (tabla 6), debido a su gran modularidad funcional, por lo que tienen una gran importancia, siendo así, un objetivo para la ingeniería molecular (17).

| Nombre del compuesto bioactivo | Bioactividad |
|--------------------------------|-------------------------------|
| Eritromicina | Antibiótico |
| Avermectina | Antiparasitario |
| Lovastatina | Agente reductor de colesterol |
| FK506 | Inmunosupresor |
| Epotiloma | Quimioterapéutico |

Tabla 6. Compuestos naturales con diferente bioactividad sintetizados por sistemas biosintéticos policétido sintasas (PKS). En la tabla se observan los nombres de algunos compuestos naturales bioactivos (20).

Haciendo una analogía estructural y funcional con los sistemas NRPS, PKS tiene una organización modular (Ilustración 8) que contiene tres dominios catalíticos: los dominios a AT incorporan malonilo o metilmalonil-CoA, mientras que los dominios KS forman un enlace Carbono-Carbono. El dominio ACP es equivalente al dominio portador de péptidos (PCP) de sistemas NRPS. Los dominios de citorreducción (KR) y deshidratación (DH) son dominios auxiliares en sistemas PKS. También se han observado dominios de enoilreductasa (ER) generando una mayor reducción de los dobles enlaces carbono-carbono (2).

Existe otro tipo de dominios en sistemas PKS o también conocidos como dominios emergentes trans-AT o PKS sin AT. Se caracterizan principalmente de tales PKS es la ausencia de dominios AT que actúan en cis integrados dentro de cada módulo de extensión de PKS, sin embargo, esta actividad de carga de sustrato esencial se proporciona in-trans a través de acción de los AT autónomos que actúan en trans codificados dentro del grupo de genes de la sintasa (2).

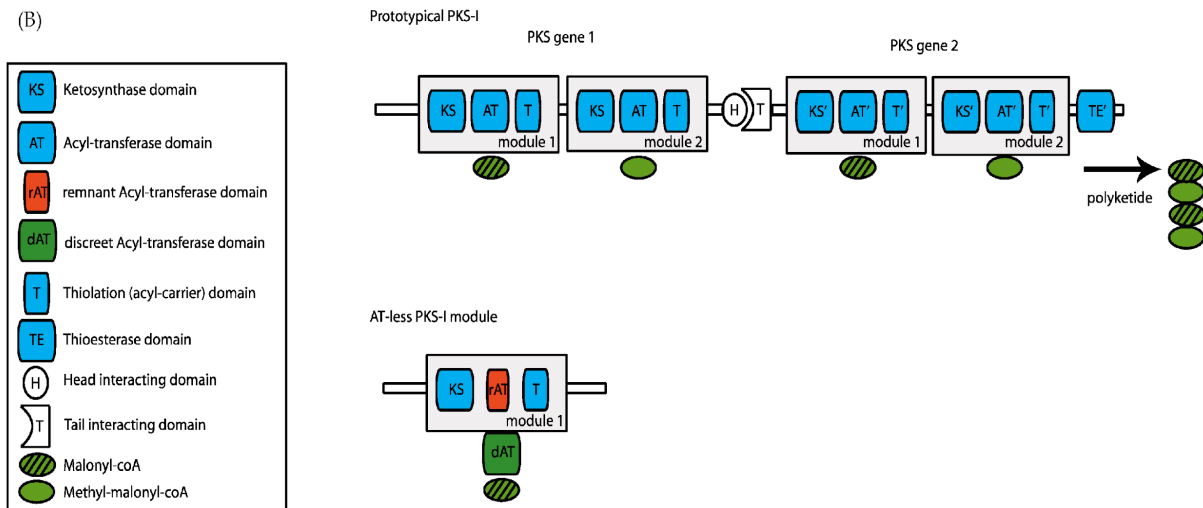


Ilustración 8. Organización de módulos de policétido sintasas de tipo I. En la ilustración se observa la arquitectura y función de cada dominio, los dominios están representados de color azul y con una letra de acuerdo su función, en total presenta cuatro dominios: KS, AT, T y TE. En su estructura presenta otros compuestos como Malonil-coA representado con un ovalo color verde con franjas negras y Metil-malonil-coA representado con un ovalo color verde. En la ilustración también se observa en la parte inferior izquierda un Módulo PKS-I sin AT donde se caracterizan por la ausencia de dominios AT integrados dentro de cada módulo de extensión (2).

Los sistemas biosintéticos PKS se clasifican en tres tipos (ilustración 9):

1. PKS-I: se caracterizan por ser proteínas multifuncionales compuestas de varios dominios funcionales, se hallan principalmente en bacterias y hongos. Estos sistemas se subdividen en PKS iterativas y PKS de línea de montaje o PKS modulares, los PKS iterativos catalizan múltiples ciclos de elongación de cadena utilizando el mismo conjunto de dominios enzimáticos, la cadena de policétido formada se canaliza de un módulo a otro dentro de una PKS de línea de ensamblaje,

donde cada módulo cataliza solo un ciclo de elongación. Las PKS de tipo iterativas se encuentran principalmente en hongos, mientras que la arquitectura de línea de montaje predomina en bacterias (20).

2. PKS-II: se caracterizan por estar formadas por dominios catalíticos discretos, se hallan principalmente en bacterias (20).
3. PKS-III: se caracterizan por ser chalcona sintasa más simple que son un tipo de enzimas que catalizan la formación del producto dentro de un solo sitio activo, se hallan principalmente en plantas y bacterias (20)

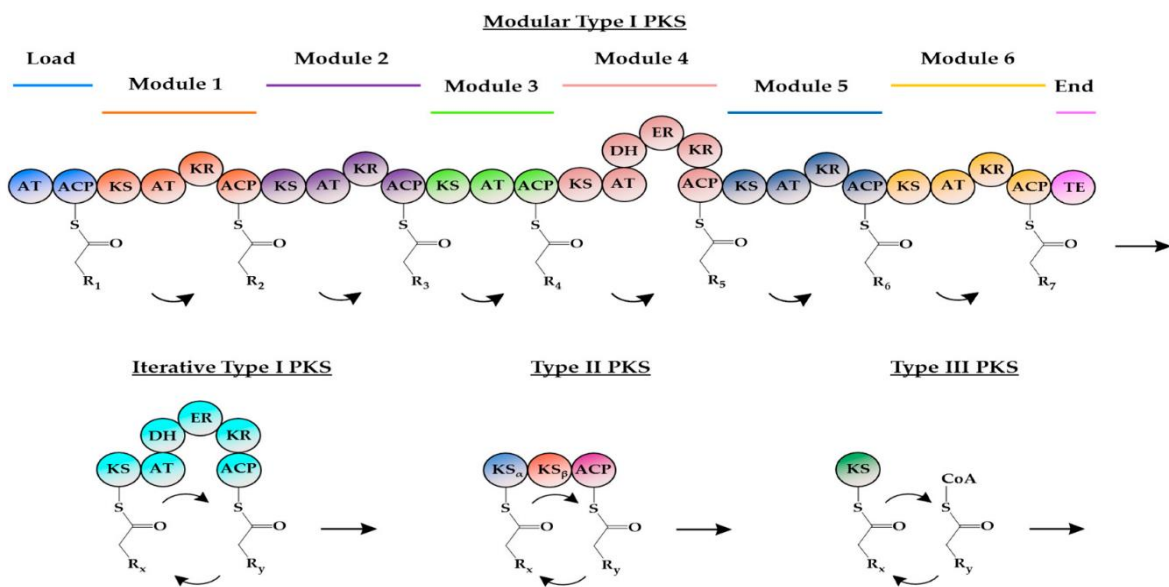


Ilustración 9. Organización de dominios de los diferentes tipos de PKS. En la parte superior se observa un sistema PKS modular de tipo I donde, los dominios se organizan en 6 módulos diferentes representados con varios colores: naranja (modulo 1), morado (modulo2), verde (modulo 3), rosa (modulo 4), azul (modulo 5), amarillo (modulo 6), cada módulo es responsable de un solo paso de condensación descarboxiladora en la formación de policétidos. En la parte inferior de la ilustración se observa PKS I de tipo iterativo, PKS tipo II y PKS tipo III, los PKS I iterativos, se caracterizan por que los dominios funcionales se agrupan en un solo módulo y cada dominio se usa repetidamente durante la síntesis de policétidos, los PKS II son complejos multienzimáticos disociables, donde en cada proteína va un dominio catalítico único e independiente que se utiliza durante la síntesis de policétidos y por último los PKS III que de cierta manera son iterativos sin embargo no requieren un ACP la elongación de la cadena de policétido (18).

Identificación de actinobacterias

Las actinobacterias representan un gran porcentaje entre los principales linajes del dominio *Bacteria*, siendo un género que se caracteriza por tener gran diversidad en términos de su morfología, fisiología y metabolismo. Para la identificación de actinobacterias, las principales características utilizadas para delimitar a nivel de género y especie son la morfología microscópica y la quimiotaxonomía (3).

El estudio de morfología microscópica ha tomado en cuenta distintos parámetros, sin embargo, este género presenta una amplia variedad de morfologías, por lo que generalmente difieren principalmente a la presencia o ausencia de micelio, el color del micelio, la producción de pigmentos melanoideos difusibles, la estructura y apariencia de sus esporas (3).

La clasificación quimiotaxonómica es importante el estudio morfológico de actinobacterias, generalmente este tipo de clasificación se centra en el uso de la distribución de componentes químicos para agrupar organismos según las similitudes de su composición química celular. Generalmente se han utilizado diferentes componentes químicos, principalmente los aminoácidos de la pared celular, lípidos, proteínas, las menaquinonas, diferentes tipos de ácido murámico, los azúcares y la composición básica del DNA (3).

En estudios más recientes, se ha utilizado una clasificación molecular, siendo esta una importante herramienta gracias al rápido avance de la secuenciación del genoma, dando como consecuencia que no se puede identificar una nueva especie sin un análisis genético (3).

Herramientas bioinformáticas para la búsqueda de sistemas biosintéticos de péptidos no ribosómicos (NRP) y policétidos (PK)

El uso de estas herramientas ha permitido la secuenciación rápida del genoma completo de genomas y metagenomas bacterianos, con la ventaja de que son de bajo costo, esto derivado de los avances que se han realizado a tecnologías de secuenciación de ácidos nucleicos, ejemplo de ello son Illumina, Ion protón y Pacific Biosciences. Han tomado una gran importancia derivado del descubrimiento de genes a gran escala, predicciones de vías bioquímicas que, han provocado una generación masiva de datos genómicos microbianos, sin embargo, esta acumulación masiva de datos es un desafío importante para la investigación *in silico* sobre cómo llevar a cabo el almacenamiento, organización, análisis y enfatizando en, cómo mostrar el conocimiento (2)

Existen bases de datos completas que se van actualizando, se encuentran disponibles de forma gratuita, por ejemplo, NCBI que es una base de datos que almacena más de 2700 genomas procarióticos completos disponibles para cualquier persona. Como primeras etapas básicas en el análisis genómico o metagenómico se encuentran la de novomontaje, predicción de genes y anotación funcional. Posterior a estas primeras etapas básicas, comienzan la segunda etapa que incluye la detección de genes NRPS y PKS incluyendo sus grupos o vías. Unas herramientas utilizadas ampliamente denominadas como BLAST y el modelo Markov (HMMER) son algoritmos que se utilizan ampliamente en la identificación

de rutas NRPS y PKS (2).

El trabajo y esfuerzo científico ha llevado al desarrollo de herramientas bioinformáticas (tabla 7) que se centran ampliamente en la detección de grupos, genes de metabolitos secundarios y específicamente en la detección de proteínas que se sintetizan vía NRPS y PKS (2).

| Herramienta bioinformática | Aplicaciones y características |
|---|---|
| AntiSMASH 3.0 http://antismash.secondarymetabolites.org/ | Herramienta informática independiente, utilizada para la identificación genómica automática, permitiendo el análisis de grupos de genes biosintéticos como NRPS y PKS. |
| NaPDoS http://napdos.ucsd.edu | Herramienta informática que se utiliza para predecir el tipo de compuestos que se sintetizara mediante el uso de etiquetas de secuencia, específicamente de genes NRPS y PKS. |
| NRPSpredictor2 nrps.informatik.uni-tuebingen.de | Herramienta informática específica que se utiliza para predecir dominios como el A en NRPS. |
| SBSPKS http://www.nii.ac.in/~pkssdb/sbspks/master.html | Herramienta informática integral de la secuencia y características estructurales de grupos de genes de PKS, se utiliza para el análisis de secuencias y estructuras. |
| NRPS-PKS-substrate-predictor http://www.cmbi.ru.nl/NRPS-PKS-substrate-predictor | Herramienta informática que se utiliza para predecir dominios en NRPS y PKS. |
| NORINE http://bioinfo.lifl.fr/norine/ | Herramienta informática utilizada como base de datos, se utiliza para la consulta de nombres de compuestos, actividad, estructura, peso molecular, número de monómeros de aminoácidos, así como referencias bibliográficas y los organismos que producen. |
| CusterMine360 www.clustermine360.ca | Herramienta informática que se centra en la base de datos útiles de grupos de genes de policétidos microbianos y péptidos no ribosómicos, además es muy útil para el análisis filogenético. |

Tabla 7. Herramientas bioinformáticas utilizadas para la consulta, predicción e identificación de sistemas biosintéticos NRPS y PKS, así como la predicción de metabolitos (2).

Cepas de estudio

En las instalaciones de la Universidad Autónoma Metropolitana unidad Xochimilco, en el departamento de sistemas biológicos, edificio N, laboratorio 202 de Producción de Biológicos, tienen una colección de bacterias que, entre esta colección, se encuentran actinobacterias, aisladas de diferentes fuentes.

La recolección de diferentes cepas de actinobacterias del laboratorio de Producción de Biológicos de la Universidad Autónoma Metropolitana unidad Xochimilco, data de hace más de 30 años y se centra en la conservación *ex situ*, cuyo objetivo principal es mantener la supervivencia a través de un proceso en el que se protege a una especie fuera del ambiente en el que habita. Esta conservación de biodiversidad de actinobacterias ha sido de gran importancia, ya que ha permitido el estudio de diferentes proyectos de investigación, proyectos escolares, docencia y tesis de licenciatura, maestría y doctorado (13).

La colección de cepas que fueron asignadas para el presente trabajo está clasificada con un número y letra (Tabla 8), esta colección de cepas fue aislada de tierra contaminada con hidrocarburos.

| Clave de la cepa |
|-------------------------------|
| 9 ₅ S |
| 8 ₄ S |
| 8 ₂ S |
| 8 ₁ S |
| 9 ₂ S |
| 9 ₁ S |
| 9 _S |
| 9 ₆ S |
| 9 ₅ S _B |
| Av4e3D |
| Av4eBa |

Tabla 8. Colección de cepas de actinobacterias aisladas de tierra contaminada con hidrocarburos conservadas en el laboratorio de Producción de Biológicos en la Universidad Autónoma Metropolitana unidad Xochimilco.

Planteamiento del problema

En la actualidad existen tratamientos médicos que se están convirtiendo en ineficientes debido al incremento de bacterias multirresistentes y al surgimiento de enfermedades emergentes infecciosas, metabólicas y/o inmunológicas por el estilo de vida de las poblaciones. Por ejemplo, el COVID-19, cánceres, ébola, etc. Por este incremento de enfermedades que no son tratadas de manera oportuna y eficiente se ha propuesto la búsqueda de alternativas terapéuticas para combatir las.

La OMS tiene en su lista de enfermedades infecciosas prioritarias para ser atendidas a aquellas infecciones por bacterias multirresistentes. Alrededor del mundo se están buscando alternativas terapéuticas novedosas y eficientes.

Justificación

Las actinobacterias han demostrado actividad productora de metabolitos secundarios útiles en farmacología. Estas bacterias contienen genes biosintéticos capaces de codificar productos naturales que se pueden utilizar en clínica humana y veterinaria, en la industria de alimentos, en agricultura y en biotecnología. El presente proyecto demuestra la capacidad biosintética y el potencial de las actinobacterias para producir moléculas novedosas de interés farmacológico.

Objetivos

Objetivo general

Detectar el potencial biosintético y la clasificación taxonómica de actinobacterias aisladas de suelo contaminado.

Objetivos específicos

1. Determinar la relación fenotípica de las cepas de estudio.
2. Realizar la identificación molecular de las cepas de estudio.
3. Detectar los sistemas biosintéticos NRPS-I, NRPS-2, PKS-I y PKS-2 en las cepas de estudio.
4. Analizar la relación filogenética de las cepas de estudio.

Metodología

Activación y siembra de cepas de estudio

Para la activación de las cepas de estudio, se incubaron en una estufa durante 24 horas a 37 °C, posteriormente se prepararon medios de cultivo Agar Dextrosa Sabouraud al 1 % de papa y medio de cultivo Bennet, la forma de preparación se realizó de la siguiente manera:

Medio de cultivo BHI (500 mL)

1. Se pesaron 18.5 g de medio BHI, 7.5 g de agar bacteriológico y 5 g de papa, se disolvieron en 500 mL de agua destilada.
2. Se dejó hervir durante 1 minuto y se llevó a esterilizar en autoclave, las condiciones de esterilización fueron las siguientes: 118-121 °C, 15 minutos.
3. En el cuarto estéril se vació el medio en cajas Petri estériles pequeñas y se dejaron gelificar.
4. Una vez gelificado el medio las placas se llevaron a la estufa y se incubaron durante 24 horas, donde se verificó que no estuvieran contaminadas.

Medio de cultivo Bennet (500 mL)

1. Se pesaron 0.5 g de extracto de levadura, 0.5 g de extracto de carne, 1 g de caseína digerida, 5 g de glucosa, 7.5 g de agar bacteriológico.
2. Se dejó hervir durante 1 minuto y se llevó a esterilizar en autoclave, las condiciones de esterilización fueron las siguientes: 118-121 °C, 15 minutos.
3. En el cuarto estéril se vació el medio en cajas Petri estériles pequeñas y se dejaron gelificar.
4. Una vez gelificado el medio las placas se llevaron a la estufa y se incubaron durante 24 horas, donde se verificó que no estuvieran contaminadas.

Una vez pasado 24 horas, se sembraron las cepas de estudio en condiciones asépticas con ayuda de 2 mecheros, la siembra se realizó de la siguiente forma:

1. Se esterilizó un asa bacteriológica en la flama del mechero durante unos segundos al rojo vivo y se enfrió en la placa
2. Se tomó una asada de la cepa de estudio y se sembró por la técnica de dilución
3. Se llevó a incubar en una estufa a 37 °C durante 24 horas

Este procedimiento se realizó con cada una de las cepas.

Caracterización macroscópica y microscópica

Para la caracterización macroscópica, se realizó una caracterización visual de las colonias crecidas en las placas donde se observaron características como el color, la forma, el margen, la elevación y consistencia.

Para la caracterización microscópica, se realizaron tinciones de Gram posterior a su siembra es decir a las 24 horas, 48 horas y 72 horas, esto con la finalidad de observar la fragmentación de las hifas de las cepas, la tinción se realizó de la siguiente manera:

Preparación del frotis.

1. Se esterilizó un asa bacteriológica en la flama del mechero durante unos segundos al rojo vivo, se tomó una asada de agua potable y se colocó en un portaobjetos.
2. Se esterilizó el asa bacteriológica en la flama del mechero durante unos segundos al rojo vivo, se enfrió en la placa donde posteriormente se tomó una asada de la cepa y se esparció en la gota de agua que se colocó en el portaobjetos y se fijó en la flama del mechero.

Tinción de Gram

1. Se cubrió el frotis con cristal violeta durante 1 minuto y se enjuago con agua potable.

2. Se cubrió el frotis con Lugol durante 1 minuto y se enjuago con agua potable.
3. Se hizo un lavado con alcohol-acetona al frotis durante uno segundo y se enjuago con agua potable.
4. Se cubrió con safranina durante 1 minuto y se enjuago con agua potable.
5. Se dejaron secar cada una de las tinciones y posteriormente se visualizaron en el microscopio.

Sensibilidad a antibióticos

Para realizar la prueba de sensibilidad a antibióticos, se utilizaron sensidiscos con antibióticos comerciales (Tabla 9) y se realizó de la siguiente manera:

| Antibiótico | Abreviación |
|----------------------------|-------------|
| Vancomicina | VA |
| Sulfametoxazol/Trimetoprim | STX |
| Ciprofloxacino | CPF |
| Ampicilina | AM |
| Cefalotina | CF |
| Cefotaxima | CFX |
| Clindamicina | CLM |
| Dicloxacilina | DC |
| Eritromicina | E |
| Gentamicina | GE |
| Penicilina | PE |
| Tetraciclina | TE |

Tabla 9. Sensidiscos con antibióticos comerciales y su abreviación que se utilizaron para la prueba de sensibilidad a antibióticos realizada a las cepas de estudio.

1. Se sembraron unidades formadoras de colonias en placas de medio Sabouraud con la técnica de estría masiva y se dejaron incubar durante 24 horas en una estufa a 37 °C.
2. Se preparó el área en condiciones asépticas, posteriormente se esterizaron unas pinzas de disección con alcohol y se flameó en el mechero.
3. Se tomó el kit de sensidiscos con las pinzas de disección estériles y se colocó en la placa que donde se sembró la unidad formadora de colonias, se dejaron incubar

durante 24 horas en una estufa a 37 °C.

Actividad antimicrobiana

Para realizar la prueba de actividad antimicrobiana se utilizaron cepas multirresistentes *K. rancola*, *A. barnani*, *E. coli* cepa *FIH076*, *K. pseudomona* cepa *FH1068*, *E. coli* *SEC66*, *E. coli* cepa *FURO20* (Tabla 10) y se realizó de la siguiente manera:

1. En placas de medio Bennet se sembró una unidad formadora de colonia, la forma de la estría fue una línea recta que tocara un extremo de la placa al otro, de igual forma el grosor de la estría fue de aproximadamente de 1 a 2 centímetros, posteriormente se llevaron a incubar a una estufa a 37 °C por una semana.
2. Pasado la incubación de las cepas de estudio por una semana, se prosiguió a sembrar en la misma placa 6 cepas multirresistentes, esto de forma adyacente a la cepa de estudio que creció de tal forma que tuviera contacto la cepa de estudio y la cepa multirresistente.
3. Se llevaron a incubar a una estufa a 37 °C.
4. En placas de medio Bennet divididas en tres secciones, se sembró una cepa multirresistente con la finalidad de tener un control.

Extracción de ADN de las cepas de estudio

Para realizar la extracción de ADN de cada una de las cepas de estudio, se llevó a cabo el procedimiento especificado por el fabricante del Kit Promega Wizard del laboratorio Genomic, y se realizó de la siguiente manera:

1. Con una micropipeta se tomaron 480 microlitros de EDTA 0.5 M y se vaciaron en un tubo eppendorf de 2 mL, posteriormente con un asa bacteriológica se resuspendieron células de las cepas de estudio.
2. Se adicionaron 120 microlitros de lisozima y se mezcló cuidadosamente.
3. La muestra se llevó a incubar a una estufa a 37 °C durante una hora.

4. Se centrifugó la muestra a 14000 rpm durante 2 minutos y se removió el sobrenadante.
5. Se adicionaron 600 microlitros de solución de lisis nuclear del paquete de purificación de ADN y se mezcló cuidadosamente.
6. La muestra se llevó a incubar en baño María a 80 °C durante 5 minutos y se dejó enfriar a temperatura ambiente.
7. Se adicionaron 3 microlitros de solución de ARNasa y se mezcló por inversión de tubo tres veces.
8. La muestra se llevó a incubar a una estufa a 37 °C durante una hora y se dejó enfriar a temperatura ambiente.
9. Se adicionaron 200 microlitros de solución de precipitado de proteínas y se agitó en vortex durante 20 segundos.
10. La muestra se llevó a incubar en hielo durante 5 minutos.
11. Se centrifugó la muestra a 14000 rpm por 3 minutos y se transfirió el sobrenadante a un tubo eppendorf de 1.5 mL que contenía 600 microlitros de isopropanol.
12. Se mezcló la muestra suavemente hasta que se observó la formación de las hebras de ADN.
13. La muestra se centrifugó a 14000 rpm durante 2 minutos y se drenó en un papel absorbente durante 15 minutos aproximadamente.
14. Se adicionaron 600 microlitros de etanol al 70 % y se agitó cuidadosamente la muestra evitando que el pellet de ADN se despegara.
15. La muestra se centrifugó a 14000 rpm durante 2 minutos y se drenó en un papel absorbente durante 10 minutos.
16. Se adicionaron 100 microlitros de solución rehidratante y se dejó en refrigeración a 4 °C durante 12 horas.

Amplificación del gen 23S a las cepas de estudio

Para realizar la amplificación del gen 23S se utilizaron materiales de biología molecular y un volumen determinado de cada material (Tabla 11)

| Material | Volumen utilizado (microlitros) |
|---|---------------------------------|
| ADN | 5 |
| Primer 23S InsF, 5'-(AC)A(AGT)GCGTAG(AGCT)CGA(AT)GG-3' | 2.5 |
| Primer 23S InsR 5'-GTG(AT)CGGTTT(AGCT)(GCT)GGTA-3' | 2.5 |
| Taq Go G2 Green Master Mix | 12.5 |
| Agua libre de nucleasas | 2.5 |
| Total, uL para PCR | 25 |

Tabla 10. Materiales de biología molecular para realizar el mix de PCR para la amplificación del gen 23S y los volúmenes utilizados.

El procedimiento que se realizó fue de la siguiente manera:

1. Se hicieron los cálculos para realizar un solo mix para 11 muestras.
2. Se colocó agua libre de nucleasas en un tubo eppendorf.
3. Se colocaron los primers InsF y InsR.
4. Se colocó la Taq Go G2 Green Master Mix.
5. El mix se mezcló en vortex por unos segundos.
6. En tubos PCR se colocaron 5 microlitros de ADN de cada cepa de estudio y se mezcló durante unos segundos.
7. Se colocaron en el termociclador para llevar a cabo la reacción en cadena polimerasa.

Las condiciones de PCR fueron las siguientes: un ciclo de pre-desnaturalización durante 5 minutos a una temperatura de 94 °C; ciclo de desnaturalización durante 30 segundos a una temperatura de 94 °C; ciclo de acoplamiento durante 45 segundos a una temperatura de 46 °C; ciclo de elongación durante 50 segundos a una temperatura de 72 °C; se repitieron por 29 ciclos y un ciclo de post elongación.

Amplificación de sistemas PKS1 y PKS2

Para realizar la amplificación del sistema PKS1 y PKS2 se utilizaron materiales de biología molecular y un volumen determinado de cada material (Tabla 12)

| Material | Volumen utilizado (microlitros) |
|----------------------------|---------------------------------|
| ADN | 3 |
| Primer K1F | 2 |
| Primer M6R | 2 |
| Go Taq G2 Green Master Mix | 12 |
| Agua libre de nucleasas | 6 |
| Total, mix para PCR | 25 |

Tabla 11. Materiales de biología molecular para realizar el mix de PCR para la amplificación del sistema PKS1 y los volúmenes utilizados.

El procedimiento que se realizó fue de la siguiente manera:

1. Se hicieron los cálculos para realizar un solo mix para 11 muestras.
2. Se colocó agua libre de nucleasas en un tubo eppendorf.
3. Se colocaron los primers K1F y M6R,
4. Se colocó la Taq Go G2 Green Master Mix.
5. El mix se mezcló en vortex por unos segundos.
6. En tubos PCR se colocaron 3 microlitros de ADN de cada cepa de estudio y se mezcló durante unos segundos.
7. Se colocaron en el termociclador para llevar a cabo la reacción en cadena

polimerasa.

Amplificación de sistema NRPS1

Para realizar la amplificación del sistema NRPS1 se utilizaron materiales de biología molecular y un volumen determinado de cada material (Tabla 13).

| Material | Volumen utilizado (microlitros) |
|----------------------------|---------------------------------|
| ADN | 3 |
| Primer A3F | 2 |
| Primer A7R | 2 |
| Go Taq G2 Green Master Mix | 12.5 |
| Agua libre de nucleasas | 5.5 |
| Total, mix para PCR | 25 |

Tabla 12. Materiales de biología molecular para realizar el mix de PCR para la amplificación del sistema NRPS1 y los volúmenes utilizados.

El procedimiento que se realizó fue de la siguiente manera:

1. Se hicieron los cálculos para realizar un solo mix para 11 muestras.
2. Se colocó agua libre de nucleasas en un tubo eppendorf.
3. Se colocaron los primers A3F y A7R.
4. Se colocó la Taq Go G2 Green Master Mix.
5. El mix se mezcló en vortex por unos segundos.
6. En tubos PCR se colocaron 3 microlitros de ADN de cada cepa de estudio y se mezcló durante unos segundos.
7. Se colocaron en el termociclador para llevar a cabo la reacción en cadena polimerasa.

Resultados y discusión

Las cepas de estudio tuvieron un crecimiento que, durante las 24- 48 horas ya se podían observar las colonias en las placas de medio de cultivo, en cuanto a los resultados de la caracterización macroscópica, se observan en la tabla 14 y en la ilustración 10.

| Clave de la cepa | Color de las colonias | Textura | Forma | Elevación | Margen |
|-------------------------------|-----------------------|---------|----------------------|------------------|-----------------|
| 9 ₅ S | Crema | Suave | Puntiforme-irregular | Convexa-umbonada | Entero-ondulado |
| 8 ₄ S | Naranja | Suave | Puntiforme-irregular | Convexa-umbonada | Entero-ondulado |
| 8 ₂ S | Naranja | Suave | Circular-irregular | Convexa-umbonada | Entero-ondulado |
| 8 ₁ S | Crema | Suave | Irregular | Convexa-umbonada | Entero-ondulado |
| 9 ₂ S | Crema | Suave | Puntiforme-irregular | Convexa-umbonada | Entero-ondulado |
| 9 ₁ S | Crema | Suave | Puntiforme-irregular | Convexa-umbonada | Entero-ondulado |
| 9 _s | Crema | Suave | Circular | Convexa-umbonada | Entero-ondulado |
| 9 ₆ S | Crema | Suave | Irregular | Convexa-umbonada | Entero-ondulado |
| 9 ₅ S _B | Crema | Suave | Puntiforme-irregular | Convexa-umbonada | Entero-ondulado |
| Av4e3D | Amarilla | Suave | Puntiforme-irregular | Convexa-umbonada | Entero-ondulado |
| Av4eBa | Amarilla | Suave | Puntiforme-irregular | Convexa-umbonada | Entero-ondulado |

Tabla 13. Resultados de la caracterización macroscópica realizados a las 11 cepas de estudio. Se observaron principalmente las siguientes características: color de las colonias, la textura que presentaron al contacto con el asa bacteriológica, la forma las colonias, si presentaban elevación y que tipo de elevación, así como el margen que tenían.

Podemos destacar que el color de las colonias varia en tres colores (crema, amarillo y naranja), en cuanto a la textura, todas las cepas presentaban una textura en común (suave) por lo que la manipulación era fácil, la forma varia más en comparación con otras características ya que se presentaron formas puntiformes, irregular y circular, todas las cepas de estudio presentaron una elevación convexa-umbonada.

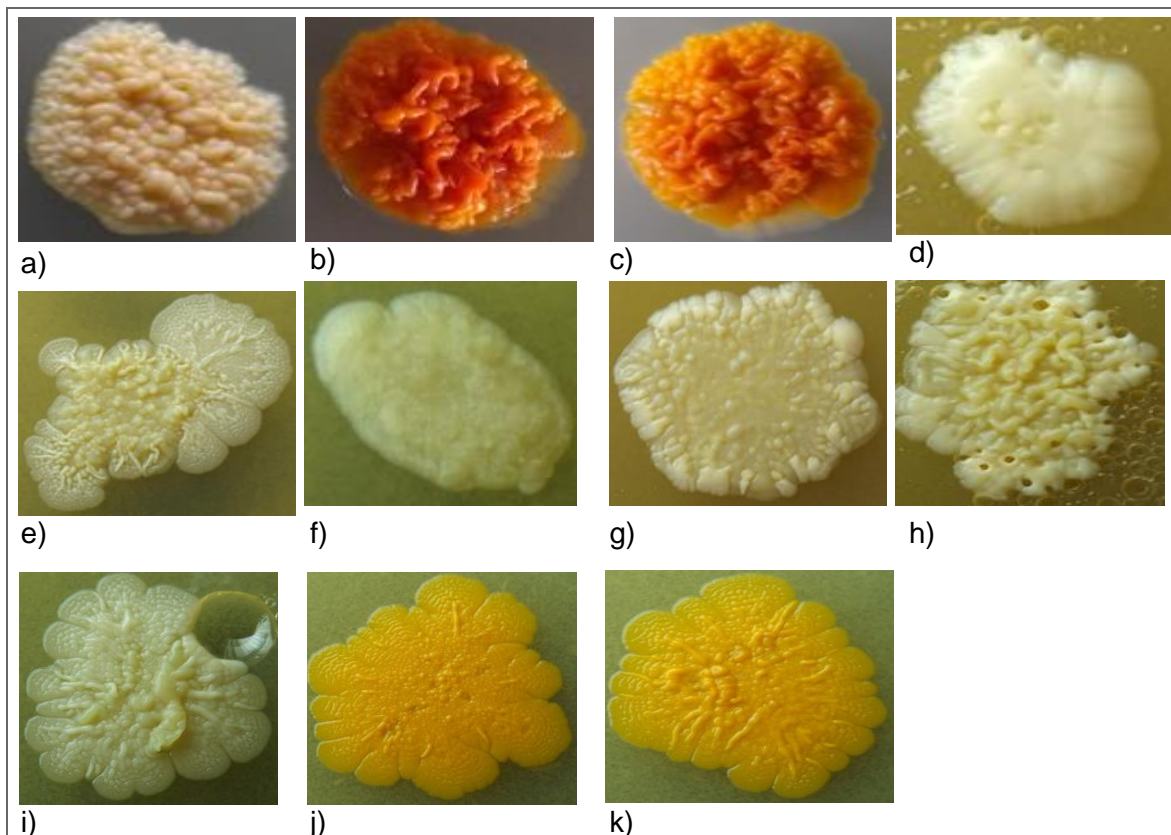


Ilustración 10. Fotografías coloniales realizadas a las cepas de estudio aisladas de suelo contaminado con hidrocarburos. Clave de la cepa: a) 95S, b) 84S, c) 83S, d) 81S, e) 92S, f) 91S, g) 9S, h) 96S, i) 95SB, j) Av4e3D, k) Av4eBa.

Como se observa en la ilustración, las colonias presentan tres colores diferentes, crema, amarillo y naranja, sin embargo, el color crema es el que más se repite, además que se observa la forma, la elevación y el margen de cada una, mostrando variabilidad en las características macroscópicas.

Los resultados que presentaron referente a las características microscópicas se observan en la tabla 15 e ilustración 11.

| Clave de la cepa | Gram | Forma microscópica |
|------------------|------|--------------------|
| 9 ₅ S | + | Hifas ramificadas |
| 8 ₄ S | + | Hifas ramificadas |
| 8 ₂ S | + | Hifas ramificadas |
| 8 ₁ S | + | Hifas ramificadas |
| 9 ₂ S | + | Hifas ramificadas |
| 9 ₁ S | + | Hifas ramificadas |
| 9 _s | + | Hifas ramificadas |
| 9 ₆ S | + | Hifas ramificadas |

Tabla 14. Resultados de caracterización microscópica realizada a las 11 cepas de estudio. Se realizó una tinción de Gram a cada una de las cepas, como se observa en la tabla, todas dieron Gram +, además que se observó la forma microscópica y en todas las cepas se observaron hifas con fragmentación.

| Clave de la cepa | Gram | Forma microscópica |
|-------------------------------|------|--------------------|
| 9 ₅ S _B | + | Hifas ramificadas |
| Av4e3D | + | Hifas ramificadas |
| Av4eBa | + | Hifas ramificadas |

Continuación Tabla 14. Resultados de caracterización microscópica realizada a las 11 cepas de estudio.

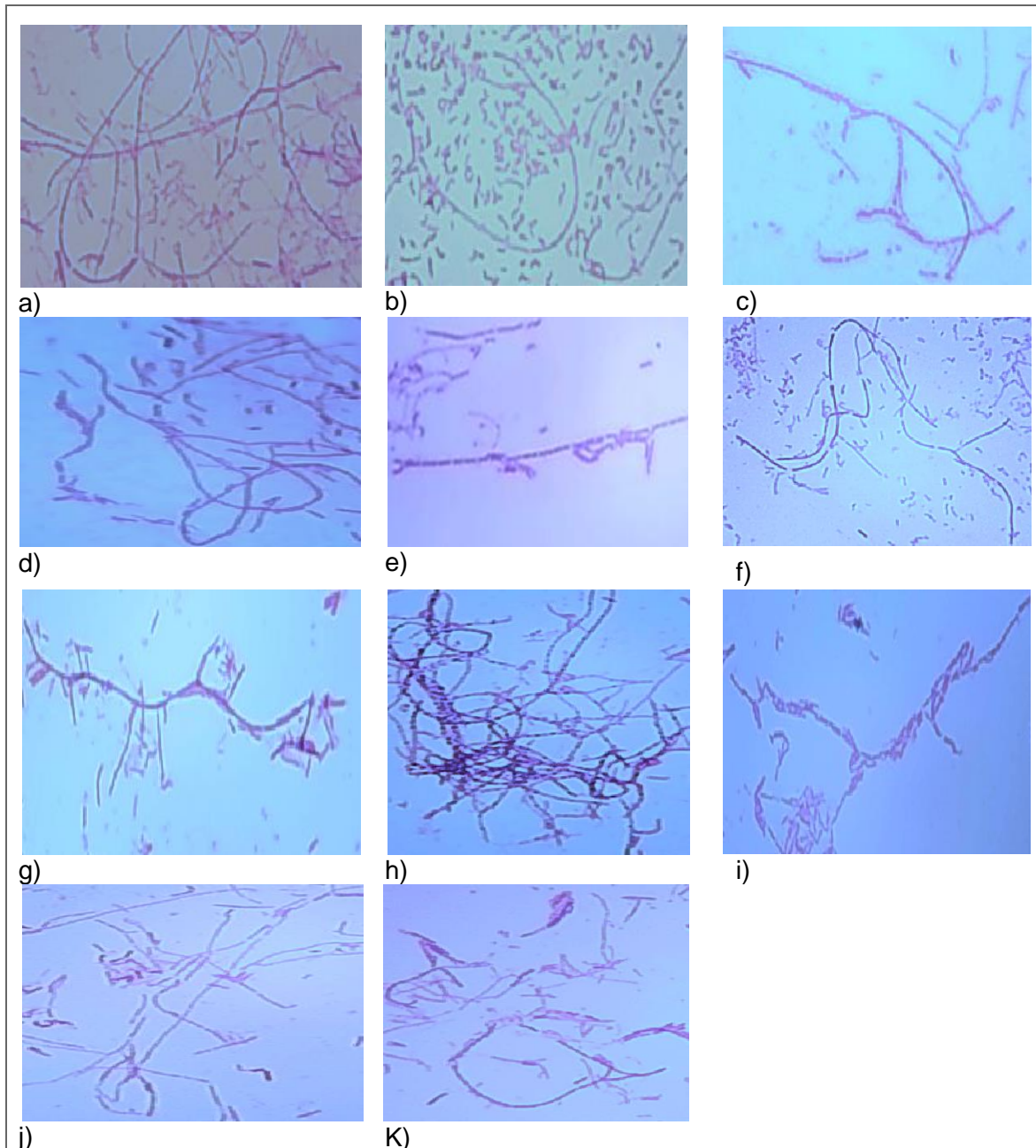


Ilustración 11. Fotografía microscópica de las tinciones de Gram realizadas a las cepas de estudio aisladas de suelo contaminado con hidrocarburos. Clave de la cepa: a) 9₅S, b) 8₄S, c) 8₃S, d) 8₁S, e) 9₂S, f) 9₁S, g) 9₅, h) 9₆S, i) 9₅S_B, j) Av4e3D, k) Av4eBa. En todas las cepas se puede observar que presentan hifas y en algunos casos se puede ver cómo están fragmentando.

Los resultados de sensibilidad a antibióticos que presentaron las cepas de estudio se observan en la tabla 16 e ilustración 12.

| Antibiótico | Clave de la cepa | | | | | | | | | | |
|---|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|----------------|------------------|-------------------------------|--------|--------|
| | 9 ₅ S | 8 ₄ S | 8 ₂ S | 8 ₁ S | 9 ₂ S | 9 ₁ S | 9 _s | 9 ₆ S | 9 ₅ S _B | Av4e3D | Av4eBa |
| Vancomicina (VA) | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S |
| Sulfametoxazol Trimetroprim (SXT) | R | S | R | R | R | R | R | R | R | R | R |
| Ciprofloxacino (CPF) | R | R | R | R | S | R | R | R | R | R | R |
| Ampicilina (AM) | R | R | R | R | R | R | R | R | R | R | R |
| Cefalotina (CF) | R | R | R | R | R | R | R | R | R | R | R |
| Cefotaxima (CFX) | R | R | R | R | R | R | R | R | R | R | R |
| Clindamicina (CLM) | R | R | R | R | R | R | R | R | R | R | R |
| Dicloxacilina (DC) | R | R | R | R | R | R | R | R | R | R | R |
| Eritromicina (E) | R | R | R | R | R | R | R | R | R | R | R |
| Gentamicina (GE) | R | R | R | R | R | R | R | R | R | R | R |
| Penicilina (PE) | R | R | R | R | R | R | R | R | R | R | R |
| Tetraciclina (TE) | R | R | R | R | R | R | R | R | R | R | R |

Tabla 15. Resultados obtenidos de la prueba de sensibilidad a antibióticos. R = Resistente, S = Sensible

El antibiótico Vancomicina (VA), fue el único que inhibió el crecimiento de las once cepas de estudio, es decir fueron sensibles a este antibiótico, sin embargo, el antibiótico Ciprofloxacino inhibió el crecimiento únicamente de la cepa 9₂S al igual que el antibiótico Sulfametoxazol/Trimetroprim inhibió el crecimiento únicamente de la cepa 8₄S, siendo sensibles únicamente a estos antibióticos. El resto de los antibióticos utilizados para la prueba no inhibió el crecimiento de las once cepas de estudio, es decir mostraron resistencia a estos antibióticos.

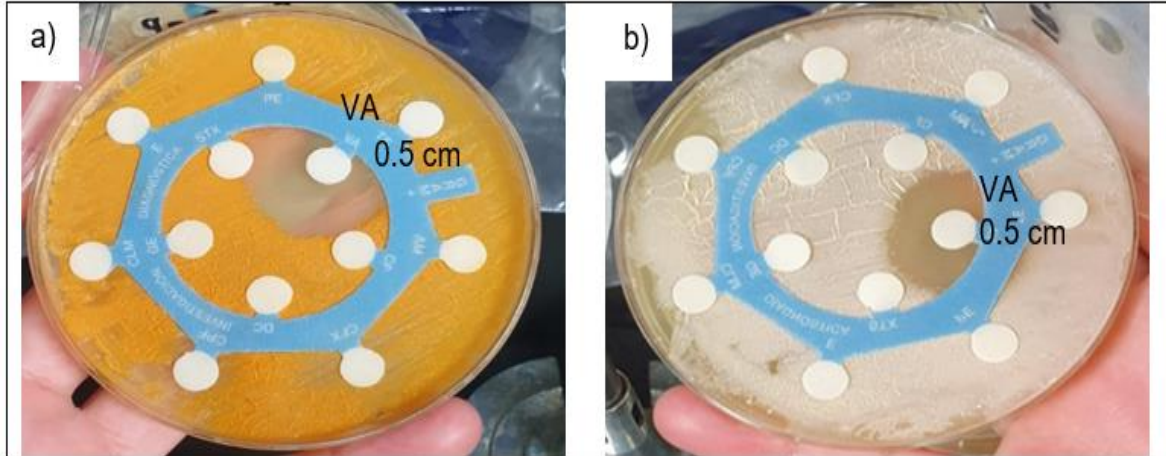


Ilustración 12. Fotografía de la prueba de sensibilidad a antibióticos realizadas a las cepas de estudio. Como se observa en la ilustración, donde a) Cepa Av4e3D, el antibiótico Vancomicina (VA) inhibió el crecimiento microbiano, formando un halo de 0.5 cm de radio, de igual forma b) Cepa 9₅S, el antibiótico Vancomicina (VA) inhibió el crecimiento microbiano formando un halo de 0.5 cm de radio. Además, como se puede observar en a) y b) el resto de los antibióticos no inhibió el crecimiento microbiano, mostrando resistencia.

Los resultados de actividad antimicrobiana que presentaron las cepas de estudio se observan en la tabla 17 y ilustración 13.

| Clave de la cepa | Cepa multirresistente | | | | | |
|-------------------------------|-----------------------|-------------|-----------------|-----------------------|-------------------|-----------|
| | 1.K rancola | 2.A barnani | 3.FIH076 E coli | 4.FH1068 K pseudomona | 5.MCPSEC66 E coli | 6.Furo 20 |
| 9 ₅ S | - | + | - | - | - | - |
| 8 ₄ S | - | - | - | - | - | - |
| 8 ₂ S | + | + | - | + | - | - |
| 8 ₁ S | - | + | + | - | - | + |
| 9 ₂ S | + | + | - | + | - | - |
| 9 ₁ S | - | - | - | - | - | - |
| 9 _s | + | + | - | + | - | + |
| 9 ₆ S | - | - | - | - | - | - |
| 9 ₅ S _B | - | - | - | + | - | - |
| Av4e3D | - | + | + | - | - | + |
| Av4eBa | + | - | - | - | - | - |

Tabla 16. Resultados obtenidos de la prueba de actividad antimicrobiana. (+) inhibió el crecimiento microbiano, (-) no inhibió el crecimiento microbiano.

Como se observa en la tabla, cada cepa de estudio se puso a prueba de actividad antimicrobiana con 6 cepas multirresistentes de origen clínico, donde posiblemente algunas mostraron inhibición de las cepas multirresistentes, es decir, posiblemente sintetizaron un metabolito secundario de supervivencia, sin embargo, las cepas multirresistentes tenían dificultades de crecimiento en las placas del medio de cultivo en que se hizo la prueba, dando como resultados falsos positivos.

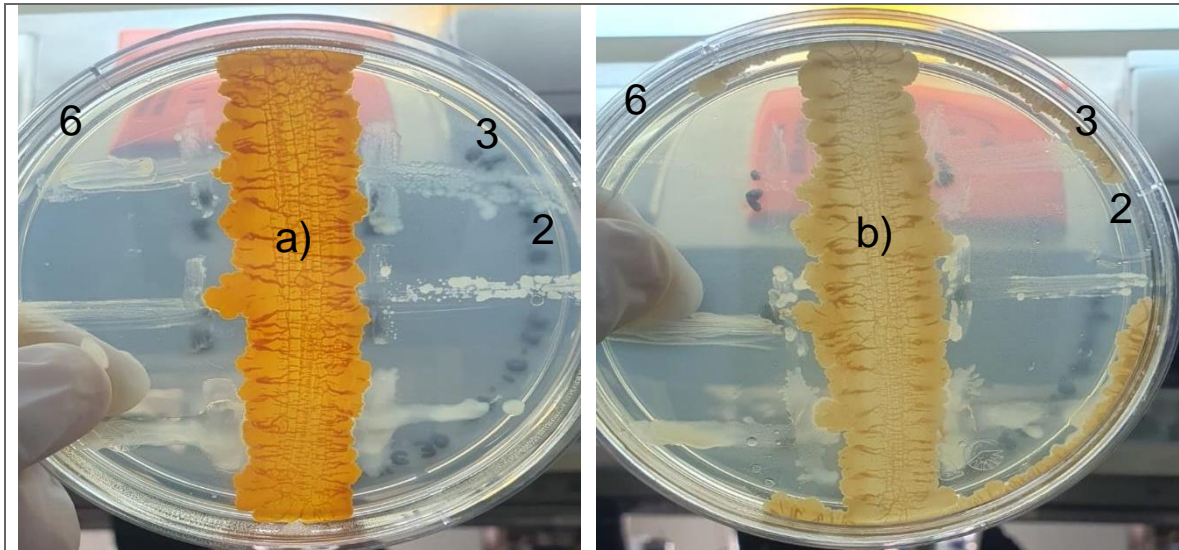


Ilustración 13. Fotografía de la prueba de actividad antimicrobiana realizada a las cepas de estudio. Como se observa en la ilustración, donde a) Ceba Av4e3D, mostro inhibición del crecimiento de cepa multirresistente 2 (*A. barnani*), 3 (FIH076 *E coli*) y 6 (Furo 20) de igual forma b) Ceba 8₁S mostro inhibición de cepas multirresistentes 2 (*A. barnani*), 3 (FIH076 *E coli*) y 6 (Furo 20). El resto de las cepas no tuvo ninguna inhibición (creación propia).

Los resultados de amplificación del gen 23S que presentaron las cepas de estudio se observan en la tabla 18 e ilustración 14.

| Clave de la cepa | Amplifico el gen 23S |
|-------------------------------|----------------------|
| 9 ₅ S | + |
| 8 ₄ S | - |
| 8 ₂ S | + |
| 8 ₁ S | + |
| 9 ₂ S | + |
| 9 ₁ S | + |
| 9 _s | + |
| 9 ₆ S | + |
| 9 ₅ S _B | - |
| Av4e3D | - |
| Av4eBa | - |

Tabla 17. Resultados obtenidos de la amplificación del gen 23S realizado a las cepas de estudio. El símbolo (+) = si amplifico el sistema, el signo (-) = no amplifico el sistema.

Como se observa en la tabla, las cepas 8₄S, 9₅S_B, Av4e3D y Av4eB no amplificaron el gen 23S, sin embargo, en el resto de las cepas, si amplifico el gen.

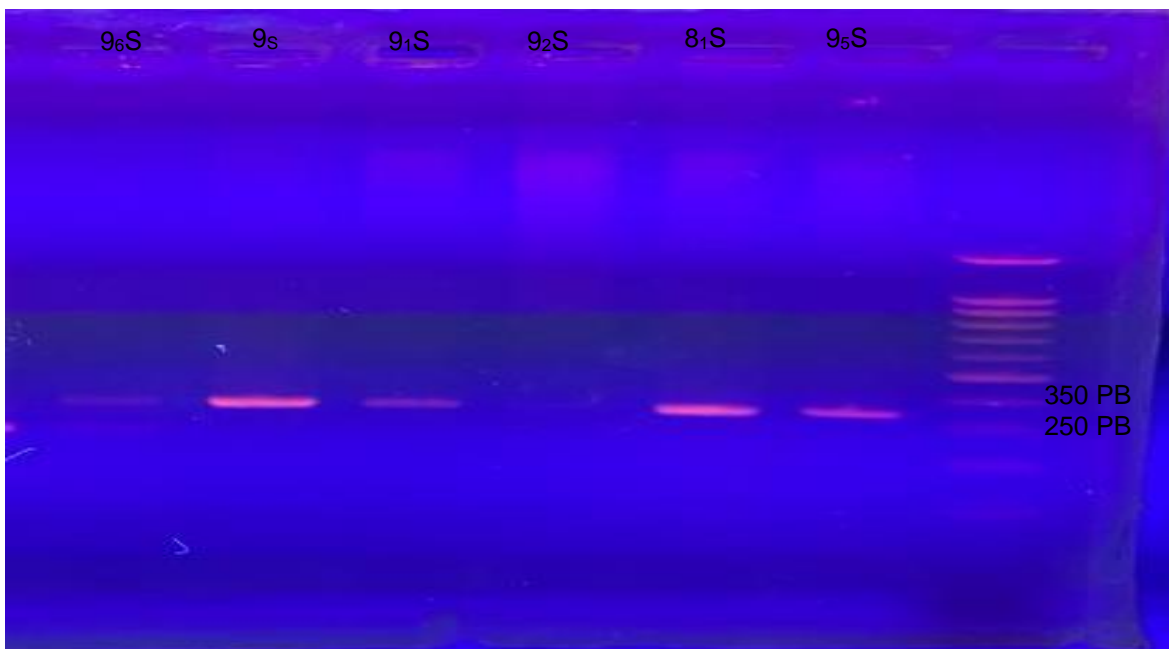


Ilustración 14. Fotografía de electroforesis en gel de agarosa realizada a las cepas de estudio, para visualizar la amplificación del gen 23S. Como se observa en la ilustración, se observan las bandas de las cepas 95S, 81S, 92S, 91S, 9s y 96S.

Los resultados de amplificación del sistema NRPS1 que presentaron las cepas de estudio se observan en la tabla 19 e ilustración 15.

| Clave de la cepa | Amplifico el sistema NRPS1 |
|------------------|----------------------------|
| 95S | + |
| 84S | - |
| 82S | + |
| 81S | - |
| 92S | + |
| 91S | + |
| 9s | + |
| 96S | + |
| 95S _B | + |
| Av4e3D | - |
| Av4eBa | + |

Tabla 18. Resultados obtenidos de la amplificación del sistema NRPS1 realizado a las cepas de estudio. (+) si amplifico el sistema, (-) no amplifico el sistema.

Como se observa en la tabla, las cepas 84S, 81S y Av4e3D fueron las únicas en que el sistema no amplifico, sin embargo, en el resto de las cepas, si amplifico el sistema siendo potenciales productores de metabolitos secundarios o compuestos bioactivos.

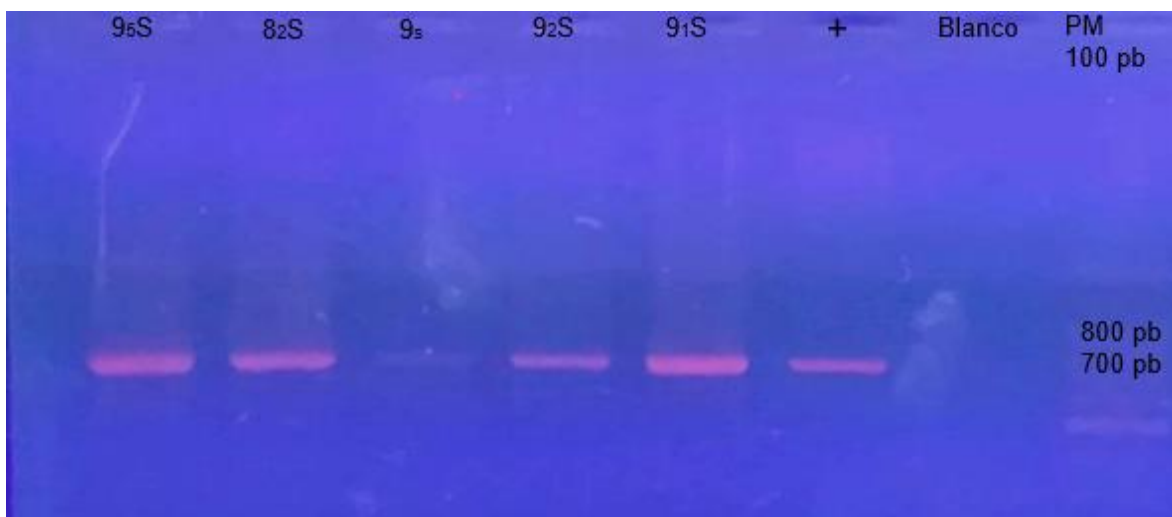


Ilustración 15. Fotografía de electroforesis en gel de agarosa realizada a las cepas de estudio para visualizar la amplificación del sistema NRPS1.

Como se observa en la ilustración, las bandas de las cepas 95S, 82S, 9S y 91S se encuentran en 700 pb utilizando como referencia las bandas del marcador de peso molecular de 100 pb, además como se puede observar, el control positivo (+) de igual forma se encuentra en 700 pb y el blanco (agua) no se observa ninguna banda.

Los resultados de amplificación de sistema PKS1 y PKS2 que presentaron las cepas de estudio se observan en la tabla 20 e ilustración 16.

| Clave de la cepa | Amplifico el sistema PKS1 | Amplifico el sistema PKS2 |
|-------------------------------|---------------------------|---------------------------|
| 9 ₅ S | - | - |
| 8 ₄ S | - | - |
| 8 ₂ S | - | - |
| 8 ₁ S | - | - |
| 9 ₂ S | - | - |
| 9 ₁ S | - | - |
| 9 _s | - | - |
| 9 ₆ S | - | - |
| 9 ₅ S _B | - | - |
| Av4e3D | - | - |
| Av4eBa | - | - |

Tabla 19. Resultados obtenidos de la amplificación del sistema PKS-I y PKS-II realizado a las cepas de estudio. (+) si amplifico el sistema, (-) no amplifico el sistema.

Objetivos y metas alcanzadas

- A través del estudio que se realizó a las once cepas y comparando los resultados con lo reportado en la literatura, se puede inferir que hay ciertas similitudes con el grupo de bacterias de actinomicetos, como las características macroscópicas, pero principalmente las características microscópicas, ya que presentaron una característica representativa de los actinomicetos, que es la presencia de micelio o hifas, además de la sensibilidad que presentaban con algunos antibióticos, permitiendo unificar todas estas características para realizar un análisis fenotípico.
- Se pudo verificar el potencial biosintético de las once cepas de estudio, teniendo resultados positivos en cuanto a los sistemas biosintéticos NRPS-I, ya que varias de las cepas lo tuvieron, sin embargo, en cuanto a los sistemas biosintéticos PKS-I y PK-II no hubo resultados positivos, ya que ninguna cepa lo presentó.

Conclusiones

La aplicación de técnicas moleculares a las 11 cepas de estudio, permitió detectar el potencial biosintético que presentaron cada una, siendo el sistema biosintético NRPS-I el único que algunas de las cepas presentaron, además el uso de estas técnicas permitió hacer un análisis fenotípico debido a que se amplificó el gen 23S característico de los actinomicetos, así como el uso de técnicas macroscópicas y microscópicas como tinción de Gram, sensibilidad a antibióticos y actividad antimicrobiana que, complementaron el estudio de las actinobacterias aisladas de suelo contaminado.

Recomendaciones

Al ser cepas ambientales, es importante seguir con su conservación *ex situ* y con ello, continuar con el estudio de las cepas aisladas de tierra contaminada y aplicar otro tipo de sistemas biosintéticos como: NRPS-II y PKS-III, ya que posiblemente se detecten estos conjuntos de genes, corroborando que son cepas con potencial para producción de compuestos bioactivos o metabolitos secundarios de interés para diferentes ramas de la ciencia.

Las cepas estudiadas generalmente presentan un crecimiento rápido y son de fácil manipulación, por lo que es recomendable utilizarlas con el objetivo de estandarizar protocolos para la estandarización de técnicas en la detección de sistemas biosintéticos como los realizados en el presente trabajo.

Bibliografía

1. Agterof M, et al. Nocardiosis (2007). A case series and a mini review of clinical and microbiological features. *Neth. J. Med.*
2. Amoutzias, G. D., Chaliotis, A., & Mossialos, D. (2016). Discovery Strategies of Bioactive Compounds Synthesized by Nonribosomal Peptide Synthetases and Type-I Polyketide Synthases Derived from Marine Microbiomes. *Marine drugs.*
3. Barka, E. A., Vatsa, P., Sanchez, L., Gaveau-Vaillant, N., Jacquard, C., Meier-Kolthoff, J. P., Klenk, H. P., Clément, C., Ouhdouch, Y., & van Wezel, G. P. (2015). Taxonomy, Physiology, and Natural Products of Actinobacteria. *Microbiology and molecular biology reviews.*
4. Baltz RH. Daptomycin (2009). Mechanisms of action and resistance, and biosynthetic engineering. *Curr Opin Chem Biol.*
5. Berenice González-Nava, J., Alonso-Carmona, S., Lizeth Manzanares-Leal, G., Sandoval-Trujillo, H., & Ramírez Durán, N. (2022). Current Techniques for the Search for Natural Products in Actinobacteria. *Records of Natural Products.*
6. Beaman, B. L., & Beaman, L. (1994). *Nocardia* species: host-parasite relationships. *Clinical microbiology reviews.*
7. Church, D. L., Cerutti, L., Gürtler, A., Griener, T., Zelazny, A., & Emler, S. (2020). Performance and Application of 16S rRNA Gene Cycle Sequencing for Routine Identification of Bacteria in the Clinical Microbiology Laboratory. *Clinical microbiology reviews.*
8. Dietz A, Mathews J. (1971). Classification of *Streptomyces* spore surfaces into five groups. *Appl Microbiol.*
9. Felnagle, E. A., Jackson, E. E., Chan, Y. A., Podevels, A. M., Berti, A. D., McMahon, M. D., & Thomas, M. G. (2008). Nonribosomal peptide synthetases involved in the production of medically relevant natural products. *Molecular pharmaceutics.*
10. Fritz, S., Rajaonison, A., Chabrol, O., Raoult, D., Rolain, J. M., & Merhej, V. (2018). Full-length title: NRPPUR database search and in vitro analysis identify an NRPS-PKS biosynthetic gene cluster with a potential antibiotic effect. *BMC bioinformatics.*
11. Gao B, Gupta RS. (2012). Phylogenetic framework and molecular signatures for the main clades of the phylum Actinobacteria. *Microbiol Mol Biol Rev.*
12. Gonzalez-Franco, A. C., & Robles-Hernández, L. (2022). Antagonist activities and phylogenetic relationships of actinomycetes isolated from an *Artemisia* habitat. *Revista Argentina de Microbiología.*

13. González Nava, J.B. (2016). Reconsideración Taxonómica de actinomicetos aislados de suelos mexicanos. Tesis de maestría, Universidad Autónoma Metropolitana Xochimilco, Ciudad de México.
14. González Nava, J.B. (2021). Detección de sistemas biosintéticos implicados en la producción de metabolitos secundarios en actinobacterias de origen clínico [Tesis de Doctorado]. Universidad Autónoma del Estado de México.
15. Hasani A, Kariminik A, Issazadeh K. (2014). Streptomycetes: characteristics and their antimicrobial activities. *Int J Adv Biol Biomed Res*.
16. Iacovelli, R., Bovenberg, R. A. L., & Driessen, A. J. M. (2021). Nonribosomal peptide synthetases and their biotechnological potential in *Penicillium rubens*. *Journal of industrial microbiology & biotechnology*.
17. Khosla, C., Kapur, S., & Cane, D. E. (2009). Revisiting the modularity of modular polyketide synthases. *Current opinion in chemical biology*.
18. Lim, Y., Go, M., & Yew, W. (2016). Exploiting the Biosynthetic Potential of Type III Polyketide Synthases. *Molecules*.
19. Locci R, Sharples G. (1984). Morphology. In Goodfellow M, Mordarski M, Williams ST (ed), *The biology of Actinomycetes*. Academic Press, London, United Kingdom.
20. Nivina, A., Yuet, K. P., Hsu, J., & Khosla, C. (2019). Evolution and Diversity of Assembly-Line Polyketide Synthases. *Chemical reviews*.
21. Selim, M. S. M., Abdelhamid, S. A., & Mohamed, S. S. (2021). Secondary metabolites and biodiversity of actinomycetes. *Journal, genetic engineering & biotechnology*.
22. Sharma M, Dangi P, Choudhary M. (2014). Actinomycetes: source, identification, and their applications. *Int J Curr Microbiol App Sci*.
23. Stahl, M.T.M./ J.M.M./ K.S.B./ D.H.B./D. A. (2015). Brock. *Biología de los microorganismos* (14ª edición). Pearson HispanoAmerica Contenido.
24. van de Sande W. W. (2013). Global burden of human mycetoma: a systematic review and meta-analysis. *PLoS neglected tropical diseases*.
25. Wilson J. W. (2012). Nocardiosis: updates and clinical overview. *Mayo Clinic proceedings*.