



Benemérita Universidad Autónoma de Puebla

**CENTRO DE INVESTIGACIONES EN CIENCIAS MICROBIOLÓGICAS
POSGRADO EN MICROBIOLOGÍA**

**Identificación de genes policétido sintasas en Actinobacterias aisladas
en la Reserva de la Biosfera Tehuacán-Cuicatlán.**

**TESIS
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:**

**MAESTRO EN CIENCIAS (MICROBIOLOGÍA)
CON OPCIÓN EN BIOQUÍMICA Y GENÉTICA MICROBIANA**

**PRESENTA:
BIOL. DEYSI ALEJANDRINA CABRERA SEGURA**

**TUTOR:
DR. LUIS ERNESTO FUENTES RAMÍREZ**

PUEBLA, PUEBLA

Enero 2017



BUAP

Puebla, Pue. a 5 de enero 2017.

**A LA ACADEMIA DEL POSGRADO
EN MICROBIOLOGÍA
CICM-ICUAP
PRESENTE.**

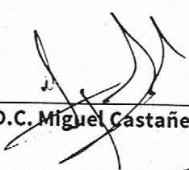
Por este conducto los abajo firmantes, integrantes del Comité revisor de Tesis de Maestría de la alumna **Deysi Alejandrina Cabrera Segura**, les informamos que hemos revisado el escrito titulado:

“Identificación de genes policétido sintasas en Actinobacterias aisladas de la Reserva de la Biosfera Tehuacán-Cuicatlán”

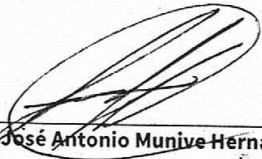
A nuestro juicio, la alumna **Deysi Alejandrina Cabrera Segura** puede proceder a la impresión de la tesis y a la presentación del examen de grado correspondiente.

Sin más que agregar, nos despedimos afectuosamente de ustedes.


Atentamente.
“Pensar Bien Para Vivir Mejor”



D.C. Miguel Castañeda Lucio



D.C. José Antonio Munive Hernández



D.C. Ricardo Carreño López



D.C. Verónica Quintero Hernández

Posgrado en Ciencias Microbiológicas
Instituto de Ciencias (ICUAP)

Edificio IC11,
Ciudad Universitaria
Col. San Manuel, Puebla, Pue. C.P. 72570
01 (222) 229 55 00 Ext. 2522
posgrado.microbiologia@correo.buap.mx

Agradecimientos

A *CONACyT* por el apoyo económico proporcionado durante la realización de este trabajo. (Becario 332273).

Al Dr. Luis Ernesto Fuentes Ramírez, director de esta Tesis, por la confianza que deposito en mí para llevar a cabo el siguiente proyecto que iniciamos y aunque encontramos algunos contratiempos logramos rescatar el proyecto, así también agradecer su paciencia, tiempo e interés a lo largo de estos años.

Al comité tutorial conformado por el Dr. Miguel Castañeda Lucio, Dr. José Antonio Munive Hernández y el Dr. Ricardo Carreño López. A todos ellos por las aportaciones, correcciones y comentarios que expusieron durante todas las sesiones tutelares que tuvimos durante el desarrollo de este proyecto de tesis.

A la Dra. María del Rocío Bustillos Cristales, por sus contribuciones y constante ayuda en el laboratorio.

A todos los integrantes del laboratorio de Ecología microbiana, por estar a la disposición de colaborar con sus conocimientos, experiencias y explicaciones sobre temas desconocidos para mí.

A todos mis compañeros de generación del posgrado por hacer más agradables los días en clases y en los laboratorios.

Índice

1. Introducción.....	9
1.1. Generalidades de Actinobacterias.....	9
1.2. Metabolismo secundario.....	12
1.2.1 Policétidos.....	15
1.2.2 Mecanismos de síntesis de las PKS.....	16
1.2.3 Clasificación de las PKS.....	19
2. Antecedentes.....	21
2.1 Policétidos en Actinobacterias.....	21
3. Justificación.....	25
4. Objetivos.....	26
4.1. Objetivo General.....	26
4.2. Objetivo Particular.....	26
5. Material y Métodos.....	27
5.1. Descripción de la zona de estudio.....	27
5.1.1. Principales comunidades de plantas en la zona.....	28
5.2. Selección de sitios de muestreo.....	29
5.3. Recolección de muestras.....	29
5.4. Aislamiento y cultivo de microorganismo.....	30
5.5. Extracción de ADN genómico.....	31
5.5.1. Cuantificación de ADN.....	32
5.6. Reacción en cadena de la ADN polimeras (PCR).....	32
5.7. Oligonucleótidos específicos del gen 16S de Actinobacteria.....	33

5.7.1. Condiciones de reacción y amplificación.....	36
5.8. Oligonucleótidos para PCR del locus policétido sintasa.....	37
5.8.1. Oligonucleótidos para el Clúster 1.....	39
5.8.1.1. Condiciones de reacción y amplificación PKSC1F/PKSC1R.....	41
5.8.2. Oligonucleótidos para el Clúster 3.....	42
5.8.2.1. Condiciones de reacción y amplificación PKSC3F/PKSC3R.....	45
5.9. Electroforesis en geles de agarosa para amplificados.....	45
6. Purificación de ADN para secuenciación.....	45
6.1. Secuenciación de productos purificados.....	46
7. Modelado de homología (SWISS-MODEL).....	46
8. Resultados y Discusión.....	47
8.1. Recolección de muestras.....	47
8.2. Aislamientos y cultivo de microorganismos.....	47
8.3. Extracción de ADN genómico de los actinomicetos aislados.....	47
8.4. Amplificación por PCR del gen 16S de Actinobacterias.....	47
8.5. Amplificación por PCR del locus policétido sintasa en actinobacterias.....	50
8.6. Secuenciación del 16S rADN del aislado 250 de Actinobacterias.....	54
8.7. Secuenciación del dominio KS del aislado 250 de actinobacterias.....	55
8.8. Informe del modelado de homología (SWISS-MODEL).....	58
9. Conclusiones.....	61
10. Perspectivas.	63
11. Anexos.....	64
12. Bibliografía.....	64

Índice de figuras

Figura 1. Árbol filogenético de las actinobacterias basado en el gen 16S.....10 ARNr (Lu & Zhang, 2012.)	10
Figura 2. Diferentes tipos de los módulos de policétidos sintasas (PKSs).....16	16
Figura 3. Ruta básica de biosíntesis de ácidos grasos y policétidos.....18 (A, B, C, D corresponden a diferentes grados de reducción que sufre la cadena policetónica).	18
Figura 4. Policétido sintasa tipo I.....19	19
Figura 5. Policétido sintasa tipo II.....20	20
Figura 6. Policétido sintasa tipo III.....20	20
Figura 7. Localización del área de estudio.....27	27
Figura 8. Alineamiento de secuencia del gen 16S Actinobacteria.....33	33
Figura 9. Estructura de la región que amplifica el oligonucleótido delantero (A)..... 34 y trasero (B) del 16S ribosomal en actinobacterias.	34
Figura 10. Estructura de la región que amplifica el oligonucleótido.....35 delantero (Rojo) y trasero (Azul) localizada en el 16S ribosomal en <i>E.coli</i> .	35
Figura 11. Alineamientos de secuencias del gen policétido sintasa.....37 en actinobacterias, mostrando solo la región con más similitud en nucleótidos.	37
Figura 12. Árbol filogenético de secuencias completas del gen policétido.....38 sintasa en actinobacterias.	38
Figura 13. Dominios presentados en secuencias completas del gen policétido..... 39 sintasa en géneros <i>Mycobacterium</i> reportadas en el Genbank.	39
Figura 14. Región de alineamiento de oligonucleótido PKSC1F/PKSC1R..... 40	40
Figura 15. Posiciones de los primer PKSC1F/PKSC1R en secuencias.....40 del dominio DH.	40
Figura 16. Estructura secundaria que presentó la región que es.....45 amplificada los oligonucleótidos PKSC1F/PKSC1R.	45
Figura 17. Dominios presentados en secuencias completas del gen.....46 policétido sintasa en géneros <i>Mycobacterium</i> reportadas en el Genbank.	46

Figura 18. Región de alineamiento de oligonucleótido PKSC3F/PKSC3R.....	43
Figura 19. Posiciones de los primer PKSC3F/PKSC3R del dominio KS..... y motivo VDTACSSSLVA conservado en secuencias de actinobacterias.	48
Figura 20. Estructura secundaria que presentó la región que amplifican los..... oligonucleótidos PKSC3F/PKSC3R.	48
Figura 21. Gel de agarosa 1.5% con los productos de la amplificación..... del gen 16S ADN. Carriles, M: Marcador de peso 1Kb; 1: Cepa control (<i>Geodermatophilus</i>); 2: cepa 56; 3: Cepa 43; 4: cepa 51; 5: Cepa 1; 6: Cepa 52; 7: Cepa 36; 8: Cepa 37; 9: Cepa 94; 10: Cepa 2; 11: Cepa 3; 12: Cepa 4; 13: Cepa 5.	49
Figura 22. Gel de agarosa 1.5% con los productos de la amplificación..... con PKSC3F/PKSC3R de 739pb (dominio beta-cetoacil sintasa). A) M: Marcador de peso molecular 1Kb; 1: Cepa 270; 2: Cepa 265; 3: Cepa 295; 4: Cepa 240; 5: Cepa 242; 6: 250; 7: Cepa 246. B) M: Marcador de peso molecular 1Kb; 1: Cepa 250; 2: Cepa 250; 3: Cepa 282.	51
Figura 23. Secuencia nucleotídica del aislado 250	74
Figura 24. Secuencia nucleotídica del dominio KS del aislado 250.....	74
Figura 25. Secuencia traducida a aminoácidos del amplificado 250.....	74
Figura 26. Alineamiento y equivalencia de aminoácidos de la secuencia..... del aislado 250 y el poliquetidos sintasa tipo I [<i>Streptomyces sp.</i> / WP_070202984.1].	58
Figura 27. Modelo de organización de la 6-desoxieritronolida B sintasa..... (Zheng <i>et al.</i> , 2015).	60
Figura 28. Biosíntesis de la Eritromicina.....	60

Índice de tablas

Tabla 1. Clasificación de los metabolitos secundarios según su estructura.....15 química.	
Tabla 2. Secuencia de los oligonucleótidos para Actinobacteria.....34	
Tabla 3. Secuencia de los oligonucleótidos para el Clúster 1.....41	
Tabla 4. Secuencia de los oligonucleótidos para el Clúster 3.....44	
Tabla 5. Resultados del análisis BLASTN de la secuencia de la cepa 250.....55	
Tabla 6. Resultados del análisis BLASTN de la secuencia del aislado 250.....68	
Tabla 7. Resultados del análisis BLASTP de la secuencia de la cepa 250.....70	
Tabla 8. Descripción de Modelos de homología (SWISS-MODEL).....73	

RESUMEN

Las actinobacterias son las principales bacterias productoras de metabolitos secundarios con diversas actividades biológicas tales como: antibióticos, pigmentos antiinflamatorios, anti-tumorales, antagonistas, inhibidores enzimáticos, pesticidas y promotores del crecimiento. Los policétidos (metabolitos secundarios) se han reportado mayormente en actinobacterias por lo que estas son consideradas una fuente factible para la búsqueda y obtención de nuevos policétidos que exhiban alguna bioactividad para aplicación biotecnológica e industrial.

El objetivo de este trabajo, fue rastrear el gen policétido sintasa en los aislamientos de actinobacterias cultivables de la reserva de la Biosfera Tehuacán-Cuicatlán. Como resultado de esta investigación, se obtuvieron 70 actinobacterias, en ninguna se amplificó el producto esperado con los oligonucleótidos PKSC1F/PKSC1R diseñados para el dominio Deshidratasa (DH) y que había mostrado ser conservado en los alineamientos de las secuencias de actinobacterias analizados previamente. Mientras que con los oligonucleótidos PKSC3F/PKSC3R diseñados para el dominio Beta-cetoacil-sintasa (KS) se logró amplificar un producto del tamaño esperado en el aislado 250 que se ubicó en el género *Streptomyces*. La secuencia nucleotídica del fragmento amplificado con los oligonucleótidos PKSC3F/PKSC3R mostró alta identidad del 100% con una beta-cetoacil-sintasa. La secuencia de aminoácidos mostró una identidad del 48% con una policétido sintasa tipo I de *Streptomyces* spp. Esta misma secuencia mostro mayor identidad de residuos de aminoácidos con una 6-Desoxieritronolida B sintasa, un policétido sintasa tipo I responsable de la síntesis del anillo macrólido, que es precursor del antibiótico Eritromicina.

Por lo tanto el uso de oligonucleótidos degenerados diseñados a partir de alineamientos de nucleótidos para regiones conservadas como el dominio DH y KS en las secuencias de actinobacterias analizadas fue limitante, debido a que existe una gran diversidad genética en los policétidos sintasa.

Identificación de genes policétido sintasas en Actinobacterias aisladas de la Reserva de la Biosfera Tehuacán-Cuicatlán.

1. Introducción

1.1 Generalidades de Actinobacterias

Las actinobacterias son bacterias Gram-positivos, aeróbicos, presentan una amplia variedad de morfologías que incluyen cocoides, rodo-cocoides que posteriormente se fragmentan en forma de hifas, pueden ser filamentosos, con apariencia micelial pero sin formar micelio aéreo, o no-filamentosos en donde prevalecen colonias de color blanco o gris. Algunas especies desarrollan colonias con pigmentos (rojizos, rosáceos, o amarillentos) (Li & Stackebrandt, 1997).

En la actualidad, estos microorganismos son reconocidos como procariontes, pertenecientes al orden *Actinomycetales*, dentro de la clase *Actinobacteria* del Phylum *Actinobacteria*. Este último exhibe una de las unidades taxonómicas con más representantes, comprendiendo aproximadamente 15 órdenes, 43 familias y 219 géneros (Fig. 1) (Goodfellow & Williams, 1983; Lechevalier, 1989; Ventura *et al.*, 2007). Son heterótrofos que pueden utilizar diversas fuentes de carbono y nitrógeno que incluyen ácidos orgánicos, aminoácidos, azúcares, peptonas, polisacáridos, lípidos, fenoles, nitratos, amonio, quitina, proteínas, etc. (Franco, 2009).

Por lo general son organismos mesofílicos en cuanto a temperatura óptima, pero tolerantes a un rango amplio de las mismas. Son poco tolerantes a la acidez desarrollándose de forma óptima en un pH cercano a la neutralidad entre 5.0 y 9.0 (El-Tarabily *et al.*, 2008).



Fig. 1. Árbol filogenético de las actinobacterias basado en el gen 16S ARNr (Lu & Zhang, 2012.)

Habitualmente estas bacterias tienen un contenido en Guanina-Citosina (G+C) igual o mayor a 55% (Doroghazi *et al.*, 2013), aunque recientemente se han detectado cepas con bajo contenido de G+C (33%) asociadas a hábitats marinos y de vida libre como '*Candidatus actinomariniidae*' (Ghai *et al.*, 2013).

Las actinobacterias tienen una amplia distribución en ambientes con condiciones extremas de temperaturas, salinidad, alcalinidad, acidez y radioactividad, (Gtari *et al.*, 2012). Son cosmopolitas logrando habitar tanto ambientes acuáticos como terrestres, del mismo modo se pueden encontrar en superficies rocosas, suelo rizosférico y algunas familias pueden ser patógenas de plantas, animales y humanos (Franco *et al.*, 2009).

Estos microorganismos tienen como hábitat natural el suelo y se desarrollan de manera idónea en suelos con condiciones semiáridas con abastecimiento de oxígeno (El-Tarabily & Sivasithamparam, 2006; Mariano, 2009). Existen géneros que forman esporas, las cuales les confieren la capacidad de sobrevivir por largos periodos de tiempo a condiciones adversas como ambientes con poca disponibilidad de nutrientes y agua y exposición abundante a radiación solar. Asimismo estas estructuras les facilitan la colonización de nuevas áreas al poder dispersarse por el viento y agua (Chater & Chandra, 2006).

Las actinobacterias tienen la capacidad de generar enzimas biodegradativas como quitinasas y glucanasas. Las que están implicadas en degradar materia orgánica contribuyendo de manera significativa en la estabilidad ambiental (Tokala *et al.*, 2002). Entre las actinobacterias se conocen organismos productores de pigmentos, de sideróforos, de sustancias promotoras del crecimiento vegetal, fijadores nitrógeno, nodulantes de plantas, etc. (Franco, 2009). Aproximadamente, la mitad de los compuestos naturales con actividades biológicas (antibacterianos, antifúngicos, antioxidantes, anti-inflamatorios, antiparasitarios) se obtienen de géneros de actinobacterias, por ello son una fuente rica y conocida de moléculas bioactivas como alcaloides, péptidos, terpenos y policétidos las que podrían innovar en el ámbito médico e industrial (Li *et al.*, 2014).

1.2 Metabolismo secundario

Los metabolitos secundarios (MS) son compuestos orgánicos complejos y con gran diversidad en estructuras químicas. Este tipo de moléculas son producidas por diversos organismos tales como: plantas, hongos y bacterias (Barrios *et al.*, 2003).

En general los MS son excretados al medio externo, este hecho se puede relacionar tanto con la eliminación de material tóxico, como con una función ecológica propia de estas moléculas, o con ambos a la vez (Sánchez & Olivares, 2013).

Es importante destacar que los metabolitos secundarios, no son esenciales para la reproducción y supervivencia de los microorganismos que los producen. No obstante que no se ha determinado fehacientemente la función de muchos de estos compuestos, muy probablemente les confieren una ventaja selectiva a los organismos que los sintetizan, facilitando adaptación a situaciones de estrés (físico, químico o biológico) o como una estrategia para mantener el funcionamiento de los sistemas metabólicos en condiciones adversas, es decir, cuando las células deben persistir durante largos periodos sin división, manteniendo un estado fisiológico de baja actividad metabólica (Aminov, 2009; Challis & Hopwood, 2003).

Algunas bacterias producen metabolitos secundarios para comunicarse e interactuar con su entorno, principalmente toxinas que posiblemente usan contra otros microorganismos que compiten por los mismos recursos. En ciertas concentraciones estas moléculas pueden repeler depredadores, atraer a polinizadores o matar patógenos (Fogli, 2014).

Además pueden actuar como agentes de simbiosis entre los microbios y plantas o bien como agentes de transporte de metales (Demian & Fang, 2000). Se ha reportado que algunos metabolitos secundarios estimulan la formación de esporas y reducen la velocidad de germinación hasta que se presenta un entorno menos competitivo y mejores condiciones para el crecimiento (Demian & Fang, 2000).

Un punto importante sobre la biosíntesis de metabolitos secundarios es que no favorece (contribuye) a la economía energética ni a la simplicidad del metabolismo primario. La regulación de sus rutas biosintéticas está sometida a un control general que responde a factores ambientales. Asimismo los genes implicados en la síntesis de los MS se encuentran agrupados junto a genes reguladores, lo que sugiere que es un sistema altamente evolucionado que representa un beneficio propio para los microorganismos productores (Parés & Juárez, 1997).

Se ha considerado que una función global del metabolismo secundario es drenar los metabolitos primarios para evitar la acumulación en condiciones de desequilibrio metabólico. Para ello se tendría que transformar los intermediarios en metabolitos secundarios, en lugar de excretarlos directamente al medio. De esta forma se activarían una serie de vías metabólicas que permitirían a las vías primarias seguir manteniendo un nivel de actividad (suministrando energía y precursores) lo que posibilitaría el restablecimiento del crecimiento normal al presentarse condiciones adecuadas (Woodruff, 1966; Sánchez & Olivares, 2013). Sin embargo aún existe gran controversia sobre la relevancia de los metabolitos secundarios en los microorganismos.

A continuación se mencionan algunas características principales de los MS (Martín & Liras, 1989; Vining, 1992; Madigan, 2006):

- a) Se producen por rutas anabólicas especializadas a partir de metabolitos primarios o intermediarios de los mismos.
- b) Se sintetizan por células metabólicamente activas cuando no hay crecimiento (fase estacionaria).
- c) Su producción depende de las condiciones y composición del medio.
- d) Son indicativos de diferenciación morfológica.
- e) Son específicos para cada especie, y a veces, de cada cepa.
- f) Poseen variabilidad en estructuras químicas y actividades biológicas.
- g) Su producción es controlada como respuesta a factores ambientales.
- h) Los genes implicados en la biosíntesis de MS se agrupan en el genoma en forma de *clusters* (agrupación de genes), asociados a genes reguladores de su expresión.

Los metabolitos secundarios adquieren un gran interés biotecnológico, farmacéutico e industrial, debido a sus múltiples actividades biológicas tales como: antibióticos, anti-inflamatorios, anti-tumorales, pigmentos, toxinas, antagonistas, inhibidores enzimáticos, bioreguladores, pesticidas, promotores del crecimiento de plantas, *quorum sensing*, entre otros (Barrios *et al.*, 2003).

Con base en su estructura química, los metabolitos secundarios se clasifican en peptídicos, aminoglucósidos, nucleosídicos y policétidos (Tabla 1). Sin embargo algunos compuestos como el cloranfenicol y la fosfomicina, entre otros, por su estructura no se pueden incluir dentro de los grupos antes mencionados (Ahmad *et al.*, 2013).

Metabolito	Características	Actividad
Peptídico	Compuestos formados por cadenas de aminoácidos sintetizadas en su mayoría mediante péptido sintetasas independientes de ribosomas.	Antibióticos β -lactámicos (Penicilinas, Cefamicinas, Cefalosporinas)
Aminoglucósidos	Son aminoazúcares unidos a un residuo aminociclitol.	Kanamicina, Gentamicina, Estreptomicina.
Nucleosídicos	Son compuestos que por su estructura química actúan como análogos de los nucleosidos que componen a los ácidos nucleicos	Antiretroviral, Puromicina
Policétidos	Son compuestos con una gran diversidad estructural y que son sintetizados por las enzimas policétido sintetasas	Actinorrudina, Nistatina, Anfotericina, Pimaricina.

Tabla 1. Clasificación de los metabolitos secundarios según su estructura química.

1.2.1 Policétidos

Los policétidos son metabolitos secundarios producidos principalmente por actinomicetos, no obstante también se pueden encontrar en plantas y hongos. Estos compuestos tienen una gran diversidad estructural que les confiere numerosas actividades biológicas y propiedades farmacológicas, tales como: antibióticos, antifúngicos, inmunosupresores, antioxidante, insecticidas naturales y promotores del crecimiento animal (Nair *et al.*, 2012).

Los policétidos son sintetizados a partir de precursores acil-CoA mediante las enzimas multifuncionales policétido sintasas (PKSs), que forman cadenas carbonadas mediante la adición continua de unidades de ácidos carboxílicos. Esta familia de proteínas multifuncionales utiliza como sustrato a la acil-coenzima A y tiene una actividad similar a la de las sintasas de ácidos grasos de cadena larga (FASs).

Las PKSs, tienen una organización modular y cada módulo está formado por una sucesión de distintos dominios. Algunos dominios son esenciales para la actividad básica de la enzima, como los dominios cetosintasa (KS), aciltransferasa (AT) y el de proteína portadora de acilo (ACP). Además presentan un dominio adicional tioesterasa (TE) en el último módulo de elongación, el que permite la liberación de la molécula que se está sintetizando. Frecuentemente pueden exhibir dominios auxiliares con actividades cetorreductasa (KR), deshidratasa (DH) y enoil-rreductasa (ER), que aparecen en ciertas ocasiones en función del tipo de modificaciones adicionales que requiera la síntesis de un compuesto dado (Fig. 2) (Kodama *et al.*, 2005; Kaluzhnaya *et al.*, 2012).

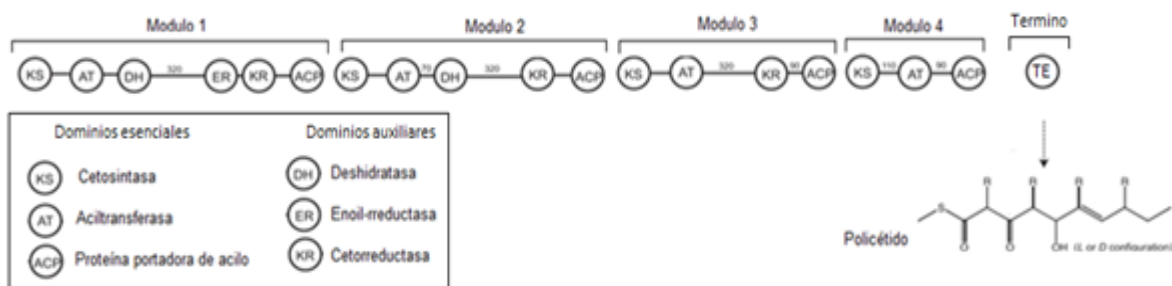


Fig. 2. Diferentes tipos de los módulos de policétidos sintasas (PKSs).

1.2.2 Mecanismos de síntesis de las PKSs

La biosíntesis de estos compuestos inicia, a partir de una unidad iniciadora (acetil, propionil o butiril) y por la incorporación sucesiva de unidades de elongación (malonil, metilmalonil o etilmalonil) que son activadas al unirse a la coenzima A (CoA), formando los correspondientes tioésteres-CoA.

La unidad iniciadora (acetato) es transferida por la acción de una AT desde el CoA al grupo tiol del brazo de 4'-fosfopantoteína del dominio ACP para su posterior condensación. Por otra parte, la unidad elongadora (malonil), que tras activarse en forma malonil-CoA, es transferida desde el CoA al grupo tiol del brazo de 4'-fosfopantoteína de la proteína transportadora de grupos acilo (ACP) mediante la misma AT que transfiere la unidad iniciadora.

A continuación, tiene lugar la condensación entre ambas moléculas por el dominio KS, condensación que se produce con la consecuente pérdida de un carbono por decarboxilación de la unidad elongadora. El resultado es la formación de un residuo policetónico de cuatro carbonos unido al brazo de 4'-fosfopantoteína del dominio ACP, que sufrirá reacciones de β -cetoreducción, deshidratación y enoilreducción. Mediante sucesivas condensaciones de unidades de elongación llega a constituirse la cadena policetónica (Fig. 3).

Aunque el mecanismo biosintético de los ácidos grasos de cadena larga y los policétidos es similar, existen algunas diferencias (Katz & Donadio, 1993). En el caso de la biosíntesis de ácidos grasos, tras una reacción de condensación tiene lugar una reducción, posteriormente una rehidratación y por último una reducción. Al terminar este ciclo de reacciones se produce una nueva condensación. En cambio en la biosíntesis de policétidos los ciclos no siguen el mismo patrón para todos. Así pueden ocurrir casos como:

- a) Condensación- reducción- deshidratación-reducción
- b) Condensación-reducción- deshidratación
- c) Condensación-reducción
- d) Condensación-condensación

Una vez formada la cadena policetónica tienen lugar reacciones posteriores, como la adición de moléculas de azúcares y metilaciones que pueden dar lugar a un compuesto con actividad antibiótica.

En la síntesis de ácidos grasos, la unidad iniciadora siempre es acetil-coA y la unidad elongadora es malonil-coA. En el caso de los policétidos, las unidades iniciadoras pueden ser acetil-coA, propionil-coA, butiril-coA, y las unidades elongadoras pueden ser malonil-coA para los policétidos aromáticos, metilmalonil-coA y etilmalonil-coA para policétidos poliéteres y macrólidos, originándose cadenas laterales metilo o etilo en la estructura del policétido (Baerson & Rimando, 2007).

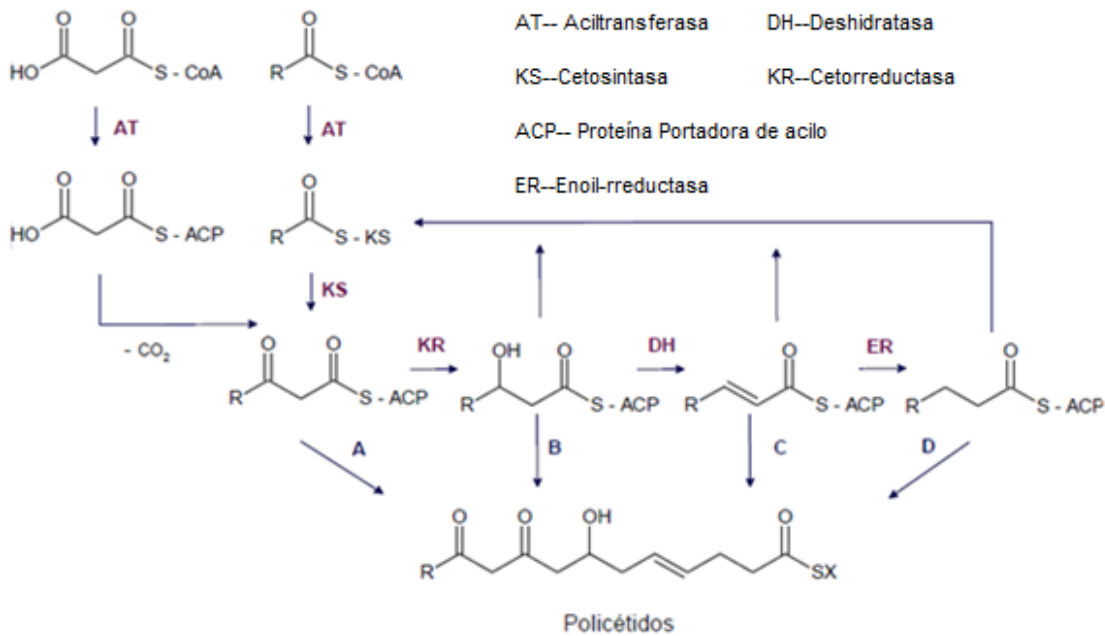


Fig. 3. Ruta básica de biosíntesis de ácidos grasos y policétidos (A, B, C, D corresponden a diferentes grados de reducción que sufre la cadena policetónica)

Otra característica distintiva de los policétidos, es la presencia de un carbono-β que reduce el grupo ceto a hidroxilos o los elimina por descarboxilación. El procesamiento de cada grupo ceto incorporado no es constante, dando lugar a la formación de grupos ceto, hidroxilo, enoilo o enlaces C-C totalmente reducidos (Hopwood, 2004). Además, una vez sintetizada la cadena policetónica, ésta sufre procesos de plegamiento y ciclación, que entre otras modificaciones post-PKS confiere la gran diversidad estructural de los policétidos.

✓ PKS Tipo II

Son complejos de varias enzimas mono o bifuncionales que actúan de manera interactiva, cada dominio catalítico se encuentra en una proteína separada, por lo general se encuentran codificadas por pocos miles de nucleótidos en el genoma y están involucrados en la síntesis de antibióticos aromáticos.



Fig.5. Policétido sintasa tipo II.

✓ PKS Tipo III

Son enzimas homodiméricas responsables de la diversidad de los flavonoides. Cabe destacar que mientras las PKS tipo I y II utilizan proteínas portadoras de acilo (ACP) para activar los sustratos acil CoA, las PKS III son independientes de ACP y actúan de manera directa sobre acil CoA (Shen, 2003). Este tipo engloba la superfamilia de las chalcona sintasas (CHSs) y se encuentran principalmente en plantas.

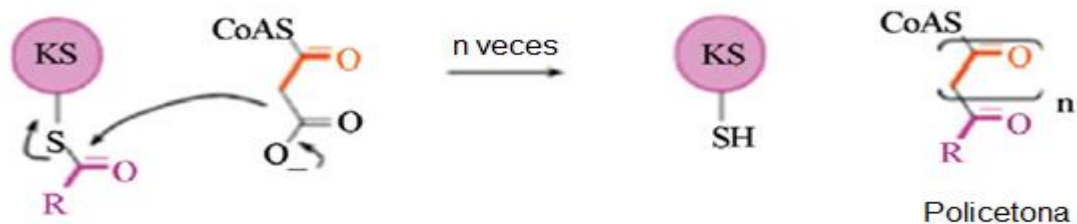


Fig.6. Policétido sintasa tipo III.

2. Antecedentes

2.1 Policétidos en Actinobacterias

Gran parte de los policétidos son producidos por microorganismos pertenecientes al phylum Actinobacteria. De éstos, el género *Streptomyces* es reconocido por ser el más grande productor de policétidos con actividad antibiótica tales como kanamicina, neomicina, gentamicina, clorofenicol, etc. (Watve *et al.*, 2001).

Se ha reportado que los policétidos sintasa tipo I o modulares son predominantes en actinobacterias, *Pseudomonas* y Cianobacterias (Bode & Muller, 2005). Un estudio ha reportado oligonucleótidos para amplificar dominios KS conservados en bacterias obteniendo con ellos 23 fragmentos de KS que mostraron una identidad de secuencia de aminoácidos que va del 45 al 85% con dominios KS relacionados con proteobacterias, actinobacterias y cianobacterias reportados en la base de datos del Genbank (Song *et al.*, 2013).

Uno de los primeros trabajos con oligonucleótidos degenerados para la búsqueda de PKS tipo I en actinobacterias fue descrito por Ayuso & Genilloud, 2004. El diseño se basó en la alineación de secuencias de ADN de once módulos biosintéticos del género *Streptomyces*. Se encontraron 106 dominios KS que mostraron una región conservada con suficiente homología de secuencia para el diseño de los oligonucleótidos degenerados K1 (Delantero) y M6R (reverso) se localizó cerca de los sitios activos del dominio AT presente en cada uno de los módulos analizados. Probando los oligonucleótidos K1F/M6R en una colección de 210 cepas de referencia con 33 géneros diferentes de actinobacterias, se detectó la presencia PKS-I solo en el 50% de las cepas analizadas. Posteriormente se diseñó un oligonucleótido reverso degenerado K2R que amplifica específicamente un fragmento corto del dominio KS, probando en 329 aislados de actinobacterias, el oligonucleótidos K1F/K2R se detectó en el 48% de los aislados que principalmente pertenecían al género *Streptomyces* (Ayuso *et al.*, 2005)

Estudios filogenéticos de las PKS han demostrado que el dominio KS es altamente conservado, la secuencia del motivo conservado es VDTACSSSLVA. Mientras el sitio activo de KS consiste en dos histidinas y una cisteína (a la que el grupo acilo está unido covalentemente), esta última puede ser remplazada por histidina o glutamina en algunos casos (Peng *et al.*, 2009; Kodama *et al.*, 2005; Kroken *et al.*, 2003; Ginolhac *et al.*, 2004; Lohmana *et al.*, 2015). Los otros dominios de cada módulo del policétido sintasa tipo I, tuvieron motivos representativos pero no son altamente conservados. El dominio AT exhibió los motivos GxSxG y AFHS relacionados con malonil-CoA, el dominio ACP exhibió el motivo GxDS y el sitio activo serina, el dominio DH exhibió el motivo HxxxGxxxxP y el sitio activo histidina, el dominio ER exhibió el motivo LxHxxxGGVG, el dominio KR exhibió los motivos GxGxxGxxxA y KxSxY, y el dominio TE exhibió los motivos GxSxG y PGDH con sitio activo en la serina (Migita *et al.*, 2009; Shao *et al.*, 2012; Kakavas *et al.*, 1997; Alt & Wilkinson, 2015).

Actinobacterias del género *Streptomyces* y *Salinispora* exhibieron una identidad del 55 al 99% en nucleótidos con el dominio cetosintasa (KS) asociado a genes policétido sintasa aisladas del golfo de california, los bajos niveles de identidad se pudieron asociar con la producción de nuevos metabolitos secundarios (Becerril *et al.*, 2013). Se han descubierto las nuevas familias de actinobacterias Corynebacteriaceae, Gordoniaceae, Intrasporangiaceae, y Micrococáceae en sedimentos marinos y que son productoras de metabolitos secundarios. Esos organismos presentan secuencias cetosintasa homologas a las PKS modulares, además 14 cepas presentan entre un 80-84% de identidad asociada a PKS responsable de síntesis de rifamicina (Gontang *et al.*, 2010).

Se detectó el dominio KS en dos cepas de *Streptomyces sp.*, comparando las secuencias en el Genbank se mostró que solo una secuencia presento homología con PKS conocidos y la otra no mostro homología, lo que sugirió que podrían generar nuevos compuestos con gran potencial para usos biotecnológicos (Savic & Vasiljevic, 2006).

En la actualidad, se han encontrado secuencias para genes biosintéticos policétido sintasa tipo I y II con bioactividad contra agentes patógenos en *Streptomyces* aislados de sedimentos marinos, así como asociados a esponjas marinas y corales de mar de distintas regiones (China, Malasia, Arabia Saudita, etc). De la misma forma se han identificado secuencias homólogas al dominio KS en actinobacterias aisladas de esponja marina en el Océano Atlántico Sur (Trindade *et al.*, 2012).

Asimismo se aisló una nueva especie en el desierto de Atacama, *Streptomyces leeuwenhoekii*, que produjo Cefamicinas y nuevos policétidos macrólidos como ansamicina con actividad antimicrobiana potente y moderadamente antiproliferativa (Li *et al.*, 2014; Abdelmohsen *et al.*, 2014; Braña *et al.*, 2015; Castro *et al.*, 2015). En otro estudio, de 54 cepas de *Streptomyces* de suelo, el 67% de los aislados fueron bioactivos y un 50% exhibieron actividad antibacteriana y antifúngica de amplio espectro. Las cepas con mayor actividad mostraron colonias con pigmentaciones grises y amarillas. En este estudio se amplificó, en nueve cepas, la región conservada KS que codificó para policétidos aromáticos, sugiriendo la capacidad de producción de estos compuestos (Bundale *et al.*, 2014). En otro estudio se detectó la presencia de tres genes biosintéticos para la producción de policétidos. De los 20 aislamientos provenientes del desierto de Arabia Saudita, en 15% se logró amplificar PKS-I y en 50% PKS-II y NRPS (Shinwari *et al.*, 2013).

Asimismo, estudios realizados por Kuadri *et al.*, 2014, revelaron que 81% de las especies de *Streptomyces* presentaron genes PKS-I en 63% y PKS-II en 65%, pero no se detectó actividad antimicrobiana bajo las condiciones probadas.

En nuevas especies del género *Streptomyces* se ha demostrado la presencia de genes PKS-I (19.5%), PKS-II (42.5%) y NRPS (5.7%) (Lee *et al.*, 2014). Así mismo, en actinobacterias de los géneros *Micromonospora* y *Streptomyces* se presentaron secuencias con alta similaridad al dominio KS del gen policétido sintasa implicado en la biosíntesis de meridamycin (Qing *et al.*, 2009).

Los genes PKS-I, PKS-II y NRPS implicados en la biosíntesis de policétidos sintasa también se han reportado en los géneros *Saccharomonospora*, *Actinopolyspora*, *Prauserella*, *Nocardiopsis*, *Micrococcus*, *Saccharopolyspora*, *Streptomonospora* y *Actinoalloteichus* (Cruz *et al.*, 2015; Schneemann *et al.*, 2010; Saker *et al.*, 2015). En un estudio con 80 cepas de actinobacterias, de 66 pertenecientes al género *Streptomyces* el 15 % mostraron actividad antimicrobiana. En las 80 cepas se detectaron genes PKS-I (55%), PKS-II (59%), NRPS (90%), ANSA (19%) y (9%) relacionados con metabolitos secundarios (Qui *et al.*, 2015).

Estos hallazgos proporcionan evidencia de que las Actinobacterias en particular del género *Streptomyces* aisladas de ambientes poco explorados y extremos poseen policétidos sintasas no identificadas y con potencial para el descubrimiento de productos biológicamente activos, posiblemente útiles para usos biotecnológicos, farmacéuticos e industriales.

3.- Justificación

Actualmente, el estudio de metabolitos secundarios reciben una considerable atención gracias a sus diversas actividades biológicas tales como; antibióticos, anti-inflamatorios, anti-tumorales, antagonistas, inhibidores enzimáticos, pigmentos, pesticidas y promotores del crecimiento entre otros (Adegboye *et al.*, 2013; Barrios *et al.*, 2003). Se conoce que alrededor de cuatro mil metabolitos con actividad son producidos por diferentes géneros y especies del phylum Actinobacteria.

Los policétidos son metabolitos secundarios, sintetizados principalmente por actinobacterias, que poseen una gran diversidad estructural que les confieren numerosas propiedades biológicas. Por ello las actinobacterias son consideradas una fuente factible para la búsqueda y obtención de nuevos policétidos que exhiban alguna bioactividad para la aplicación farmacéutica, biotecnológica o industrial.

En este trabajo, se rastrea el gen policétido sintasa en los aislamientos de Actinobacterias cultivables de la reserva de la Biosfera Tehuacán-Cuicatlán.

4.- Objetivos

4.1 Objetivo General

Detectar la presencia del gen policétido sintasa en actinobacterias aisladas de la Reserva de la Biosfera Tehuacán-Cuicatlán.

4.2 Objetivo Particular

Aislar e identificar actinobacterias cultivables presentes en la Reserva de la Biosfera Tehuacán-Cuicatlán.

Determinar la presencia del gen policétido sintasa en las actinobacterias aisladas de la Reserva de la Biosfera Tehuacán-Cuicatlán.

5.- Material y Métodos

5.1 Descripción de la zona de estudio

La Reserva de la Biósfera Tehuacán-Cuicatlán, con una extensión de 4,901.86 km², se localiza al sureste del estado de Puebla y al noroeste del estado de Oaxaca, entre los 17°20'-18°53' de latitud norte y los 96°55'-97°44' de latitud Oeste (Zavala & Hernández, 1998). Debido a su gran diversidad de plantas y un endemismo del 30% (Dávila *et al.*, 2002) fue declarada Reserva de la Biósfera (SEMARNAT, 1998).

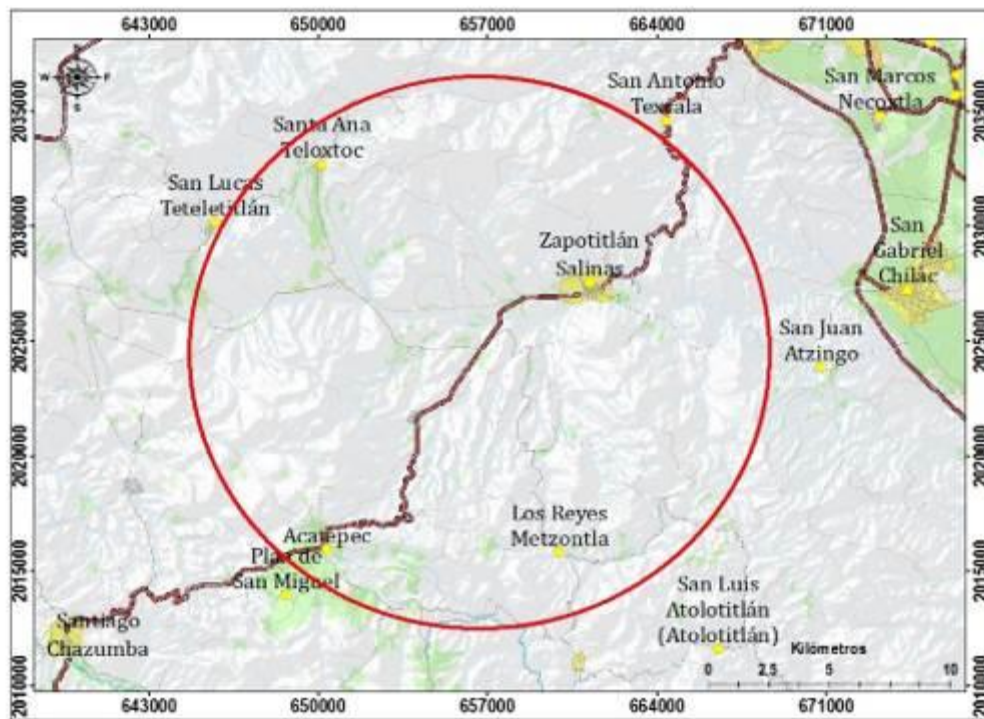


Fig. 7. Localización del área de estudio

Su clima es cálido y semiárido, con precipitación anual promedio de 400-600 mm con seis meses de lluvia en verano (Mayo-Octubre) y una temperatura media de 21°C (García, 1981; Zavala & Hernández, 1998). La mayor parte del suelo no es agrícola (López *et al.*, 2003). El suelo tiene una profundidad promedio de 20 cm, presenta una textura franca, con una capa oscura de materia orgánica en un 3.1 % y un pH alcalinode de 8.1 (García, 1991).

5.1.1 Principales comunidades de plantas en la zona

- ✓ Matorral xerófilo (Rzedowski, 1978), en donde dominan arbustos de leguminosas.
- ✓ Las tetecheras de escasas ramas, como *Neobuxbaumia tetetzo* (Weber) Backeberg, o los cardonales de *Cephalocereus columna-trajani* Weber y de *Stenocereus stellatus* (Pfeiffer) Ricobbono. Ambas son agrupaciones de plantas crasas altas (5 a 10 m), de las llamadas “candelabros” y “órganos” (Miranda & Hernández, 1963).
- ✓ Izotales de *Yucca periculosa* Baker o de *Beaucarnea gracilis* Lem, que se desarrollan en suelos rocosos calizos (Miranda & Hernández, 1963).
- ✓ Selva baja espinosa perennifolia, que se encuentra en terrenos planos de zonas semi secas, con selva baja caducifolia donde predomina *Prosopis laevigata*, y especies de las tres subfamilias de Leguminosae: Caesalpinioideae, Papilionoideae y Mimosoideae (Zavala, 1982; Villaseñor *et al.*, 1990; Osorio *et al.*, 1996).

5.2 Selección de sitios de muestreo

Se realizó un muestreo dirigido, eligiendo zonas ubicadas dentro de poblaciones de cactáceas del género *Neobuxbaumia*, en donde se efectuaron dos muestreos el 11 de septiembre 2014 y el 30 enero 2016. Después de delimitar las regiones a muestrear, se registró la fecha del muestreo, la ubicación geográfica de cada sitio con ayuda de un geoposicionador satelital (GPS) y el tipo de población muestreada (Anexo A).

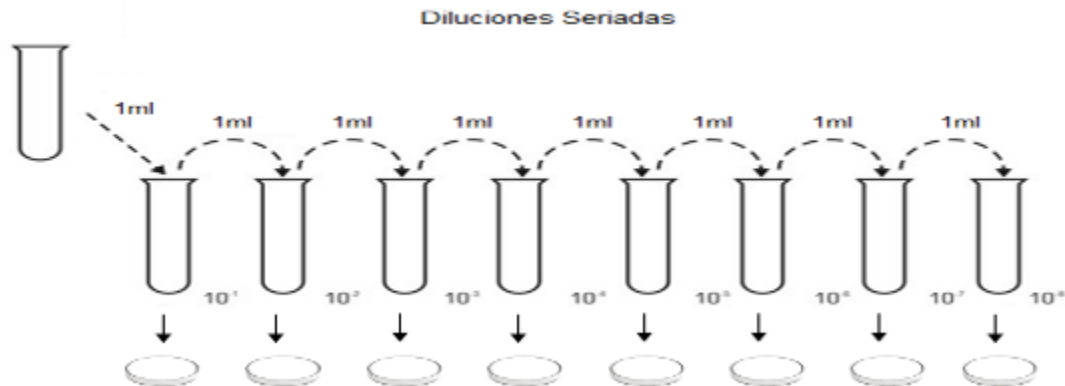
5.3 Recolección de Muestras

Las muestras que se colectaron en las zonas de poblaciones de *Neobuxbaumia*, fueron de suelo sin cobertura vegetal, rizósfera, superficie de la cactácea, barniz de la roca y cubiertas biológicas. La toma de las muestras se llevó acabo de la siguiente manera:

- ✓ Superficie de planta. Se usaron hisopos estériles humedecidos en solución azucarada al 1%, con los cuales se limpió las superficies de las plantas y posteriormente la muestra se conservó en un tubo falcón con la misma solución.
- ✓ Suelo sin cobertura vegetal. Se tomaron aproximadamente 0.5 Kg de suelo con una profundidad no mayor a 5 cm, usando una espátula estéril y la muestra se colocó en bolsas estériles rotuladas que fueron trasladadas al laboratorio.
- ✓ Rizósfera. Se tomaron 0.25 Kg usando una espátula estéril y la muestra se colocó en bolsas estériles, se rotularon y trasladaron al laboratorio.
- ✓ Barniz de la roca. Se lijó material rocoso, se obtuvo aproximadamente (5 ml) que fueron guardados en un tubo falcón. Algunas rocas pequeñas fueron transportadas al laboratorio en tubos falcón o bolsas estériles.
- ✓ Biocrust o Cubiertas biológicas. Se tomaron 10 g usando una espátula estéril y se colocaron en un tubo falcón.

5.4 Aislamiento y cultivo de microorganismos

A cada muestra de suelo sin cobertura vegetal, rizosfera, superficie de la cactácea, barniz de la roca y cubiertas biológicas, se resuspendieron en 10 ml de buffer de fosfatos (PBS) 10mM, pH 7.2 y a partir de esta se realizaron diluciones seriadas (1:10).



Cada dilución fue plaqueada en medio de cultivo PCA modificado con antimicóticos y se incubaron a 30°C durante una semana. Las colonias fueron aisladas por diferencias morfológicas, se resembraron en el mismo medio de cultivo e incubaron por una semana a 30°C.

Extracto de levadura	0.25 g
Peptona de caseína	0.25 g
Glucosa	10 g
Agar	15 g
Agua destilada	960 ml
Ketoconazol 125 µg/ml	320 µl

Medio de cultivo (PCA Modificado)

5.5 Extracción de ADN genómico

A partir de las colonias aisladas y purificadas, se extrajo el ADN genómico, utilizando el Kit comercial Wizard® Genomic DNA Purification Kit con algunas modificaciones, según el protocolo descrito a continuación:

- 1) Se tomaron 2 ml de cultivo (o 2 inóculos con asa bacteriológica), se centrifugaron durante 2 min a 13,000 rpm, se eliminó el sobrenadante y resuspendió en 480 µl EDTA (50 mM).
- 2) Se añadió 120 µl lisozima e incubó a 37°C durante 60 min, después se añadió 50 µl de proteasa e incubó a 37°C durante 60 min, se centrifugó durante 2 min a 13,000 rpm, y se eliminó el sobrenadante.
- 3) Se añadió 600 µl de Nuclei Lysis Solution y pipeteo suavemente e incubó durante 5 min a 80°C, después se enfrió a temperatura ambiente.
- 4) Se añadió 200 µl de Protein Precipitation Solution, agitando con vórtex, e incubó en hielo durante 5 min. Después se centrifugó a 13,000 rpm durante 3 min.
- 5) El sobrenadante se transfirió a un tubo limpio con 600 µl de isopropanol a temperatura ambiente y se mezcló. Después se centrifugó a 13,000 rpm durante 3 min y decantó el sobrenadante.
- 6) Se adicionó 600 µl de etanol al 70% a temperatura ambiente. Mezclando y Centrifugando durante 2 min a 13,000 rpm. El etanol se aspiró y el sedimento se secó al aire durante 10-15 min.
- 7) El ADN se rehidrato en 50 µl de solución de rehidratación durante 1 h a 65 ° C.

5.5.1 Cuantificación de ADN

Para determinar la concentración de ADN, se utilizó el método espectrofotométrico (basado en la absorbancia de los ácidos nucleicos a una longitud de onda 260 nm). Como blanco, se utilizó agua bidestilada y se tomaron 2 μL de cada muestra, disolviendo en 98 μL de agua bidestilada (se obtuvo un factor de dilución 2/100). La concentración de ADN se calculó utilizando la siguiente relación:

$$\text{Concentración ADN muestras} = \text{Abs 260 nm} \times (50 \text{ ng}/\mu\text{L}) \times (100/2)$$

5.6 Reacción en cadena de la ADN polimerasa (PCR)

La técnica PCR es un procedimiento para generar grandes cantidades de una secuencia específica de ADN, mediante un proceso cíclico que se repite de 25 a 30 veces. Para llevar a cabo este método se necesita tener un ADN de doble cadena que actúa como molde, dos oligonucleótidos que sirven como iniciadores de la síntesis, una ADN polimerasa termoestable que resista temperaturas mayores a 95°C, además dNTPs y buffer adecuado para la reacción.

5.7 Oligonucleótidos específicos del gen 16S de Actinobacteria

La técnica PCR fue usada para amplificar secuencias de ADN del gen 16S con el objetivo de identificar las cepas positivas para Actinobacteria. Para ello se empleó el oligonucleótido delantero 16SAct240F reportado por Stach *et al.*, (2003) y el oligonucleótido reverso 16SAct360R diseñado en este trabajo mediante alineamientos de secuencias de nucleótidos (Fig. 8, Tabla 2).

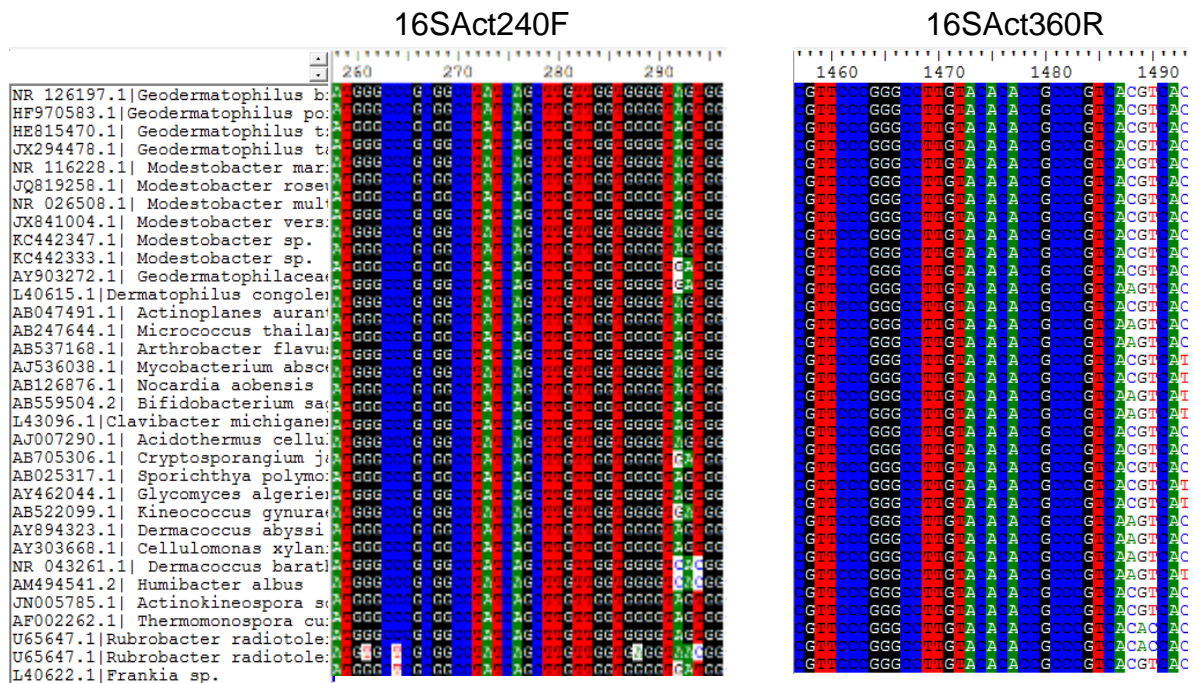


Fig. 8. Alineamiento de secuencia del gen 16S en Actinobacteria. Se muestran solo las regiones del gen que se utilizaron para diseñar los oligonucleótidos.

16SAct240F 5'-CGC GGC CTA TCA GCT TGT TG-3'

16SAct360R 5'-TGA CGG GCG GTG TGT ACA AG-3'

Tabla 2. Secuencia de los oligonucleótidos para Actinobacteria

Los oligonucleótidos diseñados abarcan a partir de la región 265 a la 1,487 en los alineamientos de secuencias de nucleótidos y aproximadamente amplificaron un producto de 1200 pb. Las estructuras de las secuencias nucleotídicas que amplificaron el primer delantero y trasero del gen 16S ribosomal de actinobacterias se visualizaron mediante el uso del programa <http://sfold.wadsworth.org/cgi-bin/>, se encontró que presentaron estructuras de horquilla (Fig. 9) y estas correlacionaron con regiones conservadas en bacterias, esto se corroboró al localizarlos en el gen 16S ribosomal *E.coli* (Fig. 10).

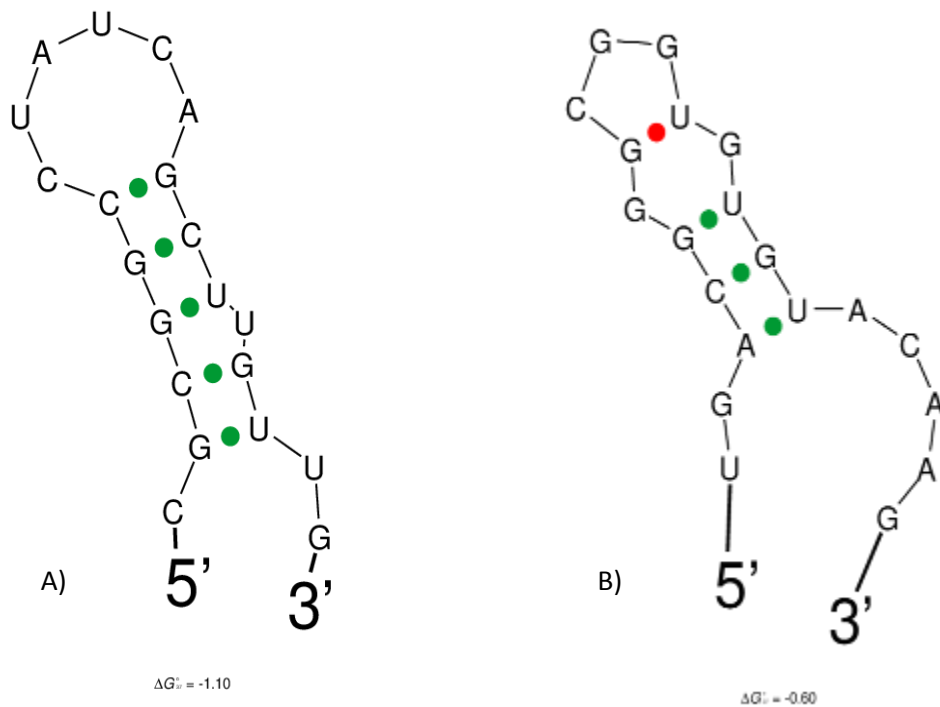


Fig. 9. Estructura de la región que amplifica el oligonucleótido delantero (A) y trasero (B) del 16S ribosomal en actinobacterias.

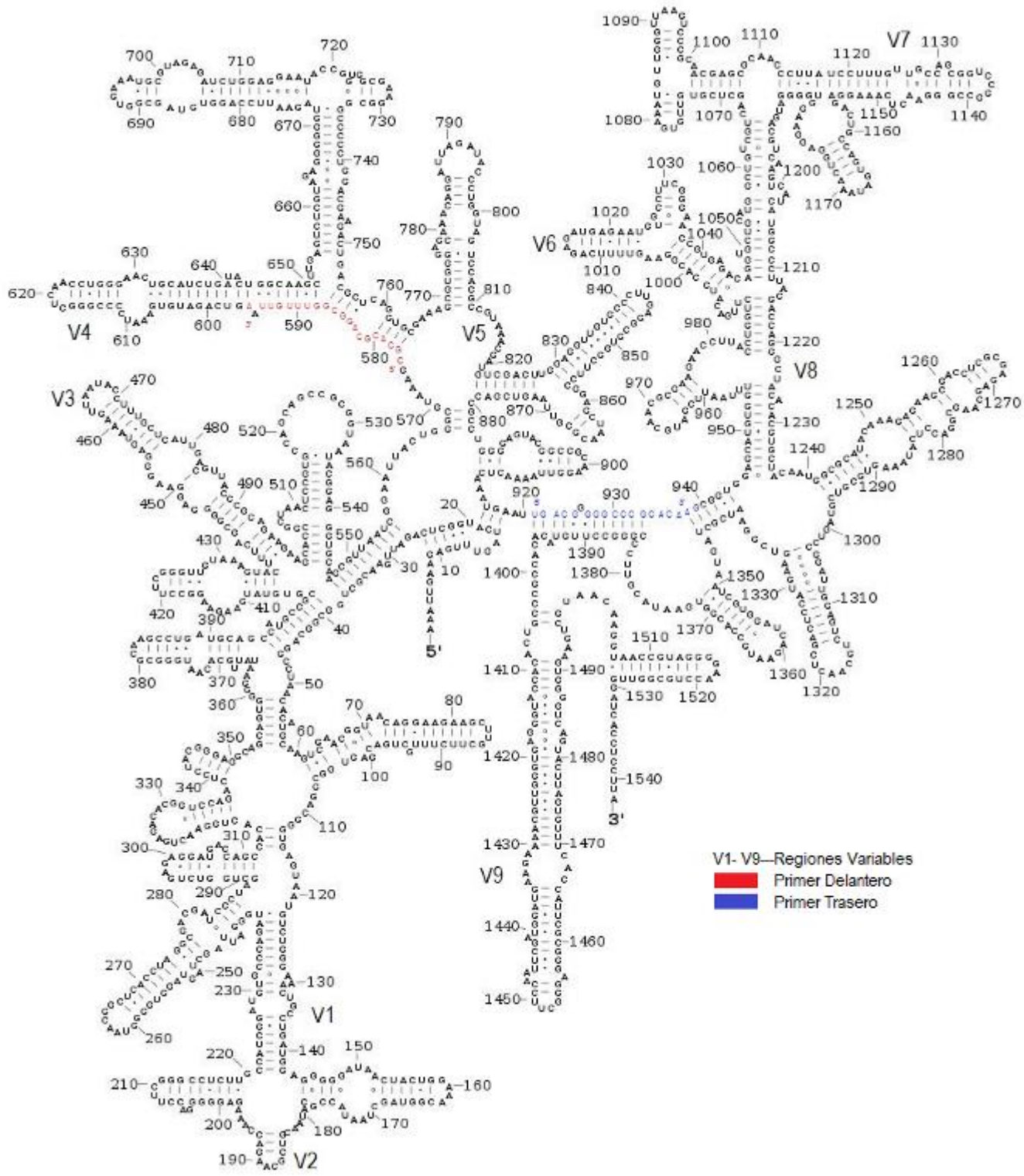


Fig. 10. Estructura de la región que amplifica el oligonucleótido delantero (Rojo) y trasero (Azul) localizada en el 16S ribosomal en *E.coli*.

5.7.1 Condiciones de reacción y amplificación

La mezcla para la reacción se hizo en un volumen final de 10 μL , con los siguientes reactivos: 1 μl de Buffer con KCL (10X), 0.15 μl de dNTPs (0.2 mM), 0.6 μl de MgCl_2 (25 mM), 1.25 μl de cada oligonucleótido (10 pmoles), 0.19 μl de taq polimerasa (5U/ μL) marca Thermo scientific, 4.32 μl de agua pisa y 1 μl de ADN templado.

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se llevó a cabo para 35 ciclos en un termociclador marca Applied Biosystems. El programa de amplificación utilizado se especifica a continuación:

Paso	Temperatura	Tiempo
1.-Desnaturaización inicial	96°C	2 min
2.-Desnaturalización	96°C	45 s
3.-Alineamiento	68.2°C	45 s
4.-Extensión	72°C	2 min
5.-Extensión final	72°C	10 min

5.8 Oligonucleótidos para PCR del *locus* policétido sintasa

Para identificar las cepas de actinobacterias positivas para el *locus* policétido sintasa (PKS). Se diseñaron iniciadores utilizando alineamientos de secuencias de nucleótidos (Fig.11). Analizando los alineamientos, se observó que el gen policétido sintasa presenta una gran variación en las secuencias nucleotídicas, lo que dificulta el diseño de oligonucleótidos. Por ello optamos por agrupar las secuencias con mayor relación filogenética (Fig.12).



Fig. 11. Alineamientos de secuencias del gen policétido sintasa en actinobacterias, mostrando solo la región con más similitud en nucleótidos.

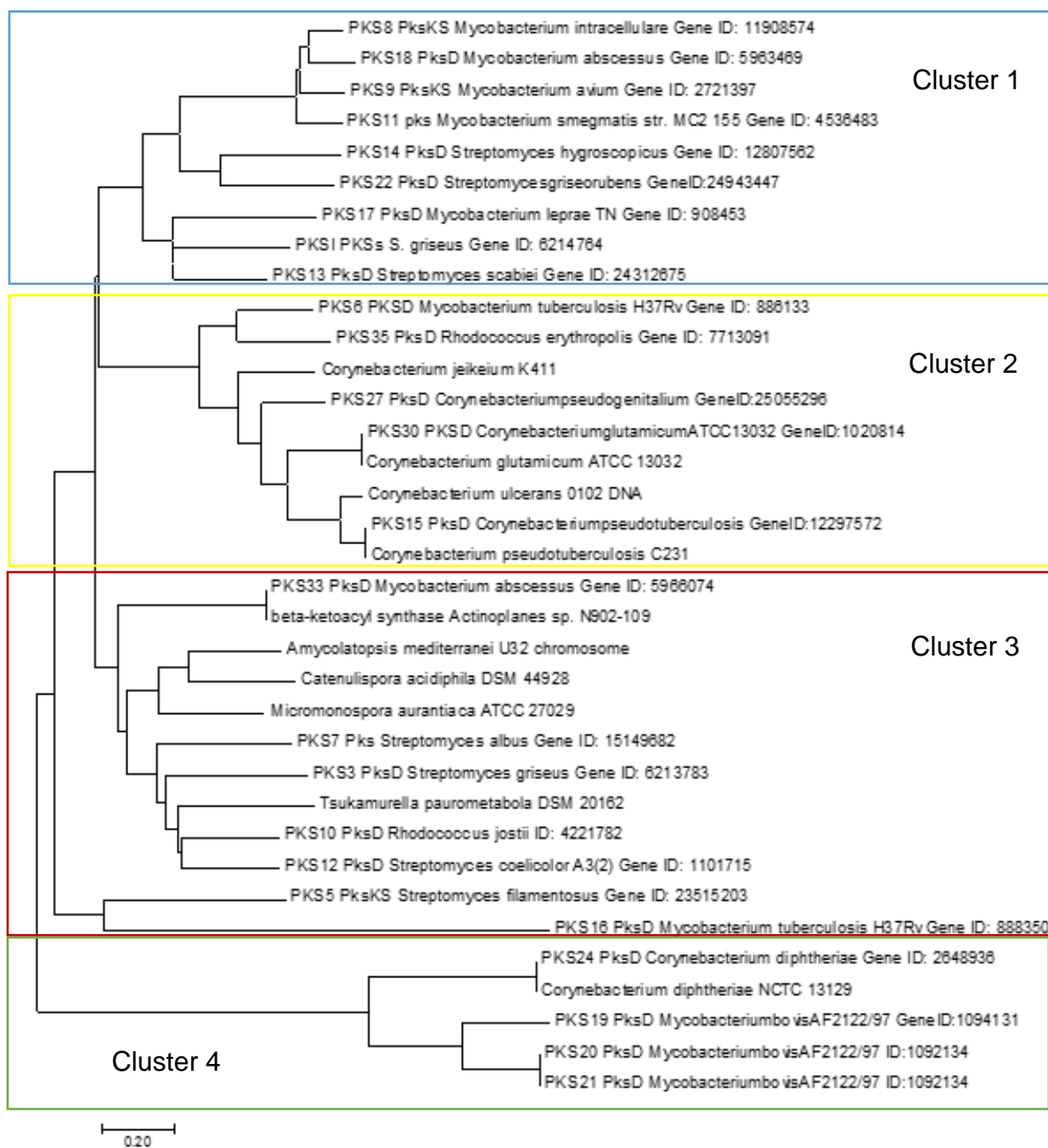


Fig. 12. Árbol filogenético de secuencias completas del gen policétido sintasa en actinobacterias.

De esta forma, se organizaron cuatro *clústers* (Fig. 12) que compartieron mayor semejanza en secuencia, se examinó que el clúster 1 y 3 presentaron la mayor distribución de grupos taxonómicos, así como mayor similitud en secuencias nucleotídicas. Estos *clústers* permitieron generar dos pares de oligonucleótidos para regiones conservadas del locus PKS.

5.8.1 Oligonucleótidos para el *Cluster* 1

Para el diseño de los oligonucleótidos del *Clúster* 1, las secuencias alineadas correspondieron a todo el gen policétido sintasa de géneros *Mycobacterium* de actinobacterias reportadas en el GenBank, estas secuencias contenían los dominios esenciales y auxiliares de las PKS (Fig. 13).

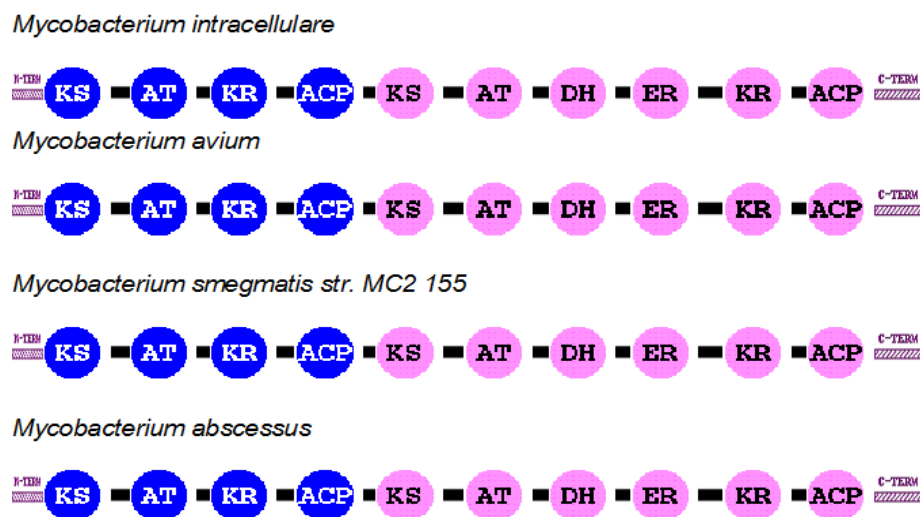


Fig.13. Dominios presentados en secuencias completas del gen policétido sintasa en géneros *Mycobacterium* reportadas en el Genbank.

Se diseñó el oligonucleótido delantero PKSC1F a partir de la región 14,184-14,199 y el oligonucleótido reverso PKSC1R a partir de la región 14,450-14,652 de las secuencias de nucleótidos alineadas para el gen policétido sintasa (Fig.14). El producto de amplificación con ambos es de 468 pb (Tabla 3).

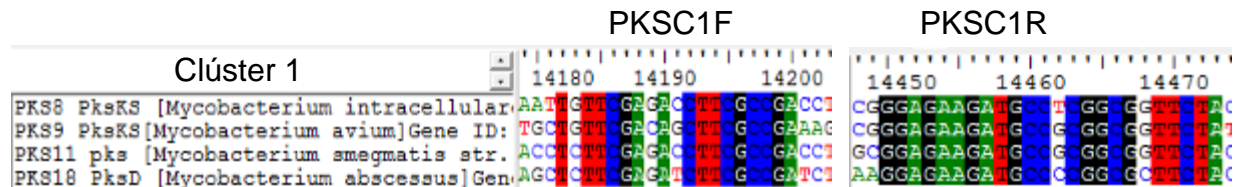


Fig.14. Región de alineamiento del oligonucleótido PKSC1F/PKSC1R.

PKSC1F	5´- TTC GAS ABC TTC GCC G -3´
PKSC1R	5´- CCG VGG CAT CTT CTC C -3´

Tabla 3. Secuencia de los oligonucleótidos para el Clúster 1.

La región que amplificaron los oligonucleótidos PKSC1F/PKSC1R en el gen policétido sintasa correspondió al dominio auxiliar DH que mostró ser conservado en las secuencias alineadas, el sitio activo de DH consistió en histidina y ácido aspártico (Fig.15).

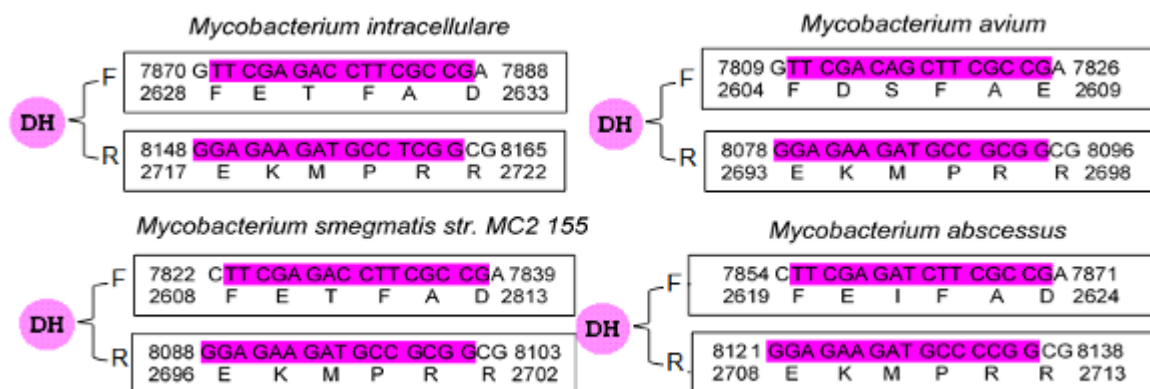


Fig. 15. Posiciones de los primer PKSC1F/PKSC1R en secuencias del dominio DH.

La amplificación con los oligonucleótidos PKSC1F/PKSC1R corresponde en la secuencia peptídica a una estructura del dominio DH que presenta hélices, hojas plegadas y horquillas (Fig.16).

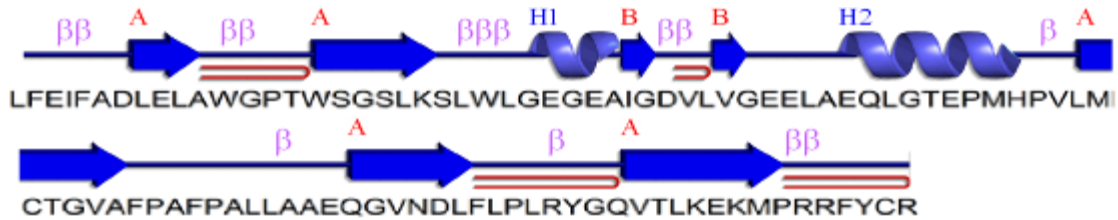


Fig. 16. Estructura secundaria que presentó la región que es amplificada los oligonucleótidos PKSC1F/PKSC1R.

5.8.1.1 Condiciones de reacción y amplificación PKSC1F/PKSC1R

La mezcla para la reacción se hizo a un volumen final de 10 μ L, con los siguientes reactivos: 1 μ l de Buffer con KCL (10X), 0.15 μ l de dNTPs (0.2 mM), 0.6 μ l de MgCl₂ (25 mM), 1.25 μ l de cada oligonucleótido (10 pmoles), 0.19 μ l de taq polimerasa (5U/ μ L) marca thermo scientific, 4.32 μ l de agua pisa y 1 μ l de ADN templado.

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se llevó a cabo para 35 ciclos en un termociclador marca Applied Biosystems. El programa de amplificación utilizado se especifica en la tabla siguiente:

PASO	TEMPERATURA	TIEMPO
1.-Desnaturaización inicial	96°C	2 min
2.-Desnaturalización	96°C	45 s
3.-Alineamiento	64°C	45 s
4.-Extensión	72°C	2 min
5.-Extensión final	72°C	10 min

5.8.2 Oligonucleótidos para el Clúster 3

Para el diseño de los oligonucleótidos del Clúster 3, las secuencias alineadas correspondieron a todo el gen policétido sintasa de actinobacterias reportadas en el GenBank, que contenían los distintos dominios esenciales y auxiliares de las PKS (Fig. 17).

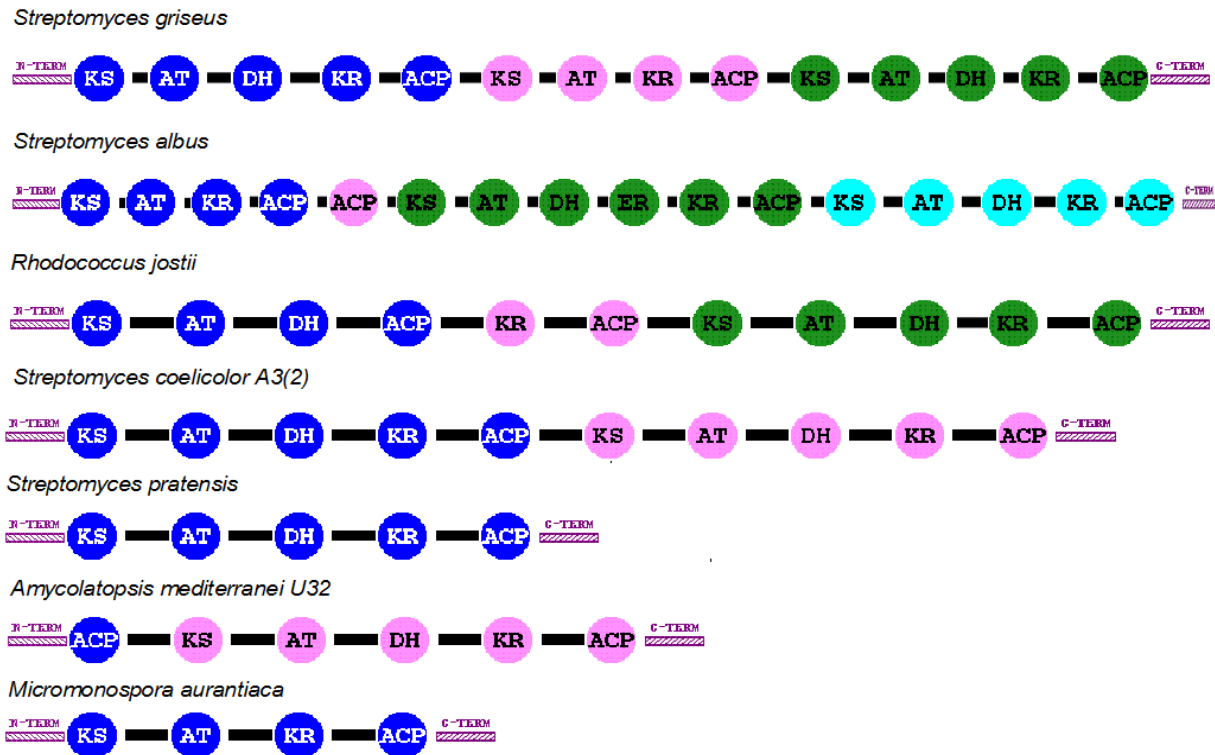


Fig.17. Dominios presentados en secuencias completas del gen policétido sintasa en géneros *Mycobacterium* reportadas en el Genbank.

El oligonucleótido delantero (PKSC3F) se diseñó a partir de la región 6,074-6,089 y el reverso (PKSC3R) a partir de la región 6,798-6,813 de las secuencias de nucleótidos alineadas para el gen policétido sintasa (Fig.18). Con estos dos oligonucleótidos se amplificó un producto 739 pb (Tabla 4).

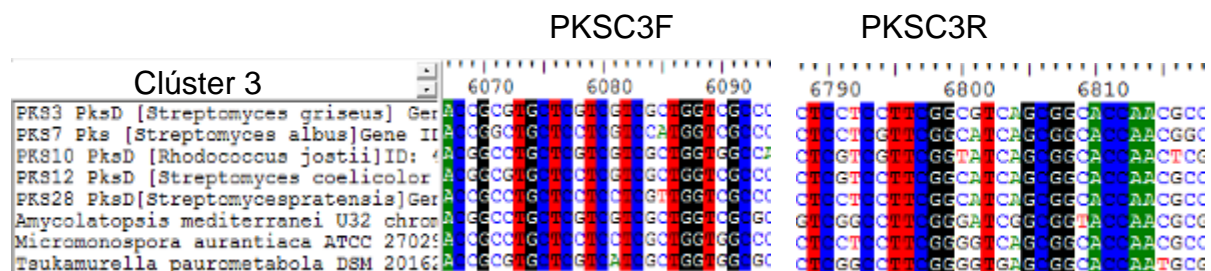


Fig.18. Región de alineamiento del oligonucleótido PKSC3F/PKSC3R

PKSC3F	5' - GCT CST CVT CSH TGG T -3'
PKSC3R	5' - TGG TRC CGC YSA YVC -3'

Tabla 4. Secuencia de los oligonucleótidos para el Clúster 3.

La región que amplificaron los oligonucleótidos PKSC3F/PKSC3R en el gen policétido sintasa correspondió en la secuencia peptídica al dominio conservado KS, así como a una parte del motivo conservado VDTACSSSLVA (Fig.19).

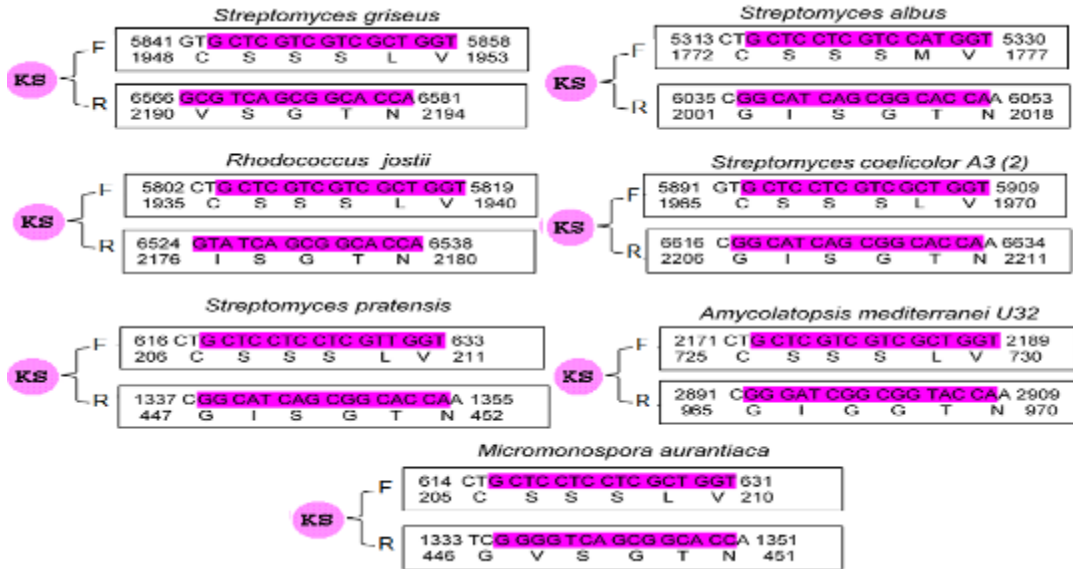


Fig. 19. Posiciones de los primer PKSC3F/PKSC3R del dominio KS y motivo VDTACSSSLVA conservado en secuencias de actinobacterias.

La región amplificada por los oligonucleótidos PKSC3F/PKSC3R en la cadena peptídica corresponde a una estructura secundaria del dominio KS que presenta hélices, hojas plegadas y horquillas (Fig.20).

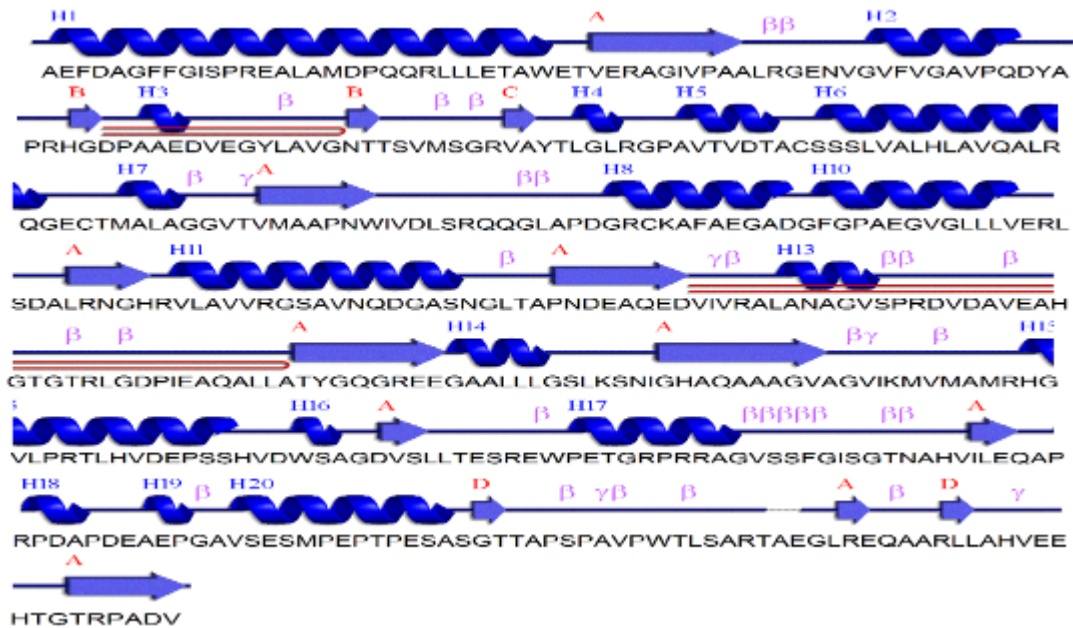


Fig. 20. Estructura secundaria que presentó la región que amplifican los oligonucleótidos PKSC3F/PKSC3R.

5.8.2.1 Condiciones de reacción y amplificación PKSC3F/PKSC3R

La mezcla para la reacción se hizo a un volumen final de 10 μ L, con los siguientes reactivos: 1 μ l de Buffer con KCL (10X), 0.15 μ l de dNTPs (0.2 mM), 0.6 μ l de MgCl₂ (25 mM), 1.25 μ l de cada oligonucleótido (10 pmoles), 0.19 μ l de taq polimerasa (5U/ μ L) marca Thermo scientific, 4.32 μ l de agua pisa y 1 μ l de ADN templado.

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se llevó a cabo para 35 ciclos en un termociclador marca Applied Biosystems. El programa de amplificación utilizado se especifica en la tabla siguiente:

Paso	Temperatura	Tiempo
1.-Desnaturaización inicial	96°C	2 min
2.-Desnaturalización	96°C	45 s
3.-Alineamiento	63°C	45 s
4.-Extensión	72°C	2 min
5.-Extensión final	72°C	10 min

5.9 Electroforesis en geles de agarosa para amplificados

Los fragmentos de ADN amplificados en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), fueron separados mediante la técnica electroforesis en geles de agarosa a concentración 1% disuelta en TAE 1x (Tampón pH 8) a 90 volts por 45 min.

6. Purificación de ADN para Secuenciación

Para llevar a cabo este procedimiento, se usó el kit comercial High Pure PCR Product Purification. La concentración del ADN purificado se cuantificó mediante el uso de Nanodrop 2000.

6.1. Secuenciación de productos purificados

Los productos purificados fueron secuenciados por la unidad de síntesis y secuenciación de ADN del Instituto de Biotecnología (IBT), UNAM. Las secuencias obtenidas fueron analizadas utilizando el *software BioEdit*. Los resultados se compararon con otras secuencias de la base de datos NCBI. Por otra parte se hizo un análisis BLAST (Nucleótido-Nucleótido y Proteína-Proteína).

7. Modelado de homología (SWISS-MODEL)

SWISS-MODELO es un servidor diseñado para el modelado comparativo de estructuras tridimensionales de proteínas. Este método se basó en una amplia biblioteca de plantillas con las que compararon la secuencia diana de aminoácidos, para ser significativa debe tener un 30% de identidad con la plantilla cotejada, así se generó de forma fiable un modelo 3D de una proteína (Schwede *et al.*, 2003).

En general, el modelado de homología o comparativo, usó la precisión en las posiciones de los carbonos alfa, así como los ángulos de torsión phi y psi en las estructuras 3D, estas regiones de la secuencia son de alta identidad, permitiendo la formación de un prototipo más certero de la estructura a predecir. Por otra parte SWISS-MODEL proporcionó la anotación de la estructura cuaternaria, los ligandos esenciales y co-factores que permitieron la construcción de modelos completos (Biasini *et al.*, 2014). Existen casos que mostraban múltiples estructuras de plantillas alternativas para una proteína de interés, en este punto se realizó una selección entre las plantillas para seleccionar la más idónea para sus requerimientos (Biasini *et al.*, 2014).

8. Resultados y Discusión.

8.1 Recolección de Muestras (Anexo B)

8.2 Aislamiento y cultivo de microorganismos

De los dos muestreos realizados en la Reserva de la Biosfera Tehuacán-Cuicatlán, se obtuvieron 348 aislamientos, la mayoría de las colonias presentaron pigmentación (Anexo B).

8.3 Extracción de ADN genómico de los actinomicetos aislados

Las 348 colonias bacterianas se sembraron en el medio de cultivo previamente descrito y se incubaron durante tres días a 30°C. Se extrajo ADN de cada colonia, siguiendo el protocolo descrito en la metodología experimental.

8.4 Amplificación por PCR del gen 16S de Actinobacterias

Se amplificó el gen 16S ADNr, empleando los oligonucleótidos 16SAct240F y 16SAct360R de cada una de los 348 aislamientos. De esta manera se generó un fragmento aproximado de 1200 pb (Fig. 21).

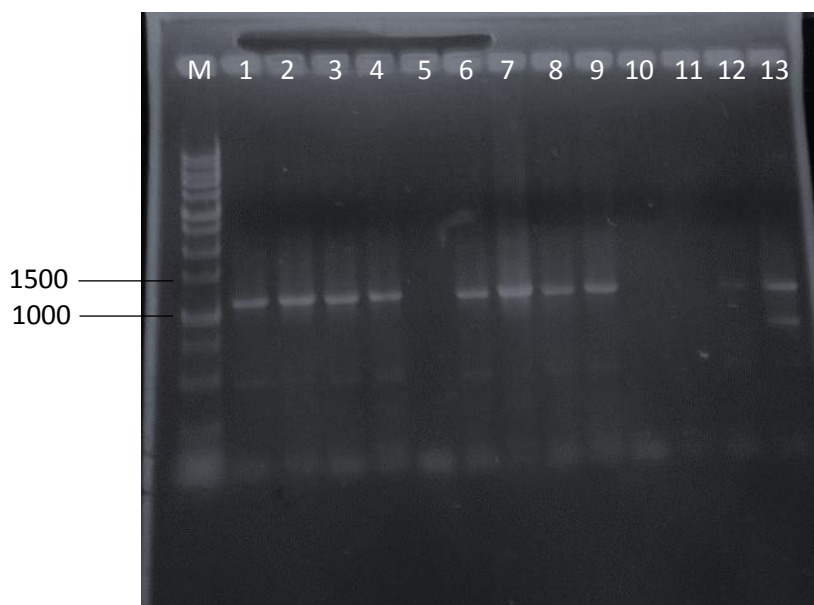


Fig 21. Gel de agarosa 1.5% con los productos de la amplificación del gen 16S ADN. Carriles, M: Marcador de peso 1Kb; 1: Cepa control (*Geodermatophilus*); 2: cepa 56; 3: Cepa 43; 4: cepa 51; 5: Cepa 1; 6: Cepa 52; 7: Cepa 36; 8: Cepa 37; 9: Cepa 94; 10: Cepa 2; 11: Cepa 3; 12: Cepa 4; 13: Cepa 5.

De los 348 aislados, solo 70 obtuvieron el producto de amplificación con los oligonucleótidos 16SAct240F y 16SAct360R (Anexo C).

Se eligieron al azar 10 de los 70 aislamientos identificados como actinobacterias. La secuenciación de los amplificados de estos 10 aislados, se llevó a cabo empleando los oligonucleótidos 16SACT240F Y 16SACT360R. Las secuencias obtenidas se analizaron empleando un análisis estándar BLAST nucleótido-nucleótido, para comparar con otras secuencias de la base de datos del Genbank, de esta forma se identificó a que probables microorganismos correspondían. Los resultados del análisis destacan diversos géneros (Anexo C), entre ellos *Streptomyces* el género más representativo y estudiado del phylum Actinobacteria, debido a su gran potencial para la obtención de moléculas con actividades biológicas y principalmente aislado de regiones áridas como el desierto de Atacama, en donde se han descubierto nuevas especies productoras de compuestos no descritos (Okoro *et al.*, 2010; Dong *et al.*, 2014; Guo *et al.*, 2015).

En regiones áridas, no existen suficientes estudios microbianos dependientes del cultivo, Okoro *et al.*, 2009 fueron los primeros que detectaron la diversidad cultivable de actinobacterias en suelos del desierto de Atacama, probaron tres medios de cultivo solo se hallaron alrededor de 100 aislamientos de estos microorganismos por medio (Okoro *et al.*, 2010, Santhanam *et al.*, 2012). En este estudio se detectaron 70 aislamientos de actinobacterias, esto se puede atribuir a lo siguiente:

En general, las actinobacterias son de crecimiento lento, por lo tanto no son competidoras en medios ricos, su número disminuye al aumentar la concentración de nutrientes orgánicos a causa de la competencia con otros microorganismos. En el momento que la concentración de nutrientes baja al inicio de la mineralización de restos vegetales, los microorganismos competidores disminuyen al quedar limitados en la fuente de carbono y nitrógeno, por consiguiente las actinobacterias pueden prosperar en ambientes con poca disponibilidad de compuestos, como son las zonas áridas (Sánchez, 2006).

En el suelo de la zona Tehuacán-Cuicatlán la materia orgánica es de 3.1 %, lo que se considera alto para una región árida y originó mayor competencia entre los microorganismos que no permitieron la proliferación de actinobacterias en esta región (López *et al.*, 2003).

8.5 Amplificación por PCR del locus policétido sintasa en actinobacterias

La detección del gen policétido sintasa (PKS) se realizó por medio del diseño de dos oligonucleótidos PKSC1F/PKSC1R y PKSC3F/PKSC3R, que amplificaron un dominio deshidratasa de 468 pb y un dominio beta-cetoacil sintasa de 739 pb respectivamente.

De los 70 aislamientos identificados como actinobacterias ninguna amplificó el dominio deshidratasa y sólo un cepa amplificó el dominio beta-cetoacil sintasa, la cual se volvió a amplificar para confirmar este resultado (Fig.22).

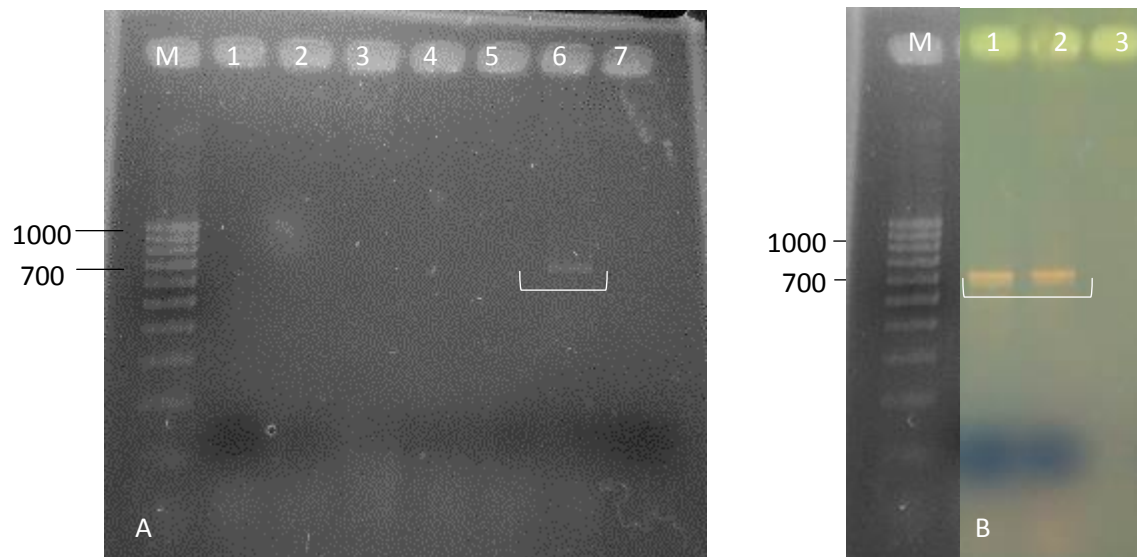


Fig.22. Gel de agarosa 1.5% con los productos de la amplificación con PKSC3F/PKSC3R de 739pb (dominio beta-cetoacil sintasa). A) M: Marcador de peso molecular 1Kb; 1: Ceba 270; 2: Ceba 265; 3: Ceba 295; 4: Ceba 240; 5: Ceba 242; 6: 250; 7: Ceba 246. B) M: Marcador de peso molecular 1Kb; 1: Ceba 250; 2: Ceba 250; 3: Ceba 282.

Los oligonucleótidos diseñados para el dominio deshidratasa (DH) y dominio beta-cetoacil sintasa (KS), fueron planteados, basándose en las secuencias completas del locus policétidos sintasa de actinobacterias disponibles en el Genbank, ambos dominios fueron altamente conservados en las secuencias examinadas. La evidencia considera al dominio KS, como el más conservado entre los dominios PKS (Aparicio *et al.*, 2000; Lopez, 2003; Moffitt & Neilan, 2003; Ginolhac *et al.*, 2004). En cambio el dominio DH es considerada una región auxiliar un poco más de variable por diversos autores, pero en las secuencias analizadas se conservó (Anand & Mohanty, 2012; Keatinge, 2008).

La ausencia de amplificación con los oligonucleótidos PKSC1F/PKSC1R e insuficiente número de amplificaciones con PKSC3F/PKSC3R, probablemente se relaciona con un alto grado de inestabilidad genética que presentan algunos géneros de actinobacterias como *Streptomyces*, en donde ocurren deleciones a gran escala, amplificaciones y circularización en las regiones terminales menos conservadas de los cromosomas lineales (Chen *et al.*, 2002; Choulet *et al.*, 2006). En general los genes implicados en la síntesis del metabolismo secundario se localizan en las regiones terminales del cromosoma, estas últimas contienen secuencias repetidas invertidas (TIR) que participan en sucesos de recombinación homóloga dando como resultado el reemplazo intra-cromosómico, así como inducir deleciones en las regiones laterales y extensas amplificaciones en torno a las secuencias desaparecidas ocasionando reordenamientos del genoma que conducen a la diversidad metabólica del género *Streptomyces* (Chen *et al.*, 2002; Choulet *et al.*, 2006; Rodríguez *et al.*, 2015; Te poele *et al.*, 2008).

Se ha demostrado que la distribución de genes de policétido sintasa (PKSs) entre bacterias es consecuencia de mutaciones, reordenamientos de dominios y la duplicación de módulos, los cuales generan la formación de nuevas moléculas (Ziemert *et al.*, 2014). Los policétidos modulares, presentan mecanismos que introducen variabilidad en los grupos de genes por ejemplo; la duplicación, la supresión, la recombinación y la transferencia horizontal de genes (Ziemert *et al.*, 2014).

Una gran porción de la diversidad en metabolitos secundarios, se ha obtenido a través de la adquisición de secuencias por medio de transferencia lateral de genes (LGT). Este mecanismo de intercambio genético proporciona una estrategia eficaz para que las bacterias exploten rápidamente nuevos recursos y, se ha propuesto como una fuerza selectiva detrás de la agrupación física de los genes dentro de los genomas bacterianos. Aunque la importancia ecológica y evolutiva de los eventos LGT en la producción de metabolitos secundarios en actinobacterias siguen siendo desconocidos (Ochman *et al.*, 2000; Jensen *et al.*, 2007).

El intercambio horizontal en las vías metabólicas junto con la fijación entre las poblaciones distribuidas a nivel mundial, apoya un papel funcional y sugiere que la adquisición de *clúster* de genes para biosíntesis de productos naturales representa un mecanismo para la diversificación ecológica que pueden conducir a la formación de linajes bacterianos independientes (Penn *et al.*, 2009).

Mientras LGT es un método rápido para la adaptación ecológica en bacterias, la duplicación de genes de PKS proporciona una estrategia evolutiva complementaria que podría conducir a la producción rápida de nuevos metabolitos secundarios que pueden impulsar nuevas radiaciones adaptativas (Penn *et al.*, 2009; Ochman *et al.*, 2000). Existe evidencia que involucra a los elementos integrativos conjugativos en actinobacterias (AICEs), que podrían actuar como moduladores de la diversidad en el genoma y/o estar involucrados en la adquisición de *clústers* de metabolitos secundarios y DNA extraño mediante LGT (Te poele *et al.*, 2008).

En este estudio, de los 70 aislamientos de actinobacterias en ninguno fue posible amplificar el dominio DH y sólo el aislado 250 amplificó para el dominio KS, este último es altamente conservado en los genes PKS de actinobacterias y probablemente la ausencia de amplificación en las cepas sería la ausencia de la secuencia KS para el que fue diseñado, esto debido al existir mecanismos como la duplicación, la supresión, la recombinación y la transferencia horizontal de genes anteriormente expuestos, se genera una mayor diversidad en las secuencias de los policétidos sintasa lo que explica la razón por la que el oligonucleótido diseñado para DH no generó ningún amplificado.

Pero el aislado 250 si amplificó para la región del dominio KS, para el que se diseñó partiendo de secuencias nucleotídicas conservadas en el gen policétido sintasa así como una parte del conservado un motivo de aminoácidos VDTACSSSLVA (Fig. 19). Quizás solo se encontró el dominio KS en un aislado, ya que los PKS modulares constan de varios dominios KS distribuidos entre los distintos módulos que los conforman, los dominios KS tienen secuencias altamente conservadas entre ellas y reportadas en actinobacterias, pero pueden estar expuestas a cambios puntuales en las secuencias de nucleótidos por mecanismos como mutaciones, deleciones, desplazamientos, etc. Estos cambios en las secuencias de nucleótidos del dominio KS afectan al oligonucleótido diseñado, al cambiar uno o varios nucleótidos a lo largo de la secuencia, el oligonucleótido no reconoce la secuencia y no amplifica ningún producto.

A pesar de la gran diversidad genética de los metabolitos policétidos sintasa, en este trabajo se obtuvo un aislamiento mediante el uso de un oligonucleótido degenerado para el dominio KS, lo que sugiere que puede ser una estrategia útil si se conoce que géneros de actinobacterias se están trabajando, según lo reportado por Ayuso *et al.*, 2004, que trabaja con oligonucleótidos diseñados para el dominio KS pero solo en géneros específicos y productores de ciertos metabolitos.

Además al usar el dominio KS como marcador de genes PKS han demostrado incongruencias al analizar filogenéticamente las secuencias de este dominio, lo que sugieren que se ha producido transferencia horizontal de genes, el movimiento de los genes KS hace que la detección sea engañosa y por lo tanto para obtener información sobre la producción de policétidos sintasa en actinobacterias es necesario utilizar enzimas implicadas en la biosíntesis de antibióticos específicos (Wawrik *et al.*, 2005; Metsä-Ketela *et al.*, 2002).

Al parecer el uso de oligonucleótidos para la búsqueda de genes policétidos sintasa basada en alineamientos de secuencias es una herramienta predictiva limitante que subestima la diversidad de los genes policétidos sintasa (Ayuso & Genilloud, 2004; Ayuso *et al.*, 2005).

Se debe recordar que entre las características distintivas de los metabolitos secundarios sobresale que algunos de ellos son muy específicos para cada especie y a veces, de cada cepa. Y en el caso de los policétidos sintasa esa gran variabilidad genética dificulta aún más la generación de oligonucleótidos para la búsqueda de genes policétidos sintasa.

8.6 Secuenciación del 16S rADN del aislado 250 de Actinobacterias

```
CTAATACCGGATAAACACTCCTTCTGGCATCTGAAAAGGTAAAAGCTCCGGCGGTGAAGGATGAGCCCCGGG
CCTATCAGCTTGTGGTGGGGTAATGGCCCACCAAGGCGACGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGCGACCGGC
CACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGAAA
GCCTGATGCAGCGACGCCGCGTGAGGGATGACGGCCTTCGGGTGTAAACCTCTTTCAGCAGGGAAGAAACG
AAAGTGACGGTACCTGCAGAAAAAACGCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGCGCAA
GCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGCGGCTTGTTCGCGTCGGATGTGAAAGCCCAGGGCT
TAACCCCGGGTCTGCATTCGATACGGGCAGGCTAGAGTGTGGTAGGGGAGATCGGAATTCCTGGTGTAGCGG
TGAAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGGTGGCGAAGGCGGATCTCTGGGCCATTACTGACGCTGAGGAG
CGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGTTGGGAACTAGGTGTTG
GCGACATTCACGTCGTCGGTGCCGCGAGCTAACGCATTAAGTTCCCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCT
AAAACCTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGACAAGCAGCGGAGCATGTGGCTTAATTCTACGCAACGCGAAGA
ACCTTACCAAGGCTTGACATATAACCGAAAGCATTAGAGATAGTGCCCCCTTGTGGTCCGGTATACAGGTGG
TGCATGGGTGTCGTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGCCCCGCAACGAGCGCACCCCTTGTCTGTG
TTGCCAGCATGCCCTTCGGGTGATGGGGACTCACAGAGACCGCCGGGTCAACTCGCAGGAAAGGATGGGGA
CGACGATCAAGTCATCATGACGCTTAATGTTCTTGGAGCCTGCACCCACGAGCTTTACAACTGGAGTCG
```

Fig.23. Secuencia nucleotídica del aislado 250

La secuencia del aislado 250 presenta una identidad del 98% que la relaciona probablemente al género *Streptomyces* (Tabla 5).

AISLADO	CEPA RELACIONADA/NUMERO GENBANK	IDENTIDAD %
250	<i>Streptomyces</i> sp. CS41/ EF494233.1	98%
250	<i>Streptomyces</i> sp. QLS48/ JQ838137.1	98%
250	<i>Streptomyces</i> sp. QLS21/JQ838085.1	98%
250	<i>Streptomyces</i> sp. CA21/ EF494226.1	97%

Tabla 5. Resultados del análisis BLASTN de la secuencia de la cepa 250.

Streptomyces el principal género de Actinobacteria con la capacidad para producir una gran diversidad de compuestos bioactivos que son frecuentemente utilizados para el desarrollo de sectores biotecnológicos y de la industria farmacéutica.

Alrededor del 80% de los antibióticos conocidos provienen de este género bacteriano por ejemplo: estreptomicina, ácido clavulánico, neomicina, cloranfenicol, eritromicina, neomicina, kanamicina, tetraciclina, vancomicina, rifamicina, etc. No obstante, además de producir antibióticos el género *Streptomyces* también puede producir otras sustancias con actividades antifúngicas, antitumorales, antiparasitarios, inmunosupresores entre otras.

Asimismo *Streptomyces* es el género más representativo e investigado para la obtención de metabolitos secundarios como los policétidos sintasas (Bundale *et al.*, 2014; Challis, 2014). En las últimas décadas, las investigaciones se han centrado en su genoma ha revelado que poseen numerosos genes policetidos sintasas tipo I y II agrupados en cluster con funciones desconocidas, con la posibilidad de producir policetidos novedosos de gran interés farmacéutico e industrial (Zhong *et al.*, 2013).

8.7 Secuenciación del dominio KS del aislado 250 de actinobacterias

```
AAGTTGCCCAGCCTTGGGTGCGGTTGAGTGTGATGTGGCGTTGGCGGGTGGGGTGACGGTGATGTCGTCGGG
GAGAGACGCCTCCAGCGCGGGCGGTGACGAGGGTTGGCCCGCCCTGGACGGTTCAAGGTATTCCCGTGCTA
GCCGATATTGCCGATATGGGTGACGCAACTACGTGTCTTGGTGTGGACTGCTCTTCTTTAAAGACTGAAACC
TGCGTGTCTTCTCGTAATTCTTCGCTTCTTCTTTCGTAAAAAAGACCACTTGGTTTGGTTGGCTTATTGA
ATCGGGCATCATCTTTATCTACTTCCACAGGTGTAAGTGTGAGCCTAGGTTCTATCACTATTCATTTGAAT
TAAACTGAGATTGATTTCACTTTCAAACCCATAGTCTACCCGATCCTGTGACATTGCTCCACGAATATCCAA
TGCCATTGCCGGCGCTGTGACCGTAGCGATTTAGGTTATCGGATTAATGATCTTCCGTTTGTGGGCCGTTAC
CTTGTGAAATGACAATACACGTTGAAAATAGTAAAGATGG
```

Fig.24. Secuencia nucleotídica del dominio KS del aislado 250.

La secuencia 250 presenta una identidad del 100% beta-ketoacyl synthase (ks) en *Streptomyces sp.*FXJ1.068 (Tabla 6).

CEPA RELACIONADA/NUMERO GENBANK	IDENTIDAD %
<i>S. ascomycinicus</i> gene for polyketide synthase / AB430915.1	96%
<i>S. sp.</i> ID05 gene for polyketide synthase / AB432182.1	90%
<i>S. sp.</i> T1 type I ketosynthase / GQ486011.1	93%
<i>S. sp.</i> FXJ1.068 beta-ketoacyl synthase (ks)/ GU363668.1	100%

Tabla 6. Resultados del análisis BLASTN de la secuencia del aislado 250.

Estas observaciones demuestran la precisión de los oligonucléotidos PKSC3F/ PKSC3R para la búsqueda del dominio KS básico, catalítico y altamente conservado en los módulos del gen policétido sintasa, además al presentar una alta identidad y cercanía filogenética con la beta-cetoacil sintasa el aislado 250 es probablemente un dominio KS relacionado en la síntesis de policétidos en el género *Streptomyces* que es al que pertenece al aislado 250.

La traducción (marco de lectura 2) de la secuencia nucleotídica produjo la secuencia que se muestra a continuación

SCPALGAVECDVALAGGVTVMSSGRDASSAGGDEGWALGRFKVFAVLADIADVWVTQLRVLV
LDCSSLKTETCVFFS-FFASSFVKKDHLVWLAY-IGHHLYLLPQV-LLSL GSITIHNLN-TE
IDFTFKPIVYPIL-HCSTNIQCHCRRCDRSDLGYRINDLPFVGRYLVK-QYTLKIVKM

Fig. 25. Secuencia traducida a aminoácidos del amplificado 250

La secuencia anterior es homóloga a secuencias policétido sintasa tipo I del género *Streptomyces* (Tabla 7).

CEPA RELACIONADA/NUMERO GENBANK	IDENTIDAD %
Type I polyketide synthase [<i>S. sp.</i>]/ WP_070202984.1	48%
Type I polyketide synthase [<i>S. sp.</i>]/ WP_031126613.1	48%
Type I polyketide synthase [<i>S. sp.</i>]/ WP_053562470.1	48%
Type I polyketide synthase [<i>S. sp.</i>]/ WP_052705933.1	48%

Tabla 7. Resultados del análisis BLASTP de la secuencia de la cepa 250

El porcentaje de identidad revela la presencia de estructuras similares así como una función semejante al policétido sintasa tipo I.

Por otra parte, la comparación de la equivalencia de aminoácidos con la secuencia de la cepa *Streptomyces sp.* Con número de acceso WP_070202984.1 mostró un 48% de semejanza (Fig.26).

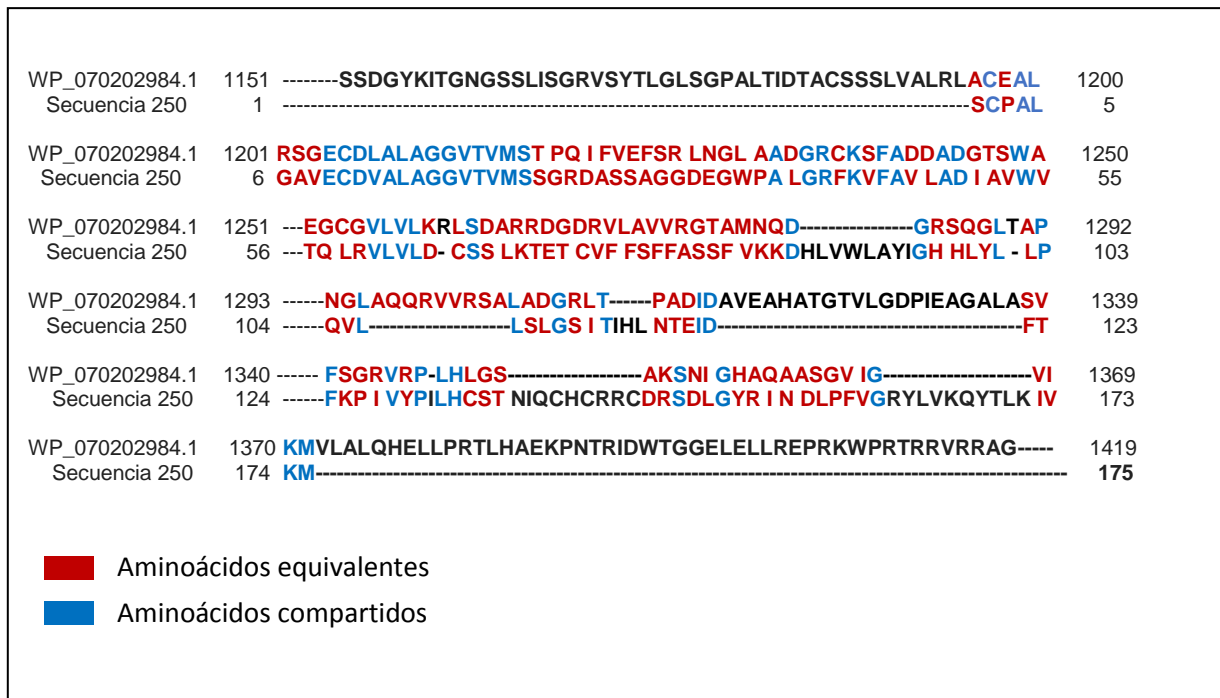


Fig.26. Alineamiento y equivalencia de aminoácidos de la secuencia del aislado 250 y el policétidos sintasa tipo I [*Streptomyces sp.* / WP_070202984.1]

La identidad y equivalencia de aminoácidos indica que se la secuencia obtenida del aislamiento 250 comprende un fragmento de una secuencia de policétido sintasa tipo I, que confirman que el uso de los oligonucleótidos PKSC3F/PKSC3R diseñados para el dominio KS de policétidos sintasa modulares tipo I de actinobacterias. Con lo antes expuesto podemos concluir que solo un aislado de los 70 aislados de Actinobacterias presento un amplificado para el dominio KS y se relacionó de manera certera con policétidos sintasa tipo I del género *Streptomyces*.

8.8 Informe del modelado de homología (SWISS-MODEL)

La predicción de la posible estructura 3D de la proteína de la secuencia de 181 aminoácidos proveniente de la secuencia 250 (Tabla 8) indicó similitud con 50 plantillas del SWISS-MODEL (<https://swissmodel.expasy.org>). La identidad más alta fue de 38.57% con una 6-Desoxieritronolida B sintasa. Al mismo tiempo, se visualizan dos modelos con una identidad media de 28.57% y 25.71, afines a Beta-cetoacil-sintasa, así como Policétido sintasa respectivamente (Tabla 8).

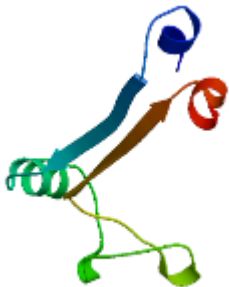
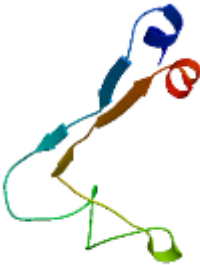

	Modelo 1	Modelo 2	Modelo 3
Estructura			
Identidad Con Plantillas	38.57%	28.57%	25.71%
Estado-oligo	Monómero	Monómero	Monómero
Resolución	2.73°A	2.0°A	4.2°A
Similitud	0.33	0.31	0.31
Cobertura	0.40	0.40	0.40
GMQE	0.18	0.16	0.17
QMEN4	-4.53	-4.90	-4.35
Descripción	6- Desoxieritronolida B sintasa.	Beta-cetoacil sintasa	Policétido sintasa

Tabla 8. Descripción de Modelos de homología (SWISS-MODEL)

Se obtuvo como resultado que la secuencia diana de 181 aminoácidos presenta la 6-Desoxieritronolida B sintasa (DEBS) se ha descrito como una policétido sintasa tipo I en la especie de actinobacteria *Saccharopolyspora erythraea*. DEBS son multienzimas que están formadas por tres mitades DEBS 1, 2, y 3 (Fig. 27). Además DEBS es responsable de la síntesis del anillo macrólido, que es precursor del antibiótico Eritromicina (Fig. 28).

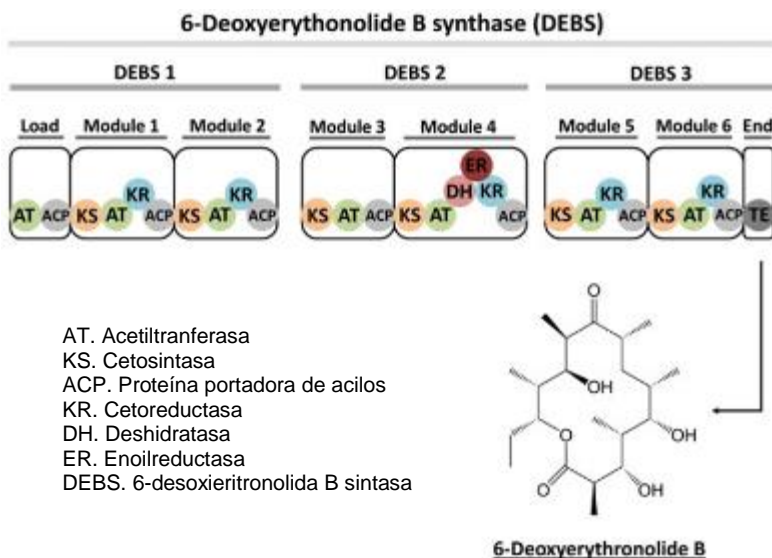


Fig.27. Modelo de organización de la 6-desoxieritronolida B sintasa (Cummings *et al.*, 2014)

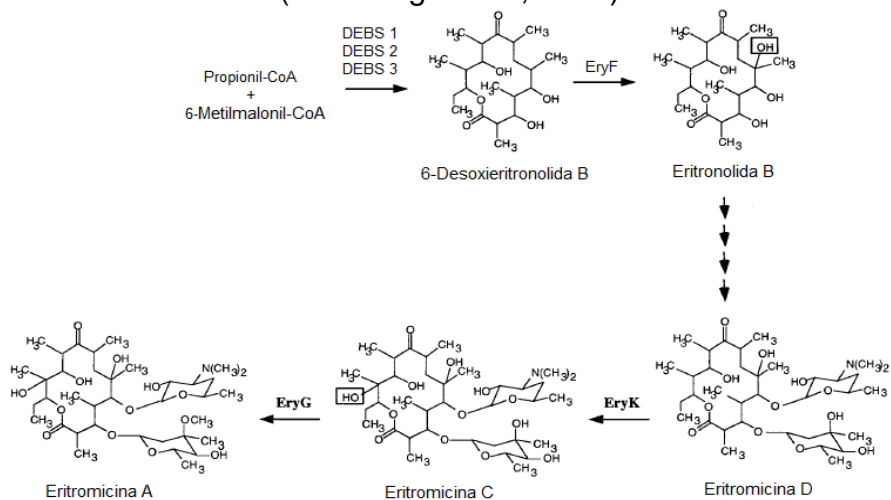


Fig.28. Biosíntesis de la Eritromicina

El SWISS-MODEL contribuye aportando datos sobre una posible similaridad de la secuencia 250 con policétidos sintasas, lo que se fundamenta con la información expuesta anteriormente, el análisis de la secuenciación permitió conocer que probablemente se trate de una beta-cetoacil sintasa y con la traducción a aminoácidos se relacionó con un policétido sintasa tipo I. De este modo, concluyo que la secuencia 250 está relacionada con un policétido sintasa.

9. Conclusiones

Como resultado de esta investigación, se obtuvo una cepa perteneciente al género *Streptomyces* que amplificó con los oligonucleótidos PKSC3F/PKSC3R diseñados para el dominio Beta-cetoacil-sintasa (KS). La secuenciación y posterior análisis reveló que presenta una alta identidad con una beta-cetoacil-sintasa, reforzando que los oligonucleótidos diseñados amplifican el dominio KS. Mientras la secuencia de aminoácidos presenta una identidad del 48% con una policétido sintasa tipo I de *Streptomyces* spp. Y una identidad tridimensional con una 6-Desoxieritronolida B sintasa, un policétido sintasa tipo I responsable de la síntesis del anillo macrólido, que es precursor del antibiótico Eritromicina.

El uso de oligonucleótidos degenerados diseñados a partir de alineamientos de nucleótidos para regiones conservadas como el dominio DH y KS en las secuencias de actinobacterias analizadas es limitante, debido a que existe una gran diversidad genética en los policétidos sintasa.

Esta tesis contribuye al desarrollo de la investigación básica, con aportaciones para la búsqueda de microorganismos con capacidad de producir compuestos bioactivos como los policétidos en regiones poco exploradas como la Reserva de la Biosfera Tehuacán-Cuicatlán. Ya que podrían tener gran importancia para la industria farmacéutica como nuevos blancos terapéuticos para el desarrollo de nuevos fármacos.

10. Perspectivas

Llevar a cabo la secuenciación total del aislado 250 con el fin de detectar los dominios que componen el gen policétido sintasa. Además se propone realizar la identificación hasta género y especie de los 70 aislamientos de actinobacterias para poder diseñar estrategias útiles para conocer si presentan genes policétidos sintasa.

Probar los oligonucleótidos PKSC3F/PKSC3R diseñados para el dominio KS en *Streptomyces* ya identificados para corroborar la eficiencia.

Estudios adicionales se requieren para comprender y diseñar metodologías para la identificación de policétido sintasas. Este trabajo sirve como punto de partida para dichos análisis. Por ejemplo se puede evaluar la producción de policétidos utilizando HPLC-UV en las 70 actinobacterias identificadas.

11. ANEXOS

ANEXO A

Sitio	Fecha Muestreo	Georeferencia	Elevación (msnm)	Tipo de Población
1	11 septiembre 2014	18°20'49.2 N 97°26'55.5 W	1544	<i>N. tetetzo</i>
2	11 septiembre 2014	18°20'47.4 N 97°27'06.7 W	1517	<i>N. tetetzo</i> <i>N. mezcalaensis</i>
3	11 septiembre 2014	18°19'32 N 97°29'40.1 W	1538	<i>N. tetetzo</i>
4	30 enero 2016	18°31'15 N 97°53'18 W	1551	<i>N. macrocephala</i> <i>N. tetetzo</i>
5	30 enero 2016	18°27'10 N 97°51'73 W	1668	<i>N. macrocephala</i>
6	30 enero 2016	18°24'95 N 97°55'99 W	1796	<i>N. macrocephala</i>

Registro de datos de las zonas muestreadas.



Mapa con ubicación de los sitios muestreados en las dos épocas de año.

ANEXO B

Recolección de Muestras

Superficie de las cactáceas:



N. macrocephala



N. tetetzo



Suelo sin cobertura vegetal:



Rizosfera:



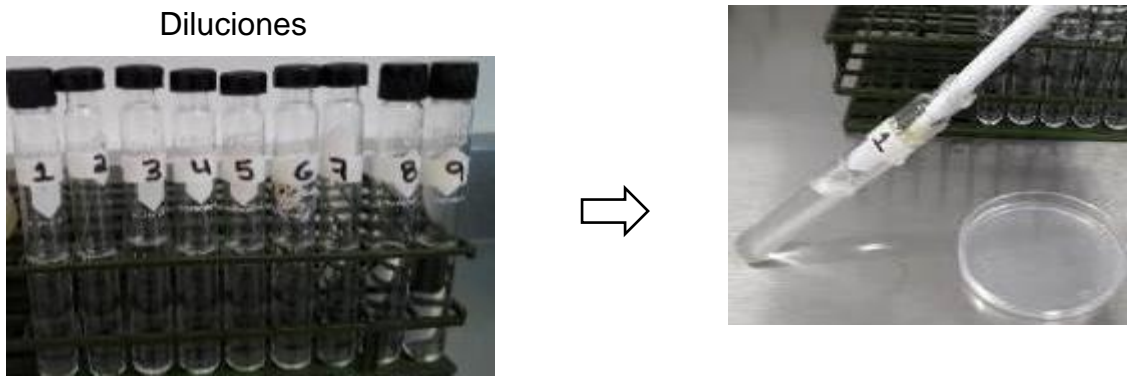
Barniz de la roca:



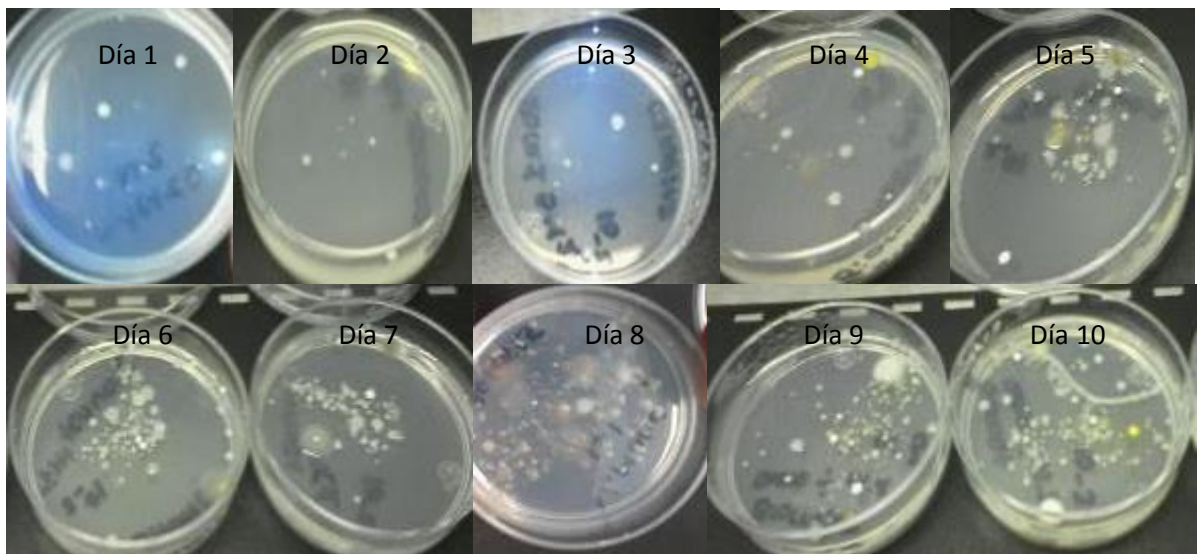
Biocrust o Cubiertas biológicas



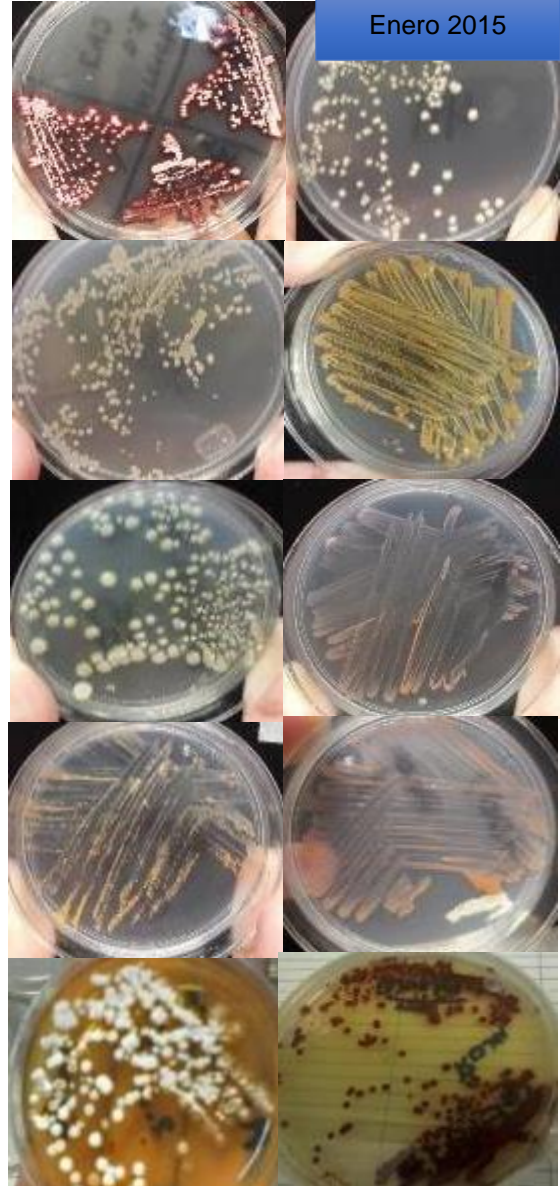
Aislamiento y cultivo de microorganismos



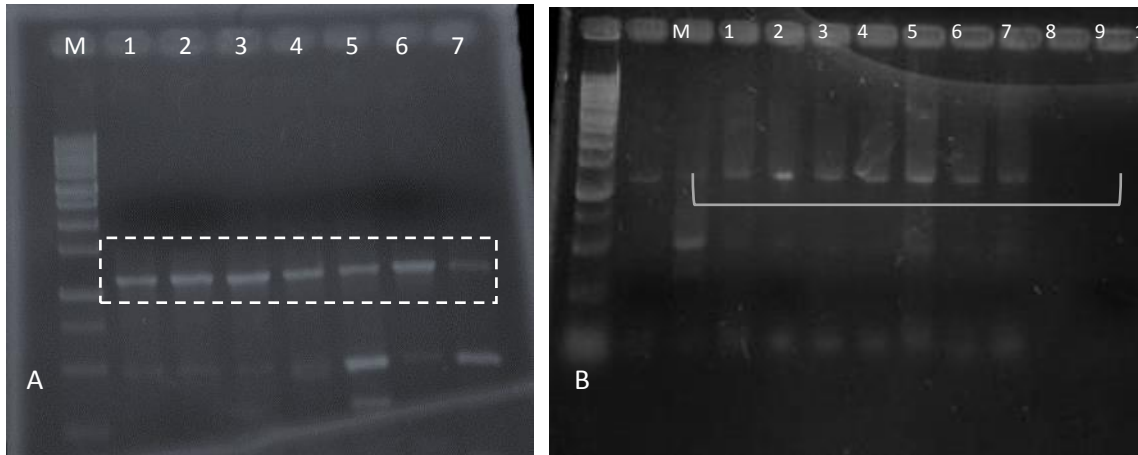
Cultivo



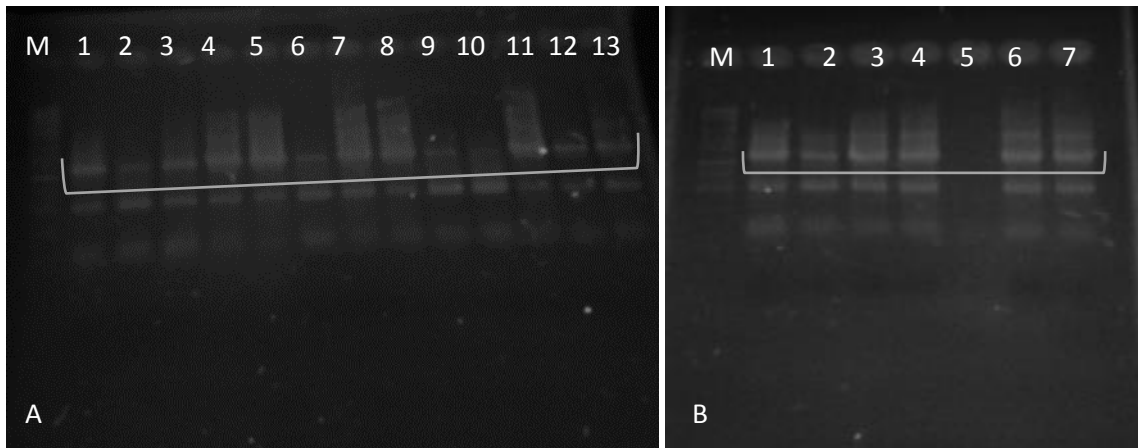
Purificación de las cepas



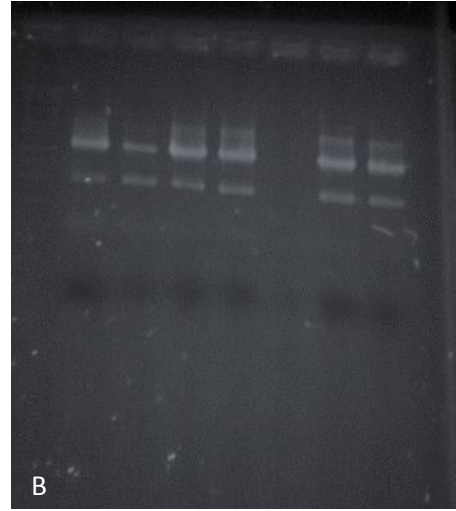
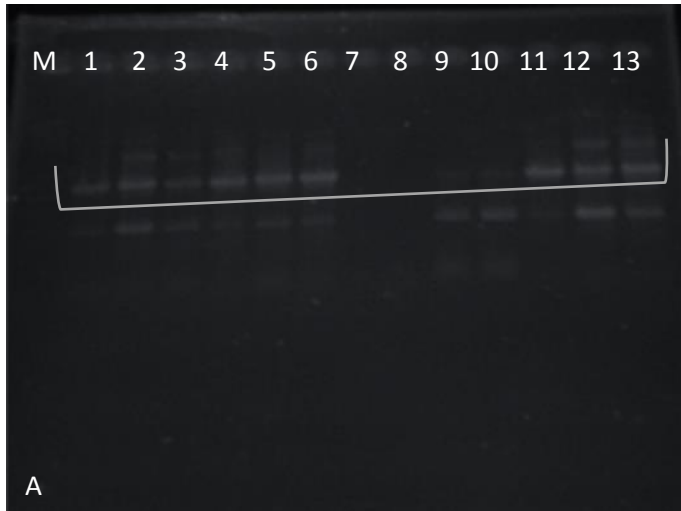
ANEXO C



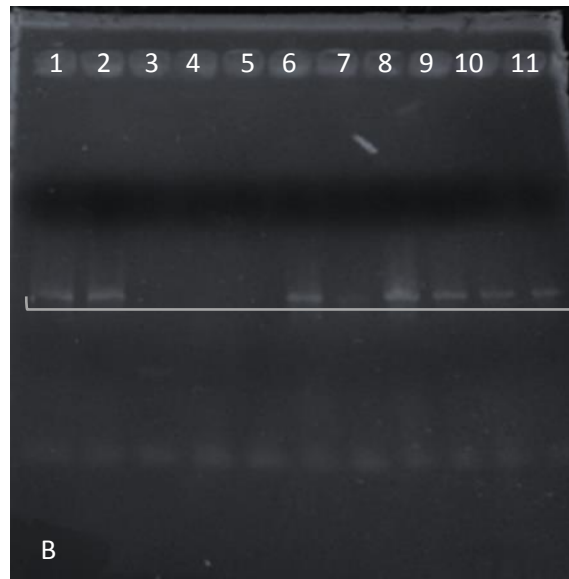
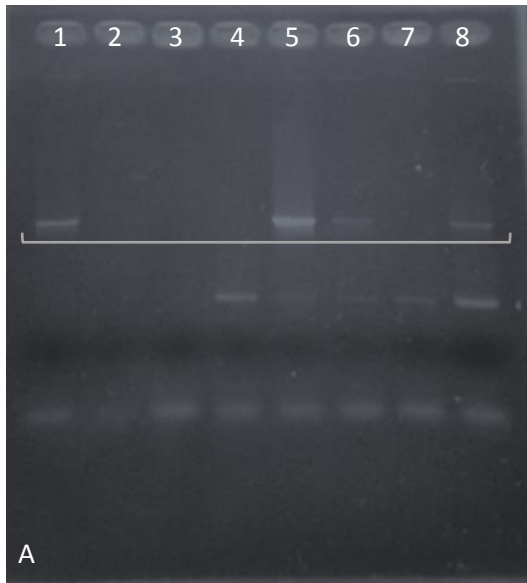
Gel de agarosa 1.5% con los productos de la amplificación del gen 16S ADN. A: Carriles, M: Marcador de peso 1Kb; 1: Cepa control (*Geodermatophilus*); 2: cepa 96; 3: Cepa 98; 4: cepa 73; 5: Cepa 75; 6: Cepa 72; 7: Cepa 121. B: M: Marcador de peso 1Kb; 1: Cepa control (*Geodermatophilus*); 2: cepa 125; 3: Cepa 130; 4: cepa 134; 5: Cepa 140; 6: Cepa 142; 7: Cepa 149; 8: Cepa 86; 9: Cepa 74; 10: Cepa 301; 11: Cepa 304.



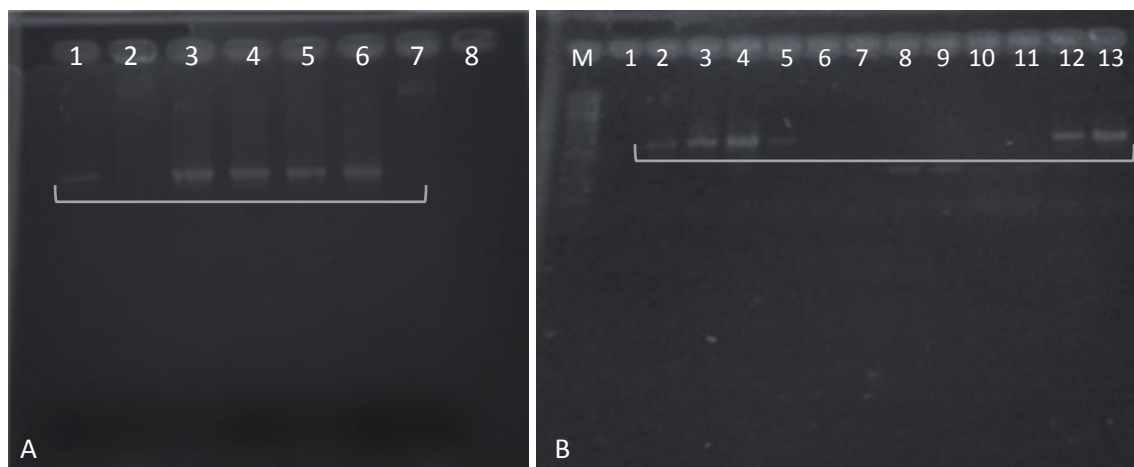
Gel de agarosa 1.5% con los productos de la amplificación del gen 16S ADN. A: Carriles, M: Marcador de peso 1Kb; 1: Cepa control (*Geodermatophilus*); 2: cepa 90; 3: Cepa 95; 4: cepa 100; 5: Cepa 102; 6: Cepa 103; 7: Cepa 104; 8: Cepa 105; 9: Cepa 107; 10: Cepa 151; 11: Cepa 159; 12: Cepa 160; 13: Cepa 162. B: M: Marcador de peso 1Kb; 1: Cepa control (*Geodermatophilus*); 2: cepa 167; 3: Cepa 170; 4: cepa 176; 5: Cepa 200; 6: Cepa 179; 7: Cepa 181.



Gel de agarosa 1.5% con los productos de la amplificación del gen 16S ADN. A: Carriles, M: Marcador de peso 1Kb; 1: Cepa control (*Geodermatophilus*); 2: cepa 183; 3: Cepa 185; 4: cepa 187; 5: Cepa 189; 6: Cepa 195; 7: Cepa 109; 8: Cepa 99; 9: Cepa 296; 10: Cepa 92; 11: Cepa 199; 12: Cepa 201; 13: Cepa 204. B: M: Marcador de peso 1Kb; 1: Cepa control (*Geodermatophilus*); 2: cepa 220; 3: Cepa 235; 4: cepa 232; 5: Cepa 150; 6: Cepa 280; 7: Cepa 270.



Gel de agarosa 1.5% con los productos de la amplificación del gen 16S ADN. A: Carriles, 1: Cepa control (*Geodermatophilus*); 2: cepa 301; 3: Cepa 262; 4: cepa 264; 5: Cepa 265; 6: Cepa 295; 7: Cepa 119; 8: Cepa 240; B: 1: Cepa control (*Geodermatophilus*); 2: cepa 242; 3: Cepa 180; 4: cepa 182; 5: Cepa 152; 6: Cepa 246; 7: Cepa 156; 8: Cepa 250; 9: Cepa 256; 10: Cepa 282; 11: Cepa 297.



Gel de agarosa 1.5% con los productos de la amplificación del gen 16S ADN. A: Carriles, 1: Cepa control (*Geodermatophilus*); 2: cepa 317; 3: Cepa 210; 4: cepa 209; 5: Cepa 347; 6: Cepa 219; 7: Cepa 80; 8: Cepa 40; B: Carriles, M: Marcador de peso 100pb; 1: Cepa 158; 2: cepa control (*Geodermatophilus*); 3: Cepa 345; 4: cepa 222; 5: Cepa 346; 6: Cepa 196; 7: Cepa 158; 8: Cepa 259; 9: Cepa 207; 10: Cepa 120; 11: Cepa 77; 12: Cepa 225; 13: Cepa 223.

CEPA	CEPA RELACIONADA/NUMERO GENBANK	IDENTIDAD %
36	<i>Streptomyces</i> sp.IISRBP/ KM361514.1	95%
75	<i>Williamsia deligens</i> / AJ920291.1	97%
121	<i>Arthrobacter</i> sp.SAS16/ KR401260.1	90%
125	<i>Blastococcus</i> sp.TPS357/ KM273129.1	77%
160	<i>Streptomyces hiroshimensis</i> /JF40086.1	97%
170	<i>Curtobacterium pusillum</i> DSM20527T/LN681569.1	97%
201	<i>Modestobacter</i> sp.SSW1-42/ FM995613.1	98%
204	<i>Modestobacter versicolor</i> / KC577584.1	71%
345	<i>Modestobacter</i> sp.MDVD1/ LN810545.1	84%
347	<i>Blastococcus</i> sp. BC517/AJ316572.1	74%

Resultados del análisis BLASTN de las secuencias del ADNr 16S de las cepas aisladas de actinobacterias.

12. Bibliografía

1. Abdelmohsen U, Yang C, Horn H, Hajjar D, Ravasi T & Hentschel U. 2014. Actinomycetes from Red Sea Sponges: Sources for Chemical and Phylogenetic Diversity. *Mar. Drugs*, Volumen (12), 2771-2789.
2. Ahmad S, Nazir R, Ahmad T & Ahmad F. 2013. Secondary metabolites of actinomycetes as potential source of antibiotics. *Stem Cell*, Vol 4(2).
3. Alt S & Wilkinson B. 2015. Biosynthesis of the Novel Macrolide Antibiotic Anthracimycin. *ACS Chem. Biol*, Volumen (10), 2468–2479.
4. Aminov, R. I. (2009). The role of antibiotics and antibiotic resistance in nature. *Environ Microbiol*, Volumen (11), 2970-2988.
5. Anand S & Mohanty D. 2012. Modeling holo-ACP: DH and holo-ACP: KR complexes of modular polyketide synthases: a docking and molecular dynamics study .*BMC Structural Biology*, Volumen (12).
6. Aparicio, J. F., R. Fouces, M. V. Mendes, N. Olivera & Martin J. 2000. A complex multienzyme system encoded by five polyketide synthase genes is involved in the biosynthesis of the 26-membered polyene macrolide pimaricin in *Streptomyces natalensis*. *Chem. Biol*, Volumen (7), 895–905.
7. Ayuso A & Genilloud O. 2004. New PCR Primers for the Screening of NRPS and PKS-I Systems in Actinomycetes: Detection and Distribution of These Biosynthetic Gene Sequences in Major Taxonomic Groups. Springer Science & Business Media, Inc. Volumen (49) ,10–24.
8. Ayuso A, Clark D, González I, Salazar O, Anderson A & Genilloud O. 2005. A novel actinomycete strain de-replication approach based on the diversity of polyketide synthase and nonribosomal peptide synthetase biosynthetic pathways. *Appl Microbiol Biotechnol*, Volumen (67),795–806
9. Baerson S & Rimando A. 2007. Chapter 1. A Plethora of Polyketides: Structures, Biological Activities and Enzymes. ACS.
10. Barrios J, Fernández F & Tomasini A. 2003. Microbial secondary metabolites production and strain improvement. *Indian J of Biotechnol*, Volumen (2), 322-333.
11. Becerril A, Freel K, Jensen P & Soria I. 2013. Marine Actinobacteria from the Gulf of California: diversity, abundance and secondary metabolite biosynthetic potential. *Antonie van Leeuwenhoek*, Volumen (103) ,809–819.
12. Biasini M, Bienert S, Waterhouse A, Arnold K, Studer G, Schmidt T, Kiefer F, Gallo T, Bertoni M, Bordoli L & Schwede T. 2014. SWISS-MODEL: modelling protein tertiary and quaternary structure using evolutionary information. *Nucleic Acids Research*, Volumen (42).
13. Boddy C. 2013. Bioinformatics tools for genome mining of polyketide and non- ribosomal peptides. *J Ind Microbiol Biotechnol*.
14. Bode H & Muller R. 2003. Possibility of bacterial recruitment of plant genes associated with the biosynthesis of secondary metabolites. *Plant Physiol*, Volumen 132,1153–1161.

15. Braña A, Fiedler H, Nava H, González V, Sarmiento A, Molina A, Acuña J & García L. 2015. Two *Streptomyces* Species Producing Antibiotic, Antitumor, and Anti-Inflammatory Compounds Are Widespread Among Intertidal Macroalgae and Deep-Sea Coral Reef Invertebrates from the Central Cantabrian Sea, *Microb Ecol*, Volumen (69) ,512–524.
16. Bundale S, Begde D, Nashikkar N, Kadam T & Upadhyay A. 2014. Isolation of Aromatic Polyketide Producing Soil *Streptomyces* Using Combinatorial Screening Strategies, *Biomed Res Int*, 549737.
17. Bustillos M. 2014. Culturable facultative methylotrophic bacteria from the cactus *Neobuxbaumia Macrocephala*. Instituto de Ciencias, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.
18. Caffrey P. 2012. Dissecting complex polyketide biosynthesis. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, Volumen (3), 4
19. Castro J, Razmilic V, Gomez J, Andrews B, Asenjo J & Bibbb M. 2015. Identification and Heterologous Expression of the Chaxamycin Biosynthesis Gene Cluster from *Streptomyces leeuwenhoekii*. *Applied and Environmental Microbiology*.
20. Challis G & Hopwood D. 2003. Synergy and contingency as driving forces for the evolution of multiple secondary metabolite production by *Streptomyces* species, *Proc Natl Acad Sci U S A*, Volumen (100) ,14555-14561.
21. Challis G. 2014. Exploitation of the *Streptomyces coelicolor* A3 (2) genome sequence for discovery of new natural products and biosynthetic pathways. *J Ind Microbiol Biotechnol*, Volumen (41), 219–232.
22. Chater F & Chandra G. 2006. The evolution of development in *Streptomyces* analysed by genome comparisons. *Federation of European Microbiological Societies, FEMS microbiology reviews*, Volumen (30), 651–672.
23. Chen C, Huang C, Lee H, Tsai H & Kirby R. 2002. Once the circle has been broken: dynamics and evolution of *Streptomyces* chromosomes, *Trends Genet*, Volumen (18), 522-9.
24. Choulet F, Aigle B, Gallois A, Mangenot S, Gerbaud C, Truong C, Francou F, Fourrier C, Gue´rinea M, Decaris B, Barbe V, Pernodet J & Leblond P. 2006. Evolution of the Terminal Regions of the *Streptomyces* Linear Chromosome, *Mol. Biol. Evol*, Volumen (23), 2361–2369.
25. Cruz P, Giarola L, Morales S, Silva D, Marcon J, Azevedo J, Araújo W & Oliveira L. 2005. Triagem metabólica por PKS e NRPS en actinobactérias endofíticas de *citrus reticulata*, *Quim. Nova*, Volumen (38), 333-341.
26. Cummings M, Breitling R & Takano E. 2014. Steps towards the synthetic biology of polyketide biosynthesis, *FEMS Microbiol Lett*, Volumen 351, 116–125.
27. Demian A & Fang A. 2000. The natural functions of secondary metabolites. *Adv Biochem Eng Biotechnol*, Volumen (69) ,1-39.
28. Dong S & Nam C. 2014. *Nocardioides opuntiae* sp. nov., isolated from soil of a cactus. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, Volumen (64), 2094–2099.

29. El-Tarabily K & Sivasithamparam K .2006. Non-streptomycete actinomycetes as biocontrol agents of soil-borne fungal plant pathogens and as plant growth promoters. *Soil Biology and Biochemistry*. United Arab Emirates, Volumen (38) ,1505–1520.
30. El-Tarabily K. 2008. Promotion of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) plant growth by rhizosphere competent 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid deaminase-producing streptomycete actinomycetes. *Plant Soil*. United Arab Emirates, Volumen (308) ,161–174.
31. Fenga Z, Kallifidasa D & Bradya S. 2011. Functional analysis of environmental DNA-derived type II polyketide synthases reveals structurally diverse secondary metabolites. *PNAS*. Volumen (108) ,12629–12634.
32. Fogli L.2014. Systems biology approaches to secondary metabolites and metabonomics. The new york Academy of Sciences.
33. Franco M. 2009. Utilización de los actinomicetos en procesos de biofertilización, *Rev. peru. Biol*, Volumen (16), 239 – 242.
34. García F. 1991. Influencia de la dinámica del paisaje en la distribución de las comunidades vegetales en la Cuenca del río Zapotitlán. Puebla. Universidad Nacional Autónoma de México, Instituto de Geografía, *Investigaciones Geográficas*, Volumen (23), 53-70.
35. Ghai R, Megumi C, Rodriguez F, Picazo A & Camacho A. 2013. Metagenomic sun covers a new group of low GC and ultra-small marine Actinobacteria. *Scientific reports*, Volumen (3), 2471.
36. Ginolhac A, Jarrin C, Gillet B, Robe P, Pujic P, Tuphile K, Bertrand H, Vogel T, Perrière, G, Simonet P & Nalin R. 2004. Phylogenetic Analysis of Polyketide Synthase I Domains from Soil Metagenomic Libraries Allows Selection of Promising Clones, *Applied and environmental microbiology*, 5522–5527.
37. Gontang E, Gaudeñcio S, Fenical W & Jensen P. 2010. Sequence-Based Analysis of Secondary-Metabolite Biosynthesis in Marine Actinobacteria. *Applied and environmental microbiology*, 2487–2499.
38. Goodfellow, M. and Williams, S.T. 1983. Ecology of actinomycetes. *Annu. Rev. Microbiol*, Volumen (37) ,189–216.
39. Gtari M, Essoussi I, Maaoui R, Sghaier H, Boujmil R, Pujic R, Brusetti L, Chouaia B, Crotti E, Daffonchio D, Boudabous A & Normand P. 2012. Contrasted resistance of stone-dwelling Geodermatophilaceae species to stresses known to give rise to reactive oxygen species, *FEMS Microbiol. Ecol*, Volumen (80).
40. Guo X, Liu N, Li X, Ding Y, Shang F, Gao Y, Ruan J & Huang Y. 2015. Red Soils Harbor Diverse Culturable Actinomycetes That Are Promising Sources of Novel Secondary Metabolites. *Applied and Environmental Microbiology*. Volumen (81).
41. Hopwood, D. 2004. Cracking the polyketide code. *Plos Biology*, Volumen (2), 0166.
42. Jensen P, Williams P, Chan D, Zeigler L & Fenical W. 2007. Species-Specific Secondary Metabolite Production in Marine Actinomycetes of the Genus *Salinispora*, *Appl. Environ. Microbiol*, Volumen (73), 1146–1152.

43. Kakavas S, Katz L, Stassi D. 1997. Identification and Characterization of the Niddamycin Polyketide Synthase Genes from *Streptomyces caelestis*. *Journal of Bacteriology*. Volumen (179), 7515–7522
44. Kaluzhnaya O, Kulakova N & Itskovic B. 2012. Diversity of Polyketide Synthase (PKS) Genes in Metagenomic Community of Freshwater Sponge *Lubomirskia baicalensis*. *Molecular Biology*, Volumen (46).
45. Katz, L. & S. Donadio 1993. "Polyketide synthesis: prospects for hybrid antibiotics.". *Annu. Rev. Microbiol*, Volumen (47), 875-912.
46. Keatinge A. 2008. Crystal structure of the Erythromycin polyketide synthase dehydratase. *J Mol Biol*, Volumen (384), 941-953.
47. Kodama H, Sandmann A, Muller R & Dittmann E. 2005. Evolutionary Implications of Bacterial Polyketide Synthases. *Mol. Biol. Evol*, Volumen (22), 2027–2039.
48. Kouadri F, Aboudi A & Horani K. 2014. Antimicrobial activity of *Streptomyces* sp. isolated from the gulf of Aqaba-Jordan and screening for NRPS, PKS-I, and PKS-II genes. *Afr. J. Biotechnol*, Volumen (13), 3505-3515.
49. Kroken, S., N. L. Glass, J. W. Taylor, O. C. Yoder & Turgeon B. 2003. Phylogenomic analysis of type I polyketide synthase genes in pathogenic and saprobic ascomycetes. *Proc. Natl. Acad. Sci, USA*, Volumen (100), 15670–15675.
50. Lechevalier, M. 1989. Actinomycetes with multilocular sporangia *In* *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 1708–1715. 4 (edited by Williams, Sharpe and Holt). Williams & Wilkins, Baltimore, pp. 2405–2410.
51. Lee L, Zainal N, Azman A, Kee S, Goh B, Yin W, AbMutalib N, Chan K. 2014. Diversity and Antimicrobial Activities of Actinobacteria Isolated from Tropical Mangrove Sediments in Malaysia, *The Scientific World Journal*.
52. Li J, Dong J, Luo X, Yang J & Zhang S. 2014. Detection of polyketide synthase and nonribosomal peptide synthetase biosynthetic genes from antimicrobial coral associated actinomycetes. *Antonie van Leeuwenhoek*, Volumen (106), 623–635.
53. Liu Q, Liu C, Yu J, Yan J & Qi X. 2012. Analysis of the Ketosynthase Genes in *Streptomyces* and Its Implications for Preventing Reinvestigation of Polyketides with Bioactivities, *Journal of Agricultural Science*, Volumen (4).
54. Lohmana J, Maa M, Osipiukb J, Nocekb B, Kimb Y, Changb C, Cuffb M, Mackb J, Bigelowb L, Lib H, Endresb M, Babniggb G, Joachimiakb A, Phillips G & Shena B. 2015. Structural and evolutionary relationships of “AT-less” type I polyketide synthase ketosynthases. *PNAS*, Volumen (41) ,12693–12698.
55. López F, Muñoz D, Hernández M, Soler A, Castillo M & Hernández I. 2003. Análisis integral de la toposecuencia y su influencia en la distribución de la vegetación y la degradación del suelo en la Subcuenca de Zapotitlán Salinas, Puebla, *Boletín de la Sociedad Geologica Mexicana*, Volumen (1), 19-41.
56. Lopez J. 2003. Naturally mosaic operons for secondary metabolite biosynthesis: variability and putative horizontal transfer of discrete catalytic domains of the epothilone polyketide synthase locus. *Mol. Genet. Genomics*, Volumen (270), 420–431.
57. Lu Z & Zhang W. 2012. Comparative Phylogenies of Ribosomal Proteins and the 16S rRNA Gene at Higher Ranks of the Class Actinobacteria. *Curr Microbiol*, Volumen (65) ,1–6.

58. Madigan M & Parker J. 2006. Brock Biología de los Microorganismos. Madrid, Pearson Prentice Hall.
59. Mariano A. 2009. Herramientas para el mejoramiento genético de *S. violaceusniger* YCED-9 enfocadas a la producción de metabolitos secundarios. Centro de Investigación en Biotecnología Aplicada.
60. Martín J & Liras P. 1989. Organization and expression of genes involved in the biosynthesis of antibiotics and other secondary metabolites. *Annu Rev Microbiol*, Volumen (43), 173-206.
61. Metsä-Ketela M, Halo L, Munukka E, Hakala J, Mañntsañlañ P & Ylihonko K. 2002. Molecular Evolution of Aromatic Polyketides and Comparative Sequence Analysis of Polyketide Ketosynthase and 16S Ribosomal DNA Genes from Various *Streptomyces* Species. *Applied and Environmental Microbiology*, Volumen (68), 4472–4479.
62. Migita A, Watanabe M, Hirose Y, Watanabe K, Tokiwano T, Kinashi H & Oikawa H. 2009. Identification of a Gene Cluster of Polyether Antibiotic Lasalocid from *Streptomyces lasaliensis*. *Biosci. Biotechnol. Biochem*, Volumen (73), 169–176.
63. Miranda F & Hernández E. 1963. Los tipos de vegetación de México y su clasificación. *Boletín de la Sociedad Botánica de México*, Volumen (28), 29-179.
64. Moffitt M & Neilan B. 2003. Evolutionary affiliations within the superfamily of ketosynthases reflect complex pathway associations. *J. Mol. Evol*, Volumen (56), 446–457.
65. Nair D, Anand, Verma P, Mohanty D & Gokhale R. 2012. Genetic, biosynthetic and functional versatility of polyketide synthases. *Current Science*, Volumen (102).
66. Ochman H, Lawrence J, Groisman E. 2000. Lateral gene transfer and the nature of bacterial innovation. *Nature*, Volumen (405), 299-304.
67. Okoro C, Brown R, Jones A, Andrews B, Asenjo J, Goodfellow M & Bull A. 2009. Diversity of culturable actinomycetes in hyper-arid soils of the Atacama Desert, Chile. *Antonie van Leeuwenhoek*, Volumen (95), 121-133.
68. Okoro C, Bull A, Mutreja A, Rong X, Huang Y & Goodfellow M. 2010. *Lechevalieria atacamensis* sp. nov., *Lechevalieria deserti* sp. nov. and *Lechevalieria roselyniae* sp. nov., isolated from hyperarid soils. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, Volumen (60), 296-300.
69. Osorio O, Banuet, A, Dávila P & Medina R. 1996. Tipos de vegetación y diversidad en el Valle de Zapotitlán de las Salinas, Puebla, México. *Boletín de la Sociedad Botánica de México*, Volumen (59), 35-58.
70. Parés R, Juárez A. 1997. Bioquímica de los microorganismos. Barcelona: Editorial reverté S.A.
71. Parsley L, Linneman J, Goode A, Becklund K, George I, Goodman R, Lopanik N, Liles M. 2012. Polyketide synthase pathways identified from a metagenomic library are derived from soil Acidobacteria. *FEMS Microbiol Ecol*, Volumen (78), 176–187.
72. Peng Z, Zheng Y, You Y, Yan X, Shao J. 2009. Molecular Phylogeny and Modular Structure of Hybrid NRPS/PKS Gene Fragment of *Pseudoalteromonas* sp. NJ6-3-2 Isolated From Marine Sponge *Hymeniacidon perleve*, *J. Microbiol. Biotechnol.* (19), 229–237.

73. Penn K, Jenkins C, Nett M, Udway D, Gontang E, McGlinchey R, Foster B, Lapidus A, Podell S, Allen E, Moore B, Jensen P. .2009. Genomic islands link secondary metabolism to functional adaptation in marine Actinobacteria. ISME J, Volumen (3), 1193–1203.
74. Qing X, Jiao W, Jiang B, Yuan W, Hong T, Hao S. 2009. Screening and identification of actinobacteria from marine sediments: Investigation of potential producers for antimicrobial agents and type I polyketides. World J Microbiol Biotechnol, Volumen (25), 859–866.
75. Qui P, Feng Z, Tian J, Lei Z, Wang L, Zeng Z, Chu Y & Tian Y. 2015. Diversity, bioactivities, and metabolic potentials of endophytic actinomycetes isolated from traditional medicinal plants in Sichuan, China. Chin J Nat Med, 942-53.
76. Rodríguez V, Morlett J, & Balagurusamy N. 2015. Activation of Silent Secondary Metabolite Genes of Streptomyces to Obtain New Antibiotics. AQM, Volumen (13).
77. Ruan X, Pereda A, Stassi D, Zeidner D, Summers R, Jackson M, Shivakumar A, Kakavas S, Staver M, Donadio S & Katz L. 1997. Acyltransferase Domain Substitutions in Erythromycin Polyketide Synthase Yield Novel Erythromycin Derivatives, Journal of bacteriology, 6416–6425.
78. Rzedowski J. 1978. *Vegetación de México*. Limusa, México, 417.
79. Saker R, Meklat A, Bouras N, Zitouni A, Mathieu F, Spröer C, Klenk H & Sabaou N. 2015. Diversity and antagonistic properties of culturable halophilic actinobacteria in soils of two arid regions of septentrional Sahara: M'zab and Zibans. Ann Microbiol, Volumen (65), 2241–2253.
80. Sánchez A & Olivares T. 2013. Una mirada a los organismos fúngicos: Fábricas versátiles de diversos metabolitos secundarios de interés biotecnológico. Revista Química Viva. Volumen 2.
81. Sánchez J. 2006. Las interacciones microbianas su importancia para el suelo y la agricultura.
82. Santhanam R, Okoro C, Rong X, Huang Y, Bull A, Yeon H, Andrews B, Asenjo J & Goodfellow M. 2012. Streptomyces atacamensis sp. nov., isolated from an extreme hyper-arid soil of the Atacama Desert, Chile. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, Volumen (62), 2680–2684.
83. Savic M & Vasiljevic B. 2006. Targeting polyketide synthase gene pool within actinomycetes: new degenerate primers. J Ind Microbiol Biotechnol, Volumen (33), 423–430.
84. Schneemann I, Nagel K, Kajahn I, Labes A, Wiese J & Imhoff J. 2010. Comprehensive Investigation of Marine *Actinobacteria* Associated with the Sponge *Halichondria panicea*. Applied and Environmental Microbiology, Volumen (76), 3702–3714.
85. Schwede T, Kopp J, Guex N & Peitsch M. 2003. SWISS-MODEL: an automated protein homology-modeling server. Nucleic Acids Research, Volumen (31) 3381–3385.

86. SEMARNAP (Secretaría de Medio Ambiente, Recursos Naturales y Pesca) 1998. Decreto por el que se declara área natural protegida, con el carácter de Reserva de la Biósfera, la región denominada Tehuacán-Cuicatlán, ubicada en los estados de Oaxaca y Puebla. Diario Oficial de la Federación. Viernes 18 de septiembre de 1998, México, 8-20.
87. Shao L, Zi J, Zeng J & Zhan J. 2012. Identification of the herboxidiene biosynthetic gene cluster in *Streptomyces chromofuscus*. Appl. Environ. Microbiol.
88. Shen B. 2003. Polyketide biosynthesis beyond the type I, II and III polyketide synthase paradigms. Current Opinion in Chemical Biology, Volumen (7), 285–295.
89. Shinwari M, Ali S, Ara I & Wainwright M. 2013. Evaluation of antibiotic producing genes in *Streptomyces* isolated from a desert environment of Saudi Arabia. Life Science Journal, Volumen (10).
90. Soares E, Schuch & Macedo E. 2013. Biotechnology of polyketides: New breath of life for the novel antibiotic genetic pathways discovery through metagenomics. Brazilian Journal of Microbiology, Volumen (44), 1007-1034.
91. Song J, Dong X, Jiao B, Wang L. 2013. Directly accessing the diversity of bacterial type I polyketide synthase gene in Chinese soil and seawater. Afr. J. Microbiol. Res, Volumen (7), 4065-4072.
92. Stach J, Maldonado L, Ward A, Goodfellow M, Bull A. 2003. New primers for the class Actinobacteria: application to marine and terrestrial environments. Environ Microbiol, Volumen (5), 828–841.
93. Staunton J & Weissman K. 2001. Polyketide biosynthesis: a millennium review. 2001. Nat. Prod. Rep, Volumen (18), 380–416.
94. Sun W, Sheng C, Zhao Y & Li Z. 2012. Functional Gene-Guided Discovery of Type II Polyketides from Culturable Actinomycetes Associated with Soft Coral *Scleronephthya sp*, PLoS ONE, Volumen (7).
95. Te Poele E, Bolhuis H & Dijkhuizen L. 2008. Actinomycete integrative and conjugative elements. Antonie van Leeuwenhoek, Volumen (94) ,127–143.
96. Thanapipatsiri A, Gomez J, Song Lijiang, Bibb M, Al-Bassam M, Chandra G, Thamchaipenet A, Challis G, Bibb M. 2016. Discovery of Unusual Biaryl Polyketides by Activation of a Silent *Streptomyces venezuelae* Biosynthetic Gene Cluster. ChemBioChem, Volumen (17), 1 – 11.
97. Tokala R, Strap J, Jung C, Crawford D, Hamby M, Deobald L, Franklin J & Morras M. 2002. Novel plant-microbe rhizosphere interaction involving *Streptomyces lydicus* WYEC108 and the pea plant (*Pisum sativum*). Applied and Environmental Microbiology, Volumen (68), 2161–2171.
98. Trindade A, Rua C, Andrade B, Paulo A, Silva G, Berlinck R, Thompsonb F. 2012. Polyketide Synthase Gene Diversity within the Microbiome of the Sponge *Arenosclera brasiliensis*, Endemic to the Southern Atlantic Ocean. Applied and Environmental Microbiology, Volumen (79), 1598–1605.
99. Ventura M, Canchaya C, Fitzgerald G, Tauch A, Chater K, Chandra G & Sinderen D. 2007. Genomics of *Actinobacteria*: Tracing the Evolutionary History of a Ancient Phylum. Microbiol. Mol. Biol. Rev. Volumen (71), 495–548

100. Villaseñor J, Dávila P & Chiang F.1990. Fitogeografía del Valle de Tehuacán-Cuicatlán. Boletín de la Sociedad Botánica de México, Volumen (50),135-149.
101. Vining L.1992. Secondary metabolism, inventive evolution and biochemical diversity: *Gene*, Volumen (115) ,135-140.
102. Watve M, Tickoo R, Jog M & Bhole B. 2001. How many antibiotics are produced by the genus *Streptomyces*? *Archives of Microbiology*, Volumen (176) 386–390.
103. Wawrik B, Kerkhof L, Zylstra G & Kukor J. 2005. Identification of Unique Type II Polyketide Synthase Genes in Soil .*Applied and Environmental Microbiology*, 2232–2238.
104. Zavala J & Hernández G. 1998. Estudios de caracterización y diagnóstico del área propuesta como Reserva de la Biósfera Tehuacán-Cuicatlán. Universidad Autónoma Metropolitana-Instituto Nacional de Ecología (SEMARNAP). Reporte Técnico.
105. Zavala J. 1982. Estudios ecológicos en el valle semiárido de Zapotilán, Puebla. Clasificación numérica de la vegetación basada en atributos binarios de presencia y ausencia de las especies. *Biotica*, Volumen (7), 99-119.
106. Zhong X, Tian Y, Niu G & Tan H. 2013. Assembly and features of secondary metabolite biosynthetic gene clusters in *Streptomyces ansochromogenes*, *Sci China Life Sci*, Volumen (56).
107. Ziemert N, Lechner A, Wietz M, Millan N, Chavarria K & Robert P. 2014. Diversity and evolution of secondary metabolism in the marine actinomycete genus *Salinispora*. *PNAS*, Volumen (111), E1130