



Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C.

Posgrado en Ciencias Biológicas

**IDENTIFICACIÓN MOLECULAR Y EVALUACIÓN  
ANTI-CANDIDA DE CEPAS DE *STREPTOMYCES*  
AISLADAS DE SUELOS DEL TRÓPICO MEXICANO,  
CULTIVADAS EN DIFERENTES FUENTES DE  
CARBONO Y NITRÓGENO**

Tesis que presenta:

DIANA YAMILY ESCALANTE RÉNDIZ

En opción al título de:

DOCTOR EN CIENCIAS

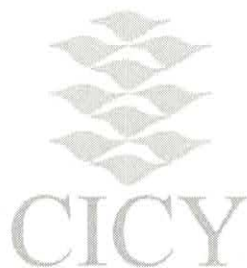
(Ciencias Biológicas: Opción Biotecnología)

Mérida, Yucatán, México

2020



*CENTRO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA DE YUCATÁN, A. C.*  
*POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS*



**RECONOCIMIENTO**

Por medio de la presente hago constar que el trabajo de tesis de Diana Yamily Escalante Réndiz, titulado “**Identificación molecular y evaluación anti-*Candida* de cepas de *Streptomyces* aisladas de suelos del trópico mexicano, cultivadas en diferentes fuentes de carbono y nitrógeno**”, fue realizado en el Laboratorio de Productos Naturales de la Unidad de Biotecnología, en la línea de Agrobiotecnología, y en el Grupo de Estudios Moleculares Aplicados a la Biología (GeMBio) del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., bajo la dirección de la Dra. María Marcela Gamboa Angulo y el Dr. Raúl Tapia Tussell, dentro de la opción de Biotecnología perteneciente al Programa de Posgrado en Ciencias Biológicas de este Centro.

Atentamente:

---

Dra. Cecilia Hernández Zepeda  
Directora de Docencia

Mérida, Yucatán, México, a 12 de marzo de 2020.



## **DECLARACIÓN DE PROPIEDAD**

Declaro que la información contenida en la sección de Materiales y Métodos Experimentales, los Resultados y Discusión de este documento proviene de las actividades de experimentación realizadas durante el período que se me asignó para desarrollar mi trabajo de tesis, en las Unidades y Laboratorios del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., y que a razón de lo anterior y en contraprestación de los servicios educativos o de apoyo que me fueron brindados, dicha información, en términos de la Ley Federal del Derecho de Autor y la Ley de la Propiedad Industrial, le pertenece patrimonialmente a dicho Centro de Investigación. Por otra parte, en virtud de lo ya manifestado, reconozco que de igual manera los productos intelectuales o desarrollos tecnológicos que deriven o pudieran derivar de lo correspondiente a dicha información, le pertenecen patrimonialmente al Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., y en el mismo tenor, reconozco que si derivaren de este trabajo productos intelectuales o desarrollos tecnológicos, en lo especial, estos se regirán en todo caso por lo dispuesto por la Ley Federal del Derecho de Autor y la Ley de la Propiedad Industrial, en el tenor de lo expuesto en la presente Declaración.



Diana Yamily Escalante Réndiz



Este trabajo se llevó a cabo en la Unidad de Biotecnología del Centro de Investigación Científica de Yucatán, bajo la dirección de la Dra. Marcela Gamboa Angulo y el Dr. Raúl Tapia Tussell.





## **AGRADECIMIENTOS**

Al Programa para el Desarrollo Profesional Docente (PRODEP) de la Secretaría de Educación Pública, por la beca otorgada en apoyo a mis estudios de doctorado.

A la Universidad Autónoma de Yucatán (UADY), por haberme otorgado la licencia para realizar el posgrado. De manera especial al Dr. Rafal Rojas Herrera por todo su apoyo y amistad.

Un especial agradecimiento a la Dra. Marcela Gamboa Angulo, por su asesoría, paciencia y por brindarme todos los recursos necesarios para realizar este proyecto y concluir mi posgrado.

Agradezco al Dr Raúl Tapia Tussell, por su asesoría, por todos sus consejos, paciencia y compartirme sus conocimientos de biología molecular para la realización del trabajo.

A mi comité tutorial, la Dra. Susana de la Rosa García, Dra. Cecilia Rodríguez García, Dra. Marcela Gamboa Angulo, Dr. Raúl Tapia Tussell, por todas sus aportaciones que a lo largo del proyecto enriquecieron la investigación.

De igual manera, agradezco a los doctores que formaron parte del H. Comité de Revisión, Dra. Daisy Pérez Brito, Dra. Alejandra Prieto Davó, Dra. Susana de la Rosa García, Dra. Marcela Gamboa Angulo, Dr. Sergio R. Peraza Sánchez, Dr. Felipe Barahona Pérez y al Dr. Raúl Tapia Tussell, por todos sus comentarios que permitieron la mejora del manuscrito.

Agradezco entrañablemente al M. en C. Jesús Martín, de la Fundación Medina en Granada, España, por todo el apoyo que me brindó en los conocimientos de cromatografía líquida acoplada a masas (LC-MS).

A la Dra. Daisy Pérez Brito, por todas las facilidades que me otorgó durante mi estancia en el Laboratorio del Grupo de Estudios Moleculares Aplicados a la Biología (GeMBio).

A la Q.I. Leticia Medina Baizabal, por todo su apoyo técnico y paciencia en las técnicas que utilicé en el Laboratorio de Productos Naturales, sobre todo por su amistad. Te quiero mucho Lety.

Al I.Q.I. Alberto Cortés Velázquez, por la capacitación que me brindó en las técnicas de biología celular y por su amistad.

A la L.A.E. Bertha Arely Ramírez González, por su apoyo en el formato electrónico del documento de la tesis.

Al Ing. Rangel Gamboa Canché, por toda su ayuda en la realización de la adecuación del formato electrónico.

Al Q.I. Carlos Vera Pech, por brindarme sus conocimientos de química y mecanismos de reacción y por su gran apoyo incondicional. Si no fuera por ti no hubiera aprobado fitoquímica. Te estaré infinitamente agradecida. Gracias teacher.

A la M. en C. Teresita Valencia Yah por compartirme sus conocimientos en las técnicas de biología molecular y porque se convirtió en una de mis mejores amigas.

Al Dr. Anuar Magaña, por su gran ayuda durante mi estancia en el Laboratorio de GeMBio.

A mis maestros, Dra. Marcela Gamboa Angulo, Dra. Blondy Canto Canché, Dra. Cecilia Rodríguez García, Dr. Sergio R. Peraza Sánchez, Dr. Luis Manuel Peña Rodríguez, Dr. Felipe Sánchez Teyer, Dr. Luis Sáenz Carbonell y al Dr. Felipe Vázquez Flota, por compartirme sus conocimientos.

Agradezco afectuosamente a todos mis amigos del Laboratorio de Productos Naturales, por su invaluable amistad y por las aventuras convividas: Marilem Rodríguez , Leticia Medina (Lety), Tania Godoy, Jesús Avilés (Chucho), Andrés Yam, Dayvi Salazar, Syndel Concha, Demetrio Aragon (Demi), Horacio Larqué, Leonor Vila, Lía Valencia y Anita Carrillo.

A mis compañeros del laboratorio de GeMBio, que por el tiempo convivido llegamos a ser una familia: Yasmín Sánchez, Jonathan Río, Sandy Guardia (Sandybel), Alberto Cauich (Beto Rejón), Edgar Olguín (Dr), Isabel García (compañerita), Alberto Cortés (Beto), Andrés Quijano (Maestro Andrés), Angel Nexticapan (Inge. Ángel) y Rodolfo Martín (Rodro).

A Roger Sulub Tun, por su amistad y su ayuda hasta en el último momento.

Y a todas esas personas maravillosas que conocí a lo largo de estos años durante mi estancia en el CICY y que se convirtieron en mis amigos: Juan Andrés (Mau), Lizandro Mendoza, Diana Jacinto, Ernesto Canto (Neto), Edder Darío (el Jalapeño), Jair Díaz, Karla Castro (Karlita), Evelyn Carrillo, Gaby Medina, Gaby Flores, Jorgito Espadas, Luisito Torres, Carlos Castañeda (gordito), Carlos Castillo (flaquito).

A Landy Rodríguez, Alejandra Arceo, Nancy Sulub y a Liligelia García Cano por su amabilidad y actitud de servicio en los tramites durante estos cinco años en el CICY.

Tengo a tantas personas que agradecer que espero que no se me haya olvidado ninguna.

Pero sobre todo a ti por tu sonrisa y palabras de aliento.

Muchas, pero muchas gracias a todos.



## DEDICATORIAS

Se lo dedico primeramente a Dios, por todas sus bendiciones y salud que otorgó en todos estos años a mi familia y a mí, sin sus cuidados no hubiera podido alcanzar esta meta, “A Él sea la honra y la gloria”.

A mi esposo Máximo Paredes Rodríguez, por todo su amor, su paciencia, su comprensión y apoyo incondicional. Porque estuviste ahí tanto en las buenas y en las malas durante estos cinco años, siempre brindándome palabras de aliento, por el cuidado que le diste a nuestra princesa en mis ausencias. Gracias por ser mi compañero.

A mi hija Alejandra Yamily Paredes Escalante, por su cariño, comprensión, por su perdón ante mis ausencias, por sus palabras de aliento hasta el último momento. Espero ser para ti un ejemplo de que podemos lograr todo lo que nos proponemos. Te amo mi princesa, nunca lo olvides.

A mi madre Norma Rendis Fuentes, por su ejemplo de lucha constante, de superación personal, sin sus oraciones de cada día, no hubiera podido llegar a esta meta. Muchas gracias mami.

A mi hermana Grettel Escalante Rendis, por haber estado conmigo siempre, por su apoyo a mi familia, especialmente a mi hija. Gracias por quererla tanto.

Te lo dedico a ti por todo tu cariño.



ÍNDICE

LISTADO DE FIGURAS .....	III
LISTADO DE CUADROS .....	V
INTRODUCCIÓN .....	1
CAPITULO I ANTECEDENTES .....	5
1.1 ACTINOMICETOS .....	5
1.1.1 Generalidades .....	5
1.1.2 Diversidad e importancia del metabolismo biosintético de los actinomicetos .....	7
1.1.3 Metabolitos antifúngicos producidos por actinomicetos .....	10
1.1.4 Grupos de genes biosintéticos péptidos no-ribosomal (NRPS) y policétidos sintasas (PKS) en actinomicetos .....	12
1.1.5 Activación del metabolismo secundarios de los actinomicetos .....	17
1.2 <i>Candida albicans</i> .....	20
1.3 Actinomicetos aislados de suelos de Campeche y Tabasco.....	21
JUSTIFICACIÓN.....	23
HIPÓTESIS.....	24
OBJETIVO GENERAL .....	24
OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	24
ESTRATEGÍA EXPERIMENTAL .....	25
CAPITULO II IDENTIFICACIÓN MOLECULAR Y EVALUACIÓN ANTI-CANDIDA DE ACTINOMICETOS AISLADOS DE SUELOS TROPICALES MEXICANOS.....	27
2.1 INTRODUCCIÓN .....	27
2.2 MATERIALES Y MÉTODOS .....	28
2.2.1 Microorganismos .....	28
2.2.2 Cultivos de cepas actinomicetales en el medio ISP2 .....	29
2.2.3 Extracción de ADN .....	29
2.2.4 Amplificación y secuenciación del gen 16S rRNA.....	30
2.2.5 Bioensayo antifúngico de los sobrenadantes.....	31
2.3 RESULTADOS.....	31
2.3.1 Identificación molecular .....	31
2.3.2 Actividad antifúngica.....	33
2.4 DISCUSIÓN .....	36
CAPITULO III MOLECULAR IDENTIFICATION OF SELECTED <i>STREPTOMYCES</i> STRAINS ISOLATED FROM MEXICAN TROPICAL SOILS AND THEIR ANTI-CANDIDA ACTIVITY .....	40
3.1 RESUMEN .....	40
3.2 ABSTRACT .....	41
3.3 INTRODUCTION.....	41
3.4 Materials and Methods.....	43
3.4.1 <i>Streptomyces</i> strains .....	43
3.4.2 Culture of the <i>Streptomyces</i> Strains .....	43
3.4.3 Genomic DNA Extraction, Amplification and Sequencing of 16S rRNA.....	44
3.4.4 Detection of PKS-I, PKS-II, and NRPS gene clusters .....	44
3.4.5 Antifungal bioassay of supernatants .....	45
3.4.6 Antifungal assay of organic extracts .....	46
3.4.7 LC-HRMS analysis .....	48

3.5 RESULTS .....	49
3.5.1 Molecular identification and screening of antifungal activity of <i>Streptomyces</i> strains .....	49
3.5.2 Detection of biosynthetic genes of active strains .....	51
3.5.3 LC-UV-HRMS Analysis.....	53
3.6 DISCUSSION.....	53
CAPITULO IV EFECTO DE ALGUNAS FUENTES NUTRICIONALES DE CARBONO Y NITRÓGENO EN LA ACTIVIDAD ANTI-CANDIDA DE TRES <i>STREPTOMYCES</i> NATIVOS DE TABASCO.....	
4.1 INTRODUCCION.....	58
4.2 MATERIALES Y METODOS .....	60
4.2.1 Microorganismos .....	60
4.2.2 Huella genética de <i>Streptomyces manipurensis</i> S3A-05 y S3A-09.....	60
4.2.3 Cultivo de las cepas de <i>Streptomyces</i> en medios ISP2 modificados .....	61
4.2.4 Bioensayo anti- <i>Candida</i> de sobrenadantes de cultivos de <i>Streptomyces</i> ....	62
4.2.5 Concentración mínima inhibitoria (CMI) de sobrenadantes liofilizados .....	63
4.2.6 Extracción etanólica y bioensayo anti- <i>Candida</i> de los extractos .....	63
4.2.7 Análisis de LC-MS de los extractos orgánicos .....	63
4.3 RESULTADOS.....	63
4.3.1 Huella genética de las cepas de <i>S. manipurensis</i> S3A-05 y S3A-09 .....	63
4.3.2 Actividad anti- <i>Candida</i> de cepas de <i>Streptomyces</i> cultivadas en los medios de inducción.....	65
4.3.3 Análisis de LC-MS de los extractos orgánicos .....	69
4.4 DISCUSIÓN .....	72
CAPITULO V .....	
5.1 CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS .....	80
5.1.1 CONCLUSIONES.....	80
5.1.2 PERSPECTIVAS.....	81
BIBLIOGRAFÍA.....	82
ANEXOS.....	115



## LISTADO DE FIGURAS

<b>Figura 1.1</b> Algunas estructuras químicas de metabolitos secundarios producidos por actinomicetos (Muñoz-López, 2015; Páez <i>et al.</i> , 2014; Brautaset <i>et al.</i> , 2011; Núñez <i>et al.</i> , 2003. ....	9
<b>Figura 1.2</b> Estructura química de antifúngicos sintetizados por actinomicetos (Demain, 2014; Kong, <i>et al.</i> , 2013).....	12
<b>Figura 1.3</b> Organización de PKS I. ACP: proteína portadora de acilo. AT: aciltransferasa. DH: dehidratasa. KR: ceto-reductasa. KS: ceto-sintasa (Olano <i>et al.</i> , 2010). ....	13
<b>Figura 1.4</b> Organización de PKS II. KS $\alpha$ y KS $\beta$ subunidades $\beta$ -cetoacilo sintasa. ACP: proteína portadora de acilo (Olano <i>et al.</i> , 2010). ....	14
<b>Figura 1.5</b> Esquema de la línea de ensamblaje de una NRPS. PCP: proteína acarreadora. A: adenilación C: condensación TE: tioesterasa (Conurso y Bruner S, 2012). ....	15
<b>Figura 1.6</b> Diagrama general de la estrategia experimental. *Concentración Mínima Inhibitoria. ....	25
<b>Figura 2.1</b> Distribución de las especies de las cepas estudiadas obtenidas en los suelos tropicales de Calakmul, Campeche; Florida, Puyacatengo y Cocona en Tabasco. ....	33
<b>Figura 2.2</b> Ensayo antifúngico (Método de microplaca) contra <i>Candida albicans</i> de los sobrenadantes obtenidos de los actinomicetos cultivados en el medio ISP2 durante dos semanas contra <i>Candida albicans</i> . A) Revelado con TTC al 1%. B) Replicación en agar saboraud. I: <i>S. parvisporogenes</i> S2A-04. II: <i>S. manipurensis</i> S3A-05. III: <i>S. manipurensis</i> S3A-09. IV: <i>S. angustumyceticus</i> S6A-03. V: Control negativo (medio ISP 2). VI: Control positivo (miconazol (1 $\mu$ g/mL). ....	35
<b>Figura 3.1</b> Genetic distance tree grouped by the unweighted pair group method with arithmetic mean (UPGMA) using the 16S ribosomal RNA gene sequence (Ribosomal Date Base Project), showing the genetic relations between the strains in this study (black rhombuses). <i>Escherichia coli</i> (HF584705.1) was employed as an outgroup. ....	50
<b>Figura 3.2</b> Agarose gel electrophoresis of the biosynthetic gene amplification products. (A) 1200–1400 bp fragments of polyketide synthase I (PKS-I) genes, (B) 800 to 900 bp fragments of type II polyketide synthase (PKS-II) genes, and (C) 700 bp fragments of non-ribosomal peptide synthase (NRPS) genes. Lane, I: 1 kb molecular weight marker; lane II: <i>Streptomyces parvisporogenes</i> (S2A-04); lane III: <i>Streptomyces manipurensis</i> (S3A-05); lane IV: <i>Streptomyces manipurensis</i> (S3A-09); lane V: non-active strain <i>Streptomyces angustumyceticus</i> S6A-03; and lane VI: <i>Streptomyces coelicolor</i> (control + PKS-I and NRPS). ....	52
<b>Figura 3.3</b> (A) LC-UV chromatogram (210 nm) of the ethanolic extract of the <i>S. parvisporogenes</i> (S2A-04) strain vs. an extract of the non-fermented culture medium, (B) Ultraviolet spectra and (C) HRMS spectra of the major peak at 2.30 min and structure of carbazomycin G.....	53
<b>Figura 4.1</b> Patrón de bandas obtenidas con los primers Banding DAM (carriles 2-13) y AP-PCR (carriles 14-19). Carriles 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16 y 18 <i>S. manipurensis</i> S3A-05. Carriles: 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17 y 19 <i>S. manipurensis</i> S3A-09. Carriles, 1 y 20: 1 kb marcador de peso molecular.....	64

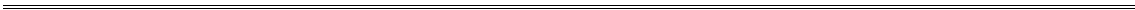
**Figura 4.2** Concentración mínima inhibitoria (MIC) de los sobrenadantes liofilizados de cepas de *Streptomyces* sp. cultivadas en los diferentes medios de inducción (AI, GI; PC, HS, AIPC, AIHS, GIPC y GIHS) y en el medio de referencia (ISP2). (\*) Valores de MIC >10 mg/mL. A) *S. parvisporogenes*. B) *S. manipurensis* S3A-05. C) *S. manipurensis* S3A-09. C: Carbono. N: Nitrógeno ..... 68

**Figura 4.3** Concentración mínima inhibitoria concentration (CMI) de los extractos etanólicos de los sobrenadantes de los cultivos de *Streptomyces parvisporogenes* S2A-04 en los diferentes medios de inducción y en el medio ISP2. (\*) Valores de CMI >1 mg/mL. .... 69

**Figura 4.4** Compuestos identificados en los extractos etanólicos del cultivo de *S. parvisporogenes* S2A-04 en los diferentes medios de inducción. .... 71

## LISTADO DE CUADROS

<b>Cuadro 1.1</b> Diversidad de metabolitos secundarios producidos por actinomicetos.....	8
<b>Cuadro 1.2</b> Ejemplos de antifúngicos descubiertos en actinomicetos (Demain, 2014; Kong, <i>et al.</i> , 2013). .....	11
<b>Cuadro 1.3</b> Ejemplos de fuentes de carbono y nitrógeno que influyen en el incremento de metabolitos activos sintetizados por actinomicetos aislados de diferentes suelos.....	19
<b>Cuadro 2.1</b> Clave, origen y características fisicoquímicas del lugar de aislamiento de los actinomicetos estudiados.....	28
<b>Cuadro 2.2</b> Identificación molecular de los aislados de actinomicetos tropicales, mediante la secuencia del gen 16S rRNA (Ribosomal Data base Project).....	32
<b>Cuadro 2.3</b> Actinomicetos tropicales aislados de suelos de Campeche y Tabasco cultivados en el medio líquido ISP2: pH, rendimientos de los sobrenadantes liofilizados y evaluación antifúngica de los sobrenadantes contra <i>C. albicans</i> . .....	34
<b>Cuadro 3.1</b> 16S ribosomal RNA gene taxonomic affiliation of <i>Streptomyces</i> strains isolated from tropical acidic soils in the state of Tabasco, Mexico. ....	49
<b>Cuadro 3.2</b> Minimum inhibitory concentration (MIC) of supernatants and fractions of <i>Streptomyces</i> sp. collected in tropical acidic soils of the state of Tabasco, Mexico. ....	51
<b>Cuadro 3.3.</b> Detection of biosynthetic genes in active <i>Streptomyces</i> strains .....	52
<b>Cuadro 4.1</b> Lista de medios de cultivo líquidos modificados a partir del medio de referencias ISP2. ....	62
<b>Cuadro 4.2</b> Medios de inducción (Tratamientos) y medio de referencia (ISP2) utilizados en el cultivo de los tres aislados de <i>Streptomyces</i> seleccionados para incrementar efecto anti- <i>Candida</i> .....	62
<b>Cuadro 4.3</b> Número total de bandas, bandas polimórficas, polimorfismo y contenido de información polimórfica (PIC) obtenidos de los cebadores DMAD y AP-PCR. ....	65
<b>Cuadro 4.4</b> Actividad anti- <i>Candida</i> de los sobrenadantes de <i>Streptomyces</i> sp. cultivadas en los diferentes medios de inducción y el medio ISP2.....	66



**ABREVIATURAS**

PKS	Policético sintasa
NRPS	Péptidos no ribosomales
LC-MS	Cromatografía líquida acoplado a masas
UFC	Unidades formadoras de colonias
CMI	Concentración mínima inhibitoria
CLSI	Clinical Laboratory Standards Institute
SN	Sobrenadantes
ISP2	International <i>Streptomyces</i> Project 2
mL	Mililitros
pH	Potencial de hidrógeno
μL	Microlitros
rpm	Revoluciones por minuto
μm	Micrómetros
TTC	2,3,5-trifenil tetrazolium chloride
mg	Miligramos
DMSO	Dimetil sulfóxido
TBE	Tris-Borato-EDTA
OSMAC	One strain-many compounds
AP-PCR	Cebadores arbitrarios para PCR
DAMD	Amplificación directa del ADN de la región del minisatélite
PIC	Contenido de información de polimorfismo
AI	Medio con almidón
GI	Medio con glicerol
PC	Medio con peptona de carne

HS	Medio con harina de soya
AIPC	Medio almidón y peptona de carne
AIHS	Medio con almidón y harina de soya
GIPC	Medio con glicerol y peptona de carne
GIHS	Medio con glicerol y harina de soya
S.04	<i>S. parvisporogenes</i> S2A-04
S.05	<i>S. manipurensis</i> S3A-05
S.09	<i>S. manipurensis</i> S3A-09

**RESUMEN**

El incremento de la incidencia de infecciones y la resistencia antimicrobiana por *Candida*, induce a la búsqueda de nuevos antifúngicos. Una de las fuentes productoras de compuestos antimicrobianos son los actinomicetos. En estudios previos, se aislaron cepas actinomicetales del suelo del estado de Tabasco, algunas de ellas mostrando actividad antimicrobiana promisoría. En el presente trabajo, 15 actinomicetos se seleccionaron, se cultivaron en el medio ISP2 y se identificaron utilizando el gen 16s RNAr y los sobrenadantes del cultivo (SN) de estas se evaluaron contra *Candida albicans*. Los resultados mostraron que el 93% de las cepas correspondieron al género *Streptomyces*. Entre estas, las cepas de *Streptomyces angustmyceticus* S6A-03, *Streptomyces manipurensis* S3A-05, *S. manipurensis* S3A-09 y *Streptomyces parvisporogenes* S2A-04 presentaron actividad anti-*Candida*. Posteriormente, se confirmó la presencia de los genes PKS tipo I, II y NRPS en *S. manipurensis* S3A-05 y *S. parvisporogenes*. El extracto etanólico (EE) del SN de *S. parvisporogenes* mostró la más baja concentración mínima inhibitoria (MIC=0.5 mg/mL). En este extracto se identificó mediante cromatografía de líquidos acoplado a un detector másico (LC-MS) su componente principal como carbazomicina G, un antifúngico conocido.

En una segunda parte de la investigación, las tres cepas anti-*Candida* se cultivaron en medios formulados con dos diferentes fuentes de carbono y nitrógeno a las que contiene el medio ISP2. La cepa *S. manipurensis* S3A-05 presentó mayor actividad (MIC=0.31 mg/mL) en los medios con almidón (AI) y con almidón-peptona de carne (AIPC). Sin embargo, los EE de los SN de ambas cepas y su fase acuosa residual no mostraron efecto anti-*Candida*. Los medios con peptona de carne en presencia de almidón (AIPC) o glicerol (GIPC), incrementaron la actividad de los SN de *S. parvisporogenes* (MIC=0.62 mg/mL). Siendo el EE de AIPC el más efectivo (MIC= 0.12 mg/mL), en el cual se identificaron los metabolitos carbazomicina G y 2-(1,3-Pentadienil) piperidina, como principales por LC-MS. La carbazomicina G se detectó en todos los EE de *S. parvisporogenes*, así como otros nueve conocidos metabolitos y otros no conocidos, que indica que dependiendo del medio se modula la expresión de diferentes metabolitos. Los resultados confirman que los actinomicetos de suelos tropicales mexicanos son una fuente importante en la búsqueda de productos alternativos contra *C. albicans*.

---



**ABSTRACT**

The increased incidence of infections and antimicrobial resistance by *Candida* induces the search for new antifungals. One of the producing sources for antimicrobial compounds are actinomycetes. In previous studies, actinomycetal strains were isolated from the soil of the state of Tabasco, some of them showing promising antimicrobial activity. In the present study, 15 actinomycetes were selected and cultured in ISP2 medium. They were identified by their 16s rRNA gene sequence, and their cultivation supernatants (SN) were evaluated against *Candida albicans*. The results showed that 93% of the strains corresponded to the *Streptomyces* genus. Among these, *Streptomyces angustmyceticus* S6A-03, *Streptomyces manipurensis* S3A-05, *S. manipurensis* S3A-09 and *Streptomyces parvisporogenes* S2A-04 showed anti-*Candida* activity. Subsequently, the presence of PKS type I, II and NRPS genes in *S. manipurensis* S3A-05 and *S. parvisporogenes* was confirmed. The ethanol extract (EE) of the *S. parvisporogenes* SN showed the lowest minimum inhibitory concentration (MIC = 0.5 mg / mL). The main component of this extract was identified as carbazomycin G, a known antifungal, by liquid chromatography coupled to mass spectrometry (LC-MS)

In a second part of the investigation, the three active strains were grown in media formulated with another two different sources of carbon and nitrogen. The *S. manipurensis* S3A-05 strain showed greater activity (MIC = 0.31 mg/mL) in the media with starch (AI) and with meat starch-peptone (AIPC). However, the EE of the SN from both strains and their residual aqueous phase showed no anti-*Candida* effect. Media with meat peptone in the presence of starch (AIPC) or glycerol (GIPC) increased the activity of the *S. parvisporogenes* SN (MIC = 0.62 mg / mL). The AIPC EE showed the lowest MIC (MIC = 0.12 mg/mL), and the metabolites Carbazomycin G and 2- (1,3-Pentadienyl) piperidine were identified as the most abundant metabolites their principal components by LC-MS. Carbazomycin G was detected in all EE from *S. parvisporogenes*, as well as other nine known metabolites and some not known, indicating that the expression of different metabolites may be influenced by the growth medium. The results confirmed that actinomycetes from Mexican tropical soils are an important source in the search for alternative products against *C. albicans*.



### INTRODUCCIÓN

Los miembros del phylum *Actinobacteria* son considerados como una de las grandes fuentes de compuestos naturales, por su enorme capacidad para biosintetizar moléculas con estructuras y actividad biológica altamente diversas, como antitumorales, inmunosupresivos, enzimas, antiparasitarios, insecticidas, agentes antihelmínticos, herbicidas, antioxidantes, antibióticos y antifúngicos. Entre los primeros antifúngicos descubiertos se encuentran la nistatina obtenida de *Streptomyces noursei* en 1957 y la anfotericina B, de *Streptomyces nodosus* en 1958, los cuales todavía se encuentran a la venta (Sharma, 2014).

Con el paso del tiempo, las infecciones fúngicas invasivas (fungemia) producidas por especies de levaduras son cada vez más difíciles de tratar, debido al uso no regulado de los agentes antimicóticos que ha inducido el incremento de resistencia de los hongos patógenos. El tratamiento de este tipo de infecciones queda limitado a los antimicóticos anfotericina B, fluconazol, itraconazol y 5-fluorocitosina. Sin embargo, la toxicidad hepática, renal y sus efectos sobre el sistema endocrino y el aparato reproductor, obligan a tener una estricta vigilancia de los parámetros clínicos del enfermo durante el tratamiento (Sardi *et al.*, 2013). En particular, la fungemia por *Candida* spp. (candidiasis) causa infecciones tanto en la mucosa como en los tejidos profundos, y en algunos estudios la mortalidad ha sido estimada en un 30-50% (Pemán y Quindós, 2016). El principal agente etiológico asociado a este padecimiento es *Candida albicans*. Su importancia radica en el grave problema de salud pública que representa, lo cual demanda la búsqueda de nuevos metabolitos activos capaces de combatir a este hongo patógeno (Whaley *et al.*, 2017)

Entre las dificultades para encontrar un nuevo antifúngico destaca el hecho de que tanto el hongo, como las células del huésped infectadas son eucariotas, con características bioquímicas similares, por lo que la posibilidad de provocar efectos no deseados sobre el huésped es mayor. Por otra parte, el costo elevado del desarrollo de nuevos antifúngicos sin garantías, son dificultades añadidas que obstaculizan la búsqueda de nuevas sustancias. El antifúngico ideal debe ser de amplio espectro, atóxico, con actividad tanto por vía oral como parenteral, sin resistencias, con farmacocinética adecuada y de bajo costo. Sin embargo, ante la ausencia de este fármaco ideal y teniendo en cuenta la gran

cantidad de variables que pueden afectar su actividad tanto *in vitro* como *in vivo*, es necesario continuar con la búsqueda de nuevos antifúngicos activos también frente a los patógenos emergentes (Ngo *et al.*, 2016).

Los actinomicetos capaces de biosintetizar metabolitos secundarios con actividades antifúngicas son candidatos para continuar con el desarrollo biotecnológico de agentes terapéuticos novedosos (Keikha *et al.*, 2015). La biosíntesis de la mayoría de sus metabolitos activos, es dependiente de las enzimas policétido sintasas (PKS) y sintasas de péptidos no ribosómicas (NRPS). Por lo tanto, los genes que codifican estas enzimas, han sido utilizados para explorar su potencial biosintético en la producción de compuestos bioactivos. Sin embargo, la detección de estos genes biosintéticos no garantiza su expresión, o bien que el nivel de expresión sea tal, que afecte la síntesis del compuesto (Palomo *et al.*, 2013). Esto ocurre debido a diversos factores externos (bióticos y abióticos), que pueden influir en el nivel de expresión de los genes, y por lo tanto en la síntesis de los metabolitos secundarios. Por lo cual, el someter los cultivos de actinomicetos a diferentes condiciones de nutrientes permite activar la expresión de genes para encontrar nuevos compuestos activos o incrementar la producción del metabolito deseado (Pan *et al.*, 2019). Una manera de realizarlo es utilizar el método OSMAC (una cepa/muchos compuestos), (Liu *et al.*, 2015), esta estrategia ha demostrado que el tipo de fuente de carbono y nitrógeno tienen un efecto en el desarrollo morfológico de los *Streptomyces* que coincide con la producción de metabolitos secundarios con actividad antimicrobiana (van der Meij *et al.*, 2017).

En el género *Streptomyces* se ha visto que la síntesis de metabolitos secundarios que producen, parece estar regulada por un sistema llamado represión catabólica del carbono (RCC). Esto se define como la inhibición de la expresión de genes requeridos para la utilización de fuentes de carbono secundarias, causada por sustratos carbonados que son degradados rápidamente, como la glucosa. Por lo tanto, cuando se cultivan en presencia de condiciones limitantes de carbono cesa la represión por catabolito, sintetizándose a partir de ese momento las enzimas necesarias para la biosíntesis de metabolitos secundarios (Forero *et al.*, 2012; Wezela y McDowall, 2011). Al igual, muchas vías metabólicas secundarias se afectan negativamente al emplear fuentes de nitrógeno favorables para el crecimiento. Por ejemplo, las sales de amonio. Una interpretación de

esta tendencia es que, al suministrar una buena fuente de nitrógeno, el carbono disponible se utiliza para el crecimiento generando biomasa. En consecuencia, menos carbono está disponible para el metabolismo secundario. Por lo tanto, para la producción de metabolitos secundarios es importante utilizar diversas fuentes de nitrógeno, por ejemplo, la harina de soya se utiliza como una fuente de proteínas en los medios complejos y en medios definidos se utilizan aminoácidos lentamente asimilables como la prolina (Wohlleben *et al*, 2017; Kim y Kim, 2016).

Recientemente, se han aislado cepas de actinomicetos de suelos tropicales en diferentes localidades de los estados de Campeche y Tabasco, que han demostrado actividad antifúngica contra *Candida albicans*. Sin embargo, se desconoce su identidad a nivel de especie, los metabolitos y los tipos de genes biosintéticos involucrados en su producción, así como la influencia de los nutrientes en su nivel de expresión y por lo tanto en su actividad. Por lo anteriorMENTE, el presente trabajo consistió en una primera etapa, identificar molecularmente las cepas de actinomicetos estudiadas, seleccionar las más promisorias con base en su mayor actividad antifúngica presentada, detectar la presencia de sus genes PKS y NRPS e identificar los metabolitos que producen. La segunda etapa consistió en cultivar las cepas en diferentes fuentes nutrimentales de carbono y nitrógeno con la finalidad de influir en su actividad antifúngica y detectar cambios en los metabolitos que producen. Los resultados obtenidos servirán como precedente para facilitar la optimización de la producción de los metabolitos secundarios involucrados en la actividad antifúngica contra *C. albicans* de estos actinomicetos.

---

## CAPITULO I ANTECEDENTES

### 1.1 ACTINOMICETOS

#### 1.1.1 Generalidades

El *phylum Actinobacteria* representa una de las unidades taxonómicas más grandes entre los 18 linajes principales actualmente reconocidos dentro del dominio bacteria. Este grupo inicialmente fue clasificado taxonómicamente basándose en su morfología filamentosa, que se produce durante su ciclo de crecimiento. Sin embargo, es insuficiente para la diferenciación entre las especies de muchos géneros. Actualmente se utilizan ciertos criterios para su clasificación e identificación hasta nivel de especie. Éstos incluyen el crecimiento en distintos medios, producción y difusión de pigmentos melanoides, la composición de su pared celular, la utilización de fuentes de carbono y nitrógeno, producción de esporas, porcentaje de guanina + citocina (GC) del ADN, técnicas moleculares y análisis filogenéticos derivados de 16S rRNA y de la reacción de la cadena de polimerasa (PCR), (Adegboye y Babalola, 2012).

Las actinobacterias presentan una amplia variedad de morfologías, incluyendo formas cocoides (*Micrococcus*) y cocobacilares (*Arthrobacter*), así como las formas de hifas fragmentadas (*Nocardia*) y también la forma con micelios permanentes altamente ramificados y diferenciados (por ejemplo, *Frankia*, *Streptomyces*). Las esporas son extremadamente importantes en su identificación taxonómica, se pueden formar en el sustrato, en el micelio aéreo o en ambos, como células individuales o en cadenas de diferentes longitudes. En otros casos, las esporas se pueden albergar en vesículas especiales (esporangios) y pueden estar dotadas de flagelos (Barka *et al.*, 2016).

Debido a que no producen mucopolisacáridos, los actinomicetos forman colonias aterciopeladas o polvosas, adherentes, cerosas o calcáreas, firmes y lisas, que crecen en días o semanas de incubación. Pueden presentar pigmentación anaranjada, ocre, rosada, o gris, que pueden ser de tres tipos: el que se desarrolla en las esporas, el que es retenido en el micelio vegetativo y el que es difundido por el medio. La formación de este último es debida a la acción de la enzima tirosinasa sobre tirosina que la convierte en el pigmento melanina. Las colonias maduras son ligeramente cónicas en la sección transversal y frecuentemente presentan elevación en la zona central. El olor a suelo húmedo es

característico de cultivos de colonias maduras del género *Streptomyces*, producido por un metabolito llamado geosmina (Sharma, 2014). En cultivo líquido, el crecimiento puede ocurrir de tres diferentes formas: esferas (pellet), fragmento miceliar y micelio disperso. El tamaño de las esferas está en función del inóculo, oxígeno disuelto y pH (Meurant, 2012). Todas las especies son Gram positivas, aunque las especies de *Nocardia* pueden variar (Gram positivas o negativas). La composición de bases del ADN de todos los miembros de Actinomicetales está dentro de un margen relativamente estrecho del 70% de GC. Estos organismos poseen los mayores porcentajes de GC de todas las bacterias (de Lima Procópio *et al.*, 2012).

En cuanto a su hábitat, los actinomicetos se han encontrado en diversos ecosistemas acuáticos y terrestres, debido a la habilidad que poseen para usar casi cualquier fuente de nutrientes disponible para su desarrollo, tales como proteínas, pectinas, celulosa, hemicelulosa, lignina y quitina entre otros, existen como saprófitos, simbioses y patógenos (Dyson, 2011). En la mayoría de los suelos, se encuentran alrededor de  $10^4$  a  $10^7$  unidades formadoras de colonias (UFC) de actinomicetos por 1 gramo, que constituyen del 1-20% del número total de microorganismos (Lee y Hwang, 2002).

En el suelo, miembros de la familia *Streptomycetaceae*, principalmente del género *Streptomyces*, se encuentran en un 90% o incluso más de todos los actinomicetos presentes. Los géneros *Actinomices*, *Actinoplanes*, *Microbispora*, *Micromonospora*, *Nocardia* y *Streptosporangium* han sido también encontrados, pero en menor cantidad (Tiwari y Gupta, 2011). Al igual que otros microorganismos del suelo, la mayoría de los actinomicetos se comportan como mesófilos, con un óptimo crecimiento a 25-30 °C y pueden crecer con un pH entre 5.0 y 9.0, sin embargo, alcanzan su óptimo crecimiento en suelos con un pH cercano a la neutralidad (Poomthongdee *et al.*, 2014). Como muchos suelos son ácidos, el pH es claramente un factor que determina su distribución. Estos microorganismos también se han aislado de suelos fuertemente ácidos con un pH óptimo de crecimiento de 4.5 (Zakalyukina *et al.*, 2002). Los actinomicetos acidófilos difieren de los neutrófilos no sólo por lo referente al pH sino también por otras propiedades fisiológicas. Reportes en la literatura indican que los actinomicetos acidófilos juegan un papel importante en la descomposición de quitina en los suelos forestales ácidos (Golińska y Dahm, 2011). La abundancia de materia orgánica también juega un papel importante, se ha observado una elevación del número de actinomicetos en otoño cuando se hace la deposición de residuos vegetales frescos (Lee y Hwang 2002). Otros factores que influyen en el número y la



proporción de los actinomicetos en la microflora telúrica es la aireación y la humedad; la mayor parte de los actinomicetos son aerobios y prefieren tasas de humedad poco elevadas del orden de 10 al 30%. Se encuentran presentes sobre todo en la capa comprendida entre la superficie del suelo y los dos metros de profundidad, estando su óptima distribución entre 2 -15 cm, su número disminuye con la profundidad (Bhatti *et al*, 2017). Son generalmente más numerosos que otras bacterias, pero menos que los hongos (Shukla y Varma, 2011).

Durante años, los suelos han sido seleccionados y explorados por la industria farmacéutica, como una fuente importante en la búsqueda de actinomicetos para la producción de metabolitos secundarios biológicamente activos (Traxler y Kolter, 2015). En los últimos años han sido casi abandonados debido al empleo de estrategias basadas en el cribado de alto rendimiento (HTS) de bibliotecas químicas. Este último enfoque no ha sido productivo hasta el momento, por lo que los suelos continúan siendo estudiados. Sin embargo, sólo una pequeña fracción de taxones de actinomicetos han sido descubiertos (Tyc *et al.*, 2017).

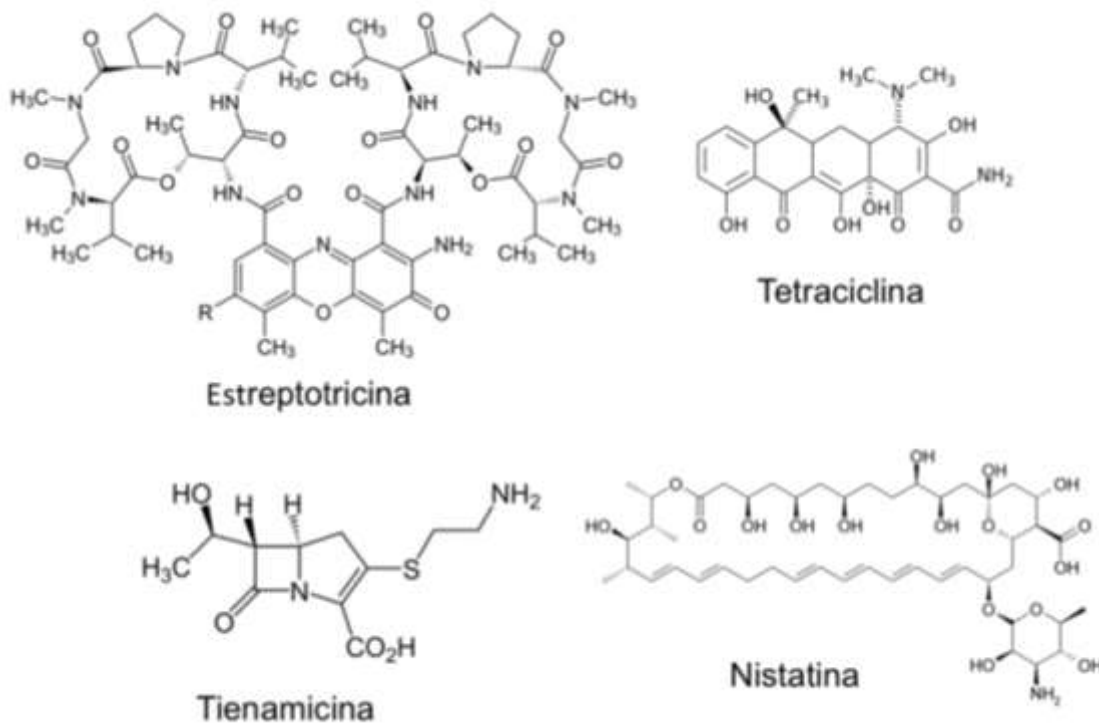
### **1.1.2 Diversidad e importancia del metabolismo biosintético de los actinomicetos**

Los actinomicetos son una fuente microbiana de compuestos con un gran valor comercial; alrededor del 70% de los antibióticos se obtienen de ellos, al igual que otros metabolitos secundarios activos, tales como antitumorales, inmunosupresores, agentes antioxidantes, entre otros, así como enzimas, todos ellos con aplicaciones en la industria, medicina y la agricultura (Chavan *et al.*, 2013).

Los metabolitos secundarios sintetizados por estos microorganismos muestran una variedad de estructuras químicas y actividad biológica, resultado de una serie de reacciones como son la condensación, metilación, oxidación, polimerización, reducción entre otras (Walsh y Fischbach, 2010). Los actinomicetos biosintetizan metabolitos a través de diferentes vías, acetato/malonato, ácido shikímico, aminoácidos, azúcares, mevalonato, nucleósidos, y también a través de vías compuestas (Meurant, 2012). Esto origina productos como los aminoglucósidos (estreptomina y kanamicina), antraciclinas (doxorubicina), ansamicinas (rifampicina),  $\beta$ -lactamas (cefalosporinas), macrólidos (eritromicina), nucleósidos (puromicina), polienos (nistatina), poliéteres (salinomicina), tetraciclinas, péptidos y glucopéptidos (vancomicina), entre otros (Cuadro 1.1, Figura 1.1) (Bérdy, 2012).

**Cuadro 1.1** Diversidad de metabolitos secundarios producidos por actinomicetos.

<b>Actinomiceto Productor</b>	<b>Metabolito y su aplicación</b>	<b>Clasificación</b>	<b>Referencias</b>
<i>Streptomyces antibioticus</i>	Actinomicina (antitumoral)	Péptido no ribosomal	Kawai <i>et al.</i> , 2007
<i>Streptomyces lavendulae</i>	Estreptotricina (Antibacteriano y antifúngico)	Péptido no ribosomal	Fjaervik y Zotchev, 2005
<i>Streptomyces griseus</i>	Estreptomina (Antibacteriano)	Aminoglucósido	Muñoz –López, 2015
<i>Streptomyces peuceticus subespecie caesius</i>	Doxorrubicina (Antitumoral)	Antraciclina	Malla, <i>et al.</i> , 2010
<i>Amycolatopsis rifamycinica</i>	Rifampicina (Antibacteriano)	Ansamicina	Zhao, <i>et al.</i> , 2010
<i>Streptomyces cattleya</i>	Tienamicina (Antibacteriano)	$\beta$ -lactama (Carbapenema)	Núñez <i>et al.</i> , 2003
<i>Saccharopolyspora erythraea</i>	Eritromicina (Antibacteriano)	Macrólido	Oliynyk <i>et al.</i> , 2007
<i>Streptomyces alboniger</i>	Puromicina (Antibacteriano, Antifúngico, Antiprotozoario)	Nucleósido	Sánchez <i>et al.</i> , 2006
<i>Streptomyces noursei</i>	Nistatina (Antifúngico)	Polieno	Brautaset <i>et al.</i> , 2011
<i>Streptomyces albus</i>	Salinomicina (Antibacteriano, Antiprotozoario)	Poliéster	Parajuli <i>et al.</i> , 2013
<i>Streptomyces viridifaciens</i>	Tetraciclinas (Antibacteriano)	Tetraciclina	Canale-Guerrero <i>et al.</i> , 2012
<i>Nocardia orientalis</i>	Vancomicina (Antibacteriano)	Glucopéptido	Páez <i>et al.</i> , 2014



**Figura 1.1** Algunas estructuras químicas de metabolitos secundarios producidos por actinomicetos (Muñoz-López, 2015; Páez *et al.*, 2014; Brautaset *et al.*, 2011; Núñez *et al.*, 2003).

Durante el crecimiento del microorganismo, los metabolitos generalmente comienzan a acumularse en la idiofase (el final de la fase logarítmica a la fase estacionaria) y su síntesis depende en gran medida de las condiciones de crecimiento (Ali *et al.*, 2018). La producción es generalmente cuando el crecimiento está limitado por el agotamiento de un nutriente clave como el carbono o el nitrógeno (Chater, 2016).

Los agentes antimicrobianos son los compuestos químicos que inhiben o matan a los microorganismos, porque tienen la capacidad de interferir en su actividad metabólica. Estos pueden ser clasificados sobre la base de su espectro de acción en: amplio espectro, cuando actúan sobre una gran gama de microorganismos, de diferentes especies y géneros; de espectro limitado, actúan sólo contra un rango limitado de microorganismos, como una familia específica y de espectro reducido, actúan sólo contra un sector limitado de microorganismos, por ejemplo, contra bacilos gram negativos aerobios (Melander *et al.*, 2018)

El descubrimiento de los primeros antimicrobianos en actinomicetos, lo realizaron Waksman y colaboradores en los años 40 (Mahajan y Balachandran, 2012). Estos correspondieron a la actinomicina, un péptido no ribosomal obtenido de *Streptomyces antibioticus*, que actualmente se emplea en quimioterapia por su toxicidad celular; la estreptotricina, un péptido no ribosomal de *Streptomyces lavendulae*, el cual posee actividad contra hongos y bacterias; y la estreptomycinina, un aminoglucósido de *Streptomyces griseus*, con actividad contra *Mycobacterium* y bacterias gram negativas (Cuadro 1.1). Después de esos sucesos, nuevos antimicrobianos y sus diferentes aplicaciones han sido descubiertos (Demain, 2014; Solecka et al., 2012).

Los actinomicetos poseen la capacidad de biosintetizar más de una sustancia antibiótica, por ejemplo, una cepa de *Micromonospora* puede producir alrededor de 48 diferentes aminoglucósidos con propiedades antibióticas (Chaudhary et al., 2013). Por otra parte, un mismo compuesto antimicrobiano puede ser producido por diferentes especies de actinomicetos, así, la tetraciclina se obtiene de *Streptomyces viridifaciens* y *Streptomyces aureofaciens* (Vastrad y Neelagund, 2011). Al igual, el mismo compuesto puede presentar más de una actividad biológica, tales como la estreptotricina, la salinomicina, la puromicina entre otros (Waksman et al., 2010). (Cuadro 1.1).

El 75% de los antimicrobianos producidos por los actinomicetos provienen del género *Streptomyces*, debido a esto, han sido objeto de estudios de modificación genética para incrementar la síntesis de sus compuestos. Por ejemplo, cepas de *Streptomyces hygroscopicus* producen alrededor de 200 antibióticos, otro ejemplo son las cepas de *S. griseus* que sintetizan aproximadamente 40 compuestos antimicrobianos diferentes, entre los cuales se encuentran la estreptomycinina y candidicina (Demain, 2014).

### 1.1.3 Metabolitos antifúngicos producidos por actinomicetos

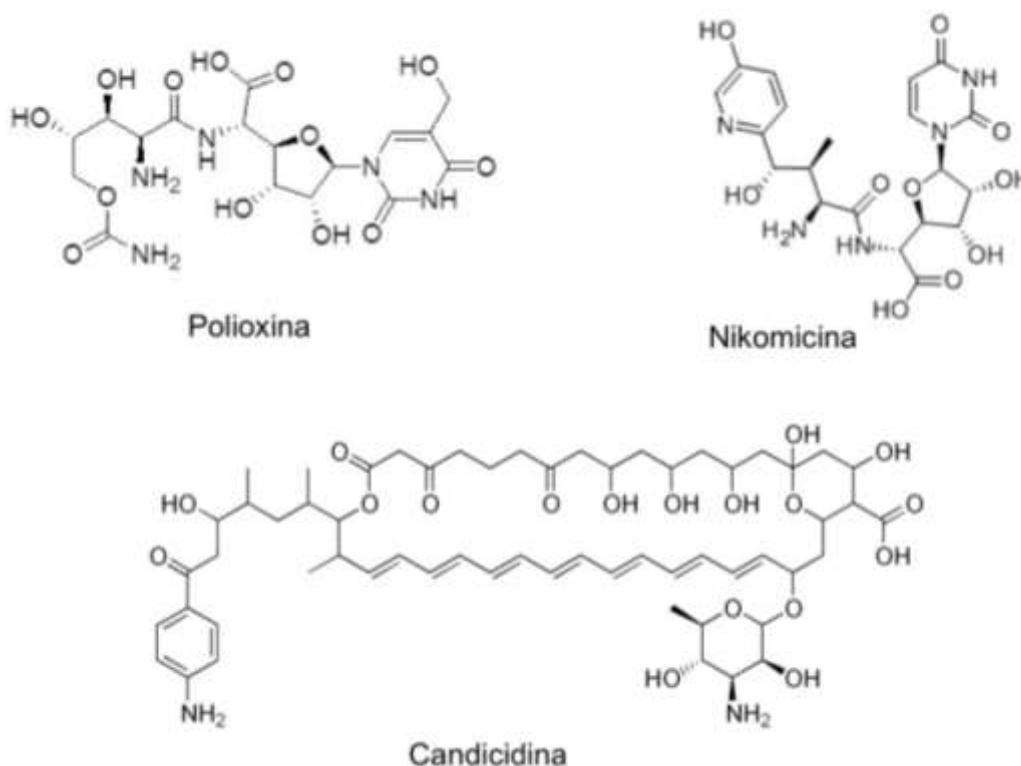
La mayoría de compuestos antifúngicos que provienen de los actinomicetos se han obtenidos del género *Streptomyces*. La nistatina producida por *Streptomyces noursei*, y la anfotericina B obtenida de *Streptomyces nodosus*, poseen actividad contra *Candida*, *Aspergillus*, *Histoplasma* y *Coccidioides*. La natamicina es producida por *Streptomyces natalensis*, es empleada como conservador natural en la industria alimentaria para evitar la descomposición por hongos y está indicada en el tratamiento de infecciones en los ojos causadas ocasionadas por *Candida*, *Aspergillus*, *Cephalosporium*, *Fusarium* y *Penicillium*. La polioxina y la nikomicina se obtienen de *Streptomyces cacaoi* var. *asoensis* y

*Streptomyces tendae*, respectivamente; estos antifúngicos presentan actividad contra hongos filamentosos como son *Aspergillus* y hongos dimórficos como *Coccidioides* (Ngo, *et al.*, 2016).

Para el control de *C. albicans* el primer antimicrobiano reportado fue la rapamicina (*Streptomyces hygroscopicus* NRRL 5491), el cual también demostró tener actividad contra otros hongos patógenos de humanos, tales como *Aspergillus fumigatus*, *Cryptococcus neoformans*, *Fusarium oxysporum* y especies patógenas de *Penicillium*, también posee actividad inmunosupresora. La partricina también denominada mepartricina (*Streptomyces aureofaciens*), activo también contra *Trichomonas vaginalis* y protozoarios. La candidicina obtenida de *Streptomyces griseus* y la nistatina producida por *Streptomyces noursei*, presentan actividad contra diferentes especies de *Candida* (Demain, 2014; Kong *et al.*, 2013; Bastidas, 2012).

**Cuadro 1.2** Ejemplos de antifúngicos descubiertos en actinomicetos (Demain, 2014; Kong, *et al.*, 2013).

<b>Antifúngicos</b>	<b>Actinomiceto productor</b>	<b>Tipo de compuesto</b>
Anfotericina B	<i>Streptomyces nodosus</i>	Polieno
Candidicina	<i>Streptomyces griseus</i>	Polieno
Natamicina	<i>Streptomyces natalensis</i>	Polieno
Nistatina	<i>Streptomyces noursei</i>	Polieno
Nikomocina	<i>Streptomyces tendae</i>	Depsipéptido cíclico
Partricina (mepartricina)	<i>Streptomyces aureofaciens</i> NRRL 3878	Polieno
Polioxina	<i>Streptomyces cacaoi</i> var. <i>asoensis</i>	Depsipéptido cíclico
Rapamicina	<i>Streptomyces hygroscopicus</i>	Policétido



**Figura 1.2** Estructura química de antifúngicos sintetizados por actinomicetos (Demain, 2014; Kong, *et al.*, 2013).

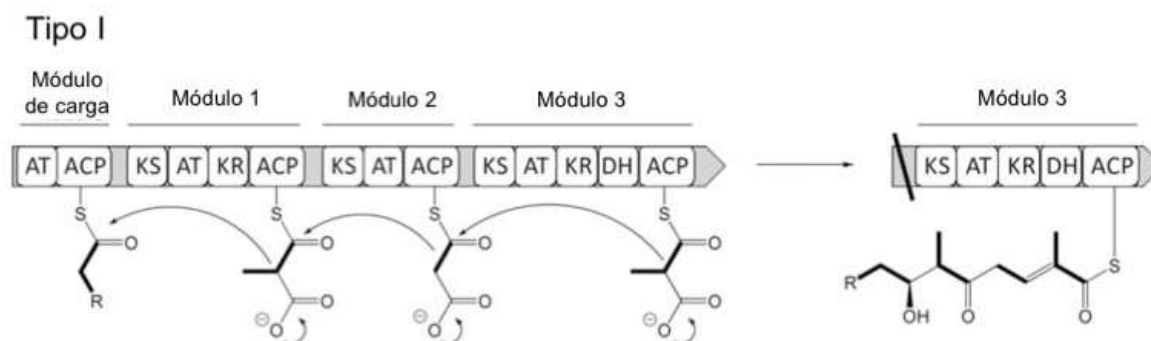
#### 1.1.4 Grupos de genes biosintéticos péptidos no-ribosomal (NRPS) y policétidos sintasas (PKS) en actinomicetos

Diversas moléculas con aplicaciones biotecnológicas derivadas del metabolismo secundario microbiano, son sintetizadas por enzimas sintasas, que corresponden a la síntesis de péptidos no-ribosomales (NRPS) y policétidos (PKS). De estos último se conocen tres tipos de PKS bacterianos: PKS-I, II y III (Risidian *et al.*, 2019).

Las PKS de tipo I, también llamadas PKS modulares, contienen varios dominios funcionales que participan paso a paso en la síntesis del policétido, cada módulo es responsable de un ciclo de la elongación de la cadena. En cada dominio catalítico se lleva a cabo una función una sola vez durante la síntesis, hasta que se completa la estructura definitiva (Moretto *et al.*, 2019). Son más versátiles que las de tipo II en cuanto a los sustratos que utilizan, y dan lugar a estructuras moleculares complejas, a menudo cíclicas (macrólidos) (Chen y Du,

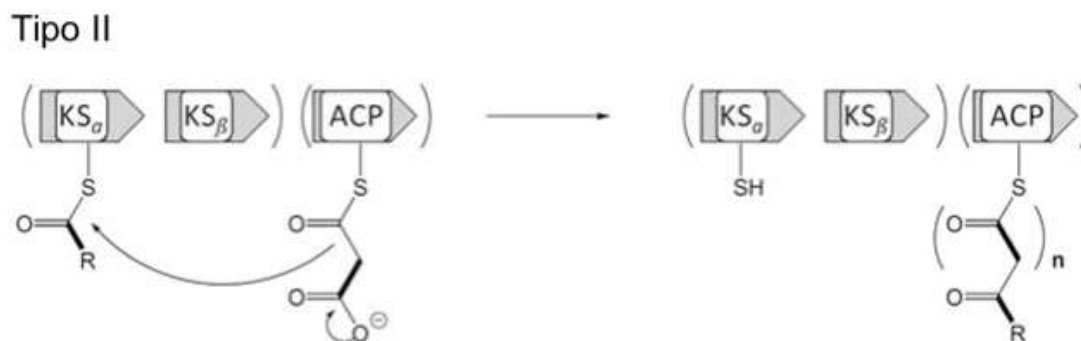
2015). Un ejemplo es la sintasa 6-deoxieritromicina B (DEBS), involucrada en la biosíntesis de la eritromicina (Shelest *et al.*, 2015).

Cada PKS I codifica módulos con tres dominios básicos que corresponden a cetosintasa (KS), aciltransferasa (AT), y a la proteína portadora de acilo (ACP), que están involucrados en la selección y condensación de la unidad extendora. Junto a éstos pueden aparecer dominios: cetereductasa (KR), deshidratasa (DH), enoil reductasa (ER), y otros dominios con diferentes funciones: metiltransferasa (MT), ciclasa (CYC), y tioesterasa (TE), involucrados en la reducción del grupo  $\beta$ -ceto formado en la condensación (Dutta *et al.*, 2014). Todos estos dominios están involucrados en la biosíntesis de la nueva cadena de policétido. El sustrato específico de cada elongación de la unidad de carbono está determinado por el dominio AT donde dos grupos principales de acil transferasa, malonil coenzima A transferasa y metil-malonil coenzima A transferasa pueden ser claramente distinguidos a nivel secuencia (Figura 1.3) (Vance *et al.*, 2016).



**Figura 1.3** Organización de PKS I. ACP: proteína portadora de acilo. AT: aciltransferasa. DH: deshidratasa. KR: cetereductasa. KS: cetosintasa (Olano *et al.*, 2010).

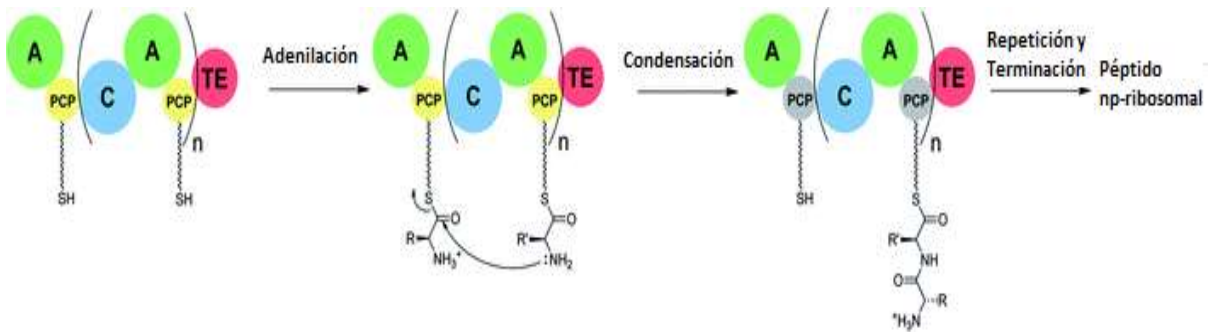
Las PKS Tipo II son complejos de varias enzimas mono o bifuncionales que actúan de manera iterativa. En este sistema cada dominio catalítico se encuentra en una proteína separada, donde cada polipéptido lleva a cabo una única actividad enzimática, empleado sucesivamente en varios ciclos e incorporando una nueva unidad cada vez, hasta completar la molécula final. Estas forman metabolitos secundarios con estructuras de anillos aromáticos, por ejemplo, en la síntesis de antibióticos aromáticos, como las tetraciclinas. Emplean casi exclusivamente acetil coenzima A y malonil coenzima A (Zhang *et al.*, 2017).



**Figura 1.4** Organización de PKS II.  $KS_{\alpha}$  y  $KS_{\beta}$  subunidades  $\beta$ -cetoacilo sintasa. ACP: proteína portadora de acilo (Olano *et al.*, 2010).

Las NRPS son enzimas multidominio construidas por unidades catalíticas llamadas módulos. Los módulos de NRPS consisten en tres dominios catalíticos, cada uno selecciona y activa un aminoácido que formará parte de la estructura del péptido. El dominio de adenilación (A) determina la entrada del sustrato, es responsable del reconocimiento y activación del aminoácido mediante la formación de un derivado adenilado. El aminoácido activado se une mediante una unión tioéster al cofactor 4'-fosfopanteteína del dominio de tiolización (dominio T), también nominado dominio de la proteína acarreadora de peptidil (PCP). A partir de allí los radicales aminoacilo o peptidilo pueden ser condensados al módulo vecino. Esta reacción se cataliza por el dominio de condensación (dominio C). El dominio de condensación (C) cataliza la formación del enlace C-N (peptídico) entre la cadena elongada y los aminoácidos activados. Estos tres dominios, el dominio C, el A y el T (PCP) forman habitualmente la unidad fundamental de las NRPS. El último módulo de una contiene por lo regular un dominio tioesterasa o dominio de terminación (Te), el cual es responsable de la liberación del producto de síntesis (Condurso y Bruner, 2012).





**Figura 1.5** Esquema de la línea de ensamblaje de una NRPS. PCP: proteína acarreadora. A: adenilación C: condensación TE: tioesterasa (Concurso y Bruner S, 2012).

También existe una agrupación de genes que contienen NRPS/PKS, que codifican la formación de productos derivados del híbrido. Los compuestos sintetizados por este sistema híbrido pueden ser divididos en dos clases: el primero incluye los productos sintetizados de manera individual por los NRPS y PKS, los cuales, finalmente se acoplan en un producto híbrido final. En la segunda clase las enzimas NRPS y PKS están funcionalmente conectadas, lo que conduce directamente a un metabolito híbrido péptido-policétido (Nikolouli y Mossialos, 2012).

Las enzimas policétido sintasa PKS-I y PKS-II y las péptido sintasa no-ribosomales (NRPS) son las que han sido descritas extensamente en los actinomicetos como las responsables de la biosíntesis de una diversa y amplia gama de metabolitos secundarios.

Los actinomicetos poseen grandes genomas y utilizan una fracción sustancial de su capacidad codificada (5-10%) para la producción de la mayoría de los metabolitos secundarios (Zhang *et al.*, 2020). En los genomas de bacterias menores a 3 MB, los genes NRPS y PKS son raros o ausentes. En bacterias con genomas mayores de 5 MB, la correlación entre el tamaño del genoma y el número de clusters de genes de PKS y NRPS es lineal, esto significa que el porcentaje de la capacidad de codificación dedicado a estos genes incrementa con el tamaño del genoma. En un genoma lineal de 9.0 MB, los genes de metabolitos secundarios comprenden el 6.6% del genoma (Ikeda *et al.*, 2013).

La exploración del genoma de los actinomicetos para la detección de los genes PKS y NRPS se emplea para descubrir su potencial en la producción de compuestos bioactivos. Mediante el análisis bioinformático de sus secuencias se pueden descubrir nuevas vías biosintéticas y predecir su producto natural correspondiente (Nikolouli y Mossialos, 2012). Diversas investigaciones se han realizado en diferentes nichos ecológicos para el

aislamiento de actinomicetos y la detección de estos genes biosintéticos. Ding *et al.* (2013) aislaron cepas de suelos en el noreste de la meseta del Tibet, pertenecientes a los géneros *Micromonospora*, *Streptomyces* y *Streptosporangium* con actividad antimicrobiana. La mayoría de las cepas tuvo la presencia de genes que codifican NRPS, PKS-I y PKS-II, muchos de estos pertenecían al género de *Streptomyces*. Una de las cepas de este género la SD-31 presentó genes NRPS y PKS-II y fue seleccionada para el estudio de su producto bioactivo. El resultado mediante HPLC-MS mostró que podría producir granatomicina A, granatomicina C y un compuesto no conocido. Las granatomicinas son antibióticos de tipo naftoquinonas, son policétidos aromáticos en cuya síntesis intervienen las enzimas policétido sintasa de tipo II.

Li *et al.* (2014) obtuvieron de un coral cepas de actinomicetos con actividad antimicrobiana. En siete de quince cepas analizadas, se les detectó genes PKS-I y NRPS, nueve poseen PKS-II. A partir de la deducción de las secuencias de aminoácidos de los genes usando GenBank BASTP, se determinó que una de las secuencias de PKS-I posee un porcentaje de identidad de 91% fuertemente relacionada con el gen involucrado en la biosíntesis del antibiótico polieno FR-008 producido por *Streptomyces* sp. FR-008 (AAQ82568). Una secuencia de PKS-II mostró una identidad de 90% a nivel de aminoácidos a *Streptomyces argillaceus* ATCC 12956, el cual produce el antibiótico antitumoral mitramicina. Otra secuencia de PKS-II presentó un porcentaje alto de identidad de 99% con la sintasa  $\beta$ -cetoacil de *Micromonospora* sp. L5 involucrada en la producción de antraciclina, incluyendo alcacinomicinas y daunorubicina-dexorubicina. La secuencia de PKS-II de uno de los aislados mostró un porcentaje de identidad de aminoácidos de 99% con la sintasa ceto de *Streptomyces maritimus* productora de enterocina. Cuatro secuencias de NRPS presentaron porcentajes de identidad menores a 70%, esto sugiere que podrían ser genes novedosos.

Saker *et al.* (2015) colectaron suelos de dos regiones áridas del Sahara y obtuvieron 69 aislados de actinomicetos, de los cuales 47 presentaron actividad antimicrobiana. Las cepas no activas se analizaron para detectar la presencia de genes PKS y NRPS. Los resultados mostraron que el 87% de estos aislados presentaron los genes NRPS, el 50% los PKS-II y el 16% los PKS-I. Los autores comentan que el medio de cultivo utilizado en este estudio pudo no haber provisto de todas las condiciones fisicoquímicas y nutricionales necesarias para estimular la producción de metabolitos secundarios bioactivos en estos aislados, a pesar de que presentan los genes que confirman su potencial biosintético.

Debido a que los actinomicetos poseen una codificación mayoritaria en su genoma para las funciones de PKS y NRPS, son considerados como los líderes en la producción de metabolitos secundarios bioactivos, lo que justifica el reorientar los esfuerzos en el descubrimiento de sus metabolitos secundarios (Hwang *et al.*, 2013).

### 1.1.5 Activación del metabolismo secundarios de los actinomicetos

Los actinomicetos pueden variar su metabolismo biosintético cuando son cultivados *in vitro*, en consecuencia, ciertos metabolitos se producen sólo bajo ciertas circunstancias que le proporcionan ventajas selectivas *in situ* (Rebets *et al.*, 2014). Debido a esto, diferentes estrategias se han empleado en estos microorganismos para estimular la biosíntesis de compuestos activos en su metabolismo secundarios. Una de estas estrategias es la manipulación de las condiciones de su cultivo en el entorno ambiental (factores abióticos y bióticos) y en la nutrición, logrando un completo cambio en el perfil metabólico que conduce a una diversidad química, influyendo incluso en su cantidad, esta estrategia se denomina por sus siglas en inglés como OSMAC (one strain many compounds, en inglés) que significa "una cepa, muchos compuestos" (Baral *et al.*, 2018)

En lo que respecta al tipo de nutrientes, las fuentes de carbono y nitrógeno son factores muy importantes en la producción de metabolitos secundarios. La disponibilidad del sustrato para la biosíntesis de metabolitos se relaciona con la modulación del proceso enzimático, activando y estabilizando las enzimas involucradas en el proceso. Los azúcares como la glucosa se usan habitualmente como fuente de carbono para el crecimiento y la producción de metabolitos durante la fermentación. Sin embargo, la producción de algunos metabolitos se reprime en la presencia de este sustrato, inhibiendo enzimas involucradas en el proceso, y en consecuencia, conduce a la activación de otras vías metabólicas (Escher *et al.*, 2016; El-Naggar *et al.*, 2015). Diversos estudios en la producción de varios antibióticos tales como actinorrodina, cloranfenicol, cefamicina, actinomicina, kanamicina, eritromicina, estreptomina y puromicina, han revelado que la glucosa bloquea su síntesis. Lo anterior ocurre porque sus enzimas son reguladas por el catabolismo del carbono. Si existe un rápido consumo de fuentes de carbono tales como la glucosa, se inhibe la actividad de las enzimas catabólicas en los procesos de síntesis de estos compuestos (Wezela y McDowall, 2011). Esto también sucede, en la producción del antifúngico contra *C. albicans* denominado bahamaolida A, cuando *Streptomyces* sp. CNQ343 se cultiva en presencia de glucosa, se

presenta una inhibición moderada de la levadura; por el contrario, cuando el actinomiceto es cultivado en acetato, el cultivo presenta una potente actividad inhibitoria (Lee *et al.*, 2014).

La producción de diversos compuestos de interés industrial es regulada por la fuente de nitrógeno, que afecta tanto el metabolismo primario como secundario. Cuando en el medio de cultivo existe un sustrato nitrogenado de fácil asimilación, el carbono se utiliza para el crecimiento generando biomasa. Cuando menos carbono está disponible para el metabolismo secundario, como consecuencia las enzimas que intervienen en la creación de los metabolitos se reprimen y al agotarse el sustrato las otras fuentes, como el nitrógeno se utilizan para la biosíntesis. Un ejemplo de esto, ocurre cuando *Streptomyces venezuelae* es cultivado en un medio que contiene amonio y nitrato, la producción de cloranfenicol se retrasa hasta que el amonio se haya consumido y el crecimiento del actinomiceto permanece lento hasta el posterior consumo del nitrato. Por lo tanto, para la producción de metabolitos secundarios es importante utilizar diversas fuentes de nitrógeno, por ejemplo, la harina de soya se utiliza como una fuente de proteínas en los medios complejos y en medios definidos se utilizan aminoácidos lentamente asimilables como la prolina (Meurant, 2012; Wezela y McDowall, 2011). En la síntesis de las agliconas de los macrólidos, la alta concentración de  $\text{NH}_4^+$  regula negativamente el catabolismo de aminoácidos tales como la treonina, valina, y ácido succínico, dando como resultado un suplemento limitado de ácidos grasos necesarios para su producción (Zhu *et al.*, 2014; Ruiz *et al.*, 2010;). Diferentes estudios reportan el empleo de fuentes nutricionales complejas de carbono y nitrógeno, tales como el almidón y la harina de soya, entre otros, como efectivos en el incremento de metabolitos activos (Cuadro 1.3).

**Cuadro 1.3** Ejemplos de fuentes de carbono y nitrógeno que influyen en el incremento de metabolitos activos sintetizados por actinomicetos aislados de diferentes suelos.

Fuente de carbono	Fuente de nitrógeno	Referencia
Glicerol	Triptona	Banga <i>et al.</i> , 2008
Almidón	Nitrato de sodio	Houssam, <i>et al.</i> , 2011
Manitol	Asparagina	Naragani <i>et al.</i> , 2014
Celobiosa	Peptona	Holkar <i>et al.</i> , 2013
Sucrosa	Peptona de soya	Mangamuri <i>et al.</i> , 2014
Lactosa	Asparagina	Narangani <i>et al.</i> , 2014
Glucosa	Harina de soya	Bahavana <i>et al.</i> , 2014
Glicerol	Peptona	Al-Hulu <i>et al.</i> , 2015

Múltiples trabajos de investigación han empleado el enfoque OSMAC junto con otras estrategias para identificar o descubrir productos naturales de cepas que no se conocían como productoras de compuestos bioactivos. Una combinación del enfoque OSMAC y la minería genética (búsqueda en el genoma) en *Streptomyces coelicolor* llevó a la identificación y el aislamiento del sideróforo coelichelin biosintetizado vía NRPS. Los investigadores utilizaron el análisis *in silico* para predecir la estructura química y propiedades del metabolito secundario codificado por un grupo de genes encriptados. Su hipótesis de que el metabolito actuaría como agente quelante de Fe<sup>3+</sup> fue crítico para la selección de las condiciones de cultivo utilizadas para identificar el compuesto correspondiente. Se encontró que *S. coelicolor* acumula coelichelin cuando crece en deficiencia de hierro, pero no en los medios de cultivo ricos en hierro (Challis, 2014; Yague *et al.*, 2013).

Para estudiar la influencia de las fuentes de nitrógeno en la producción de rifamicina SV en *Amicolaptosis mediterranei* U32, se probaron el nitrato y el amonio, así como su mezcla. El nitrato fue la fuente de nitrógeno que estimuló notablemente el rendimiento de rifamicina SV. El nitrógeno total no fue el factor limitante para la producción de rifamicina SV, ya que en la mezcla de amonio y nitrógeno se obtuvo el mismo rendimiento que en la condición de nitrato (Shao *et al.*, 2015).

La concentración de la fuente de nitrógeno también influye en la expresión de los genes involucrados en la biosíntesis de antibióticos. Wei *et al.*, (2012), optimizaron la concentración de diferentes fuentes de nitrógeno en la producción del antibiótico validamicina A sintetizado por *Streptomyces hygroscopicus* 5008. El nivel de la expresión de los genes biosintéticos *valABC*, *valKLMN* y *valG* disminuyó cuando el microorganismo se cultivó con concentraciones mayores de las fuentes de nitrógeno empleadas en el estudio (harina de soya y extracto de levadura), influyendo en el rendimiento del antibiótico.

## 1.2 *Candida albicans*

Los hongos levaduriformes pertenecientes al género *Candida* forman parte de la microbiota normal de la cavidad oral, del tracto intestinal y del vaginal. Sin embargo, cuando su nivel de colonización es alto pueden ser agentes patógenos causantes de infecciones invasivas y superficiales en las mucosas de estos tejidos, produciendo varias enfermedades, tales como la candidiasis vaginal y oral, enfermedades del intestino (enfermedad de Crohn y la colitis ulcerosa), (Whaley *et al.*, 2017). También pueden producir infecciones sistémicas potencialmente mortales que se adquieren generalmente a través de las superficies mucosas, esto último ocurre principalmente en pacientes inmunocomprometidos, por lo cual las especies de *Candida* spp. son un problema cada vez mayor en el sector salud (Arendrup y Patterson 2017; Naglik *et al.*, 2014).

La especie más común que produce infecciones en la mucosa humana es *C. albicans*. Esta levadura presenta una característica crítica de patogenicidad por su capacidad para cambiar de levadura a la forma de hifa (dimorfismo). La formación de hifas le confiere los atributos de virulencia mediante la inserción y la invasión epitelial. *C. albicans* interactúa con las proteínas epiteliales y desencadena la endocitosis, proporcionando un mecanismo de entrada en las células epiteliales y su invasión. Otros factores de virulencia relacionados con esta característica son la producción de enzimas hidrolíticas (proteasas, fosfolipasas y hemolisinas), que juegan un papel importante en la penetración, invasión y destrucción de los tejidos; y la adherencia para la formación de biopelículas (Córdova-Dávalos *et al.*, 2018; Zhu *et al.*, 2012). Se han encontrado cepas de *C. albicans* resistentes a diferentes antifúngicos, las cuales presentan una menor expresión de los genes que regulan la síntesis de ergosterol, lo que produce un menor contenido en su membrana celular. Estudios recientes han demostrado una reducida actividad de anfotericina B y fluconazol frente a esas cepas, lo que indica que la pobre actividad de estos antifúngicos podría estar

relacionada con esta alteración, debido a que la anfotericina B se une al ergosterol desestabilizando la membrana y el fluconazol inhibe su síntesis (Hsu *et al.*, 2019, Mahmoudabadi *et al.*, 2014), por lo cual es necesario buscar otros antifúngicos para combatir esa resistencia.

### 1.3 Actinomicetos aislados de suelos de Campeche y Tabasco

Los suelos tropicales se encuentran en la zona que se extiende entre el Trópico de Cáncer y el Trópico de Capricornio, estos incluyen la mayor parte de América Latina, África, la India, Asia Meridional y aproximadamente la mitad de Australia. Estos suelos están expuestos a un clima caracterizado por altas temperaturas, con muy pocas variaciones durante el año y abundantes precipitaciones durante casi seis meses. Estos factores climáticos ocasionan que los procesos ecológicos de transferencia de materia y energía realizada por su microflora ocurran mucho más rápido, caracterizándose por presentar altas tasas de descomposición, formando una biomasa con concentración de nutrientes, alta biodiversidad, velocidad en el ciclaje de nutrientes del complejo suelo-planta, sucesiones rápidas y cadenas tróficas complejas (McCracken *et al.*, 1983). Los actinomicetos tienen un papel importante en la producción de humus en este tipo de suelos, debido a que son continuamente activos porque poseen una versatilidad morfológica y metabólica. Presentan ciclos de rápida proliferación y esporulación, mantienen poblaciones por prolongados periodos, porque sintetizan una mayor diversidad de exoenzimas que les confiere la capacidad de usar como fuente de nitrógeno, carbono y energía de la materia orgánica compleja de difícil degradación, por lo tanto, su presencia es muy significativa en los ciclos geoquímicos.

En la Universidad Juárez Autónoma de Tabasco, se realizó un proyecto de investigación enfocado al aislamiento de actinobacterias tropicales. Un total de 90 cepas de actinomicetos se aislaron a partir de suelos colectados en las localidades de Calakmul, Campeche; Florida, Puyacatengo y Cocona en Tabasco (De la Rosa, com. pers.).

A todos los aislados se les realizó la caracterización morfológica, pruebas bioquímicas y el método de la estría cruzada (cross-streak), para el bioensayo de la actividad antimicrobiana contra las bacterias Gram positivas *Staphylococcus aureus* y *Bacillus subtilis*, la bacteria Gram negativa *Escherichia coli* y el hongo levaduriforme *C. albicans*. Un total de 18 aislados presentaron actividad contra al menos uno de los patógenos evaluados, 15 de estos inhibieron a *C. albicans*.

Los aislados que presentaron actividad antifúngica, se cultivaron en diferentes medios de cultivo utilizando el método de difusión en disco de agar, con la finalidad de seleccionar el medio de cultivo adecuado para la producción de su actividad. En el medio agar International Streptomyces Project 2 (ISP2), la mayoría de los aislados presentaron mayor actividad, con halos de inhibición  $\geq 15$  mm contra *C. albicans* (De la Rosa, com. pers.).



## JUSTIFICACIÓN

La levadura *C. albicans* es el principal agente etiológico, de infecciones tanto en la mucosa como en los tejidos profundos en humanos. La importancia de este patógeno radica en las altas tasas de morbilidad, mortalidad y al aumento en los costos de la atención y la duración de la hospitalización, representando un grave problema de salud pública. El incremento de resistencia por parte de este patógeno y el número restringido de antifúngicos para contrarrestarlo, ha ocasionado que las infecciones sean cada vez más difíciles de tratar al no responder a tratamientos habituales. Debido a esto, existe la necesidad urgente de descubrir nuevos compuestos antimicóticos (Dadar, *et al.*, 2018; Lai *et al.*, 2012).

Los miembros del género *Streptomyces* son ampliamente conocidos por ser productores prolíficos de productos naturales, por su enorme capacidad para biosintetizar metabolitos secundarios con estructuras y actividad biológica altamente diversas, incluyendo actividades antimicrobianas, por lo cual son buenos candidatos para encontrar nuevos compuestos antifúngicos. La biosíntesis de una gran cantidad de metabolitos activos producidos por los actinomicetos, es dependiente de las enzimas policétido sintasas (PKS) y sintasas no ribosómicas (NRPS). Los genes que codifican estas enzimas están siendo utilizados para revelar el potencial biosintético de productos naturales en los microorganismos aislados. Sin embargo, la detección de estos genes asociados a los clusters biosintéticos no garantizan su expresión, por lo cual es necesario recurrir a una serie de estrategias para activarlos, como someter los cultivos a diferentes condiciones nutricionales principalmente en lo que respecta a las fuentes de carbono y nitrógeno (Chater *et al.*, 2016; Olano *et al.*, 2014; Palomo *et al.*, 2013).

A la fecha se tienen 15 cepas de actinomicetos con actividad anti-*Candida*, obtenidas de suelos mexicanos tropicales, cuyas características morfológicas y bioquímicas indicaron que pertenecen al género *Streptomyces*. Sin embargo, se desconoce la especie a la que pertenecen, el tipo de genes PKS y NRPS que poseen, sus metabolitos secundarios relacionados con su actividad antifúngica y las condiciones nutricionales de carbono y nitrógeno que influyen en el aumento o disminución de dicha actividad. Los resultados obtenidos, facilitarán la optimización de la producción del metabolito antifúngico de interés, así como una bioprospección de su potencial metabólico.

## HIPÓTESIS

Los actinomicetos tropicales, al ser cultivados en diferentes fuentes nutricionales de carbono y nitrógeno, aumentan su actividad antifúngica contra *Candida albicans*.

## OBJETIVO GENERAL

Caracterizar molecularmente y evaluar la actividad anti-*Candida* de cepas seleccionadas de *Streptomyces*, aisladas en suelos de Tabasco, México, cultivadas en diferentes fuentes de carbono y nitrógeno.

## OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Identificar molecularmente los actinomicetos aislados de suelos del trópico mexicano.
2. Seleccionar los actinomicetos que presenten la mayor actividad contra *Candida albicans* para su cultivo y detectar sus genes PKS y NRPS.
3. Determinar la actividad antifúngica de los sobrenadantes y los extractos orgánicos de los actinomicetos seleccionados, cultivados en diferentes fuentes nutricionales de carbono y nitrógeno.
4. Analizar el perfil químico de los extractos orgánicos activos obtenidos de los cultivos seleccionados mediante cromatografía de líquidos acoplado a espectrometría de masas.

## ESTRATEGÍA EXPERIMENTAL

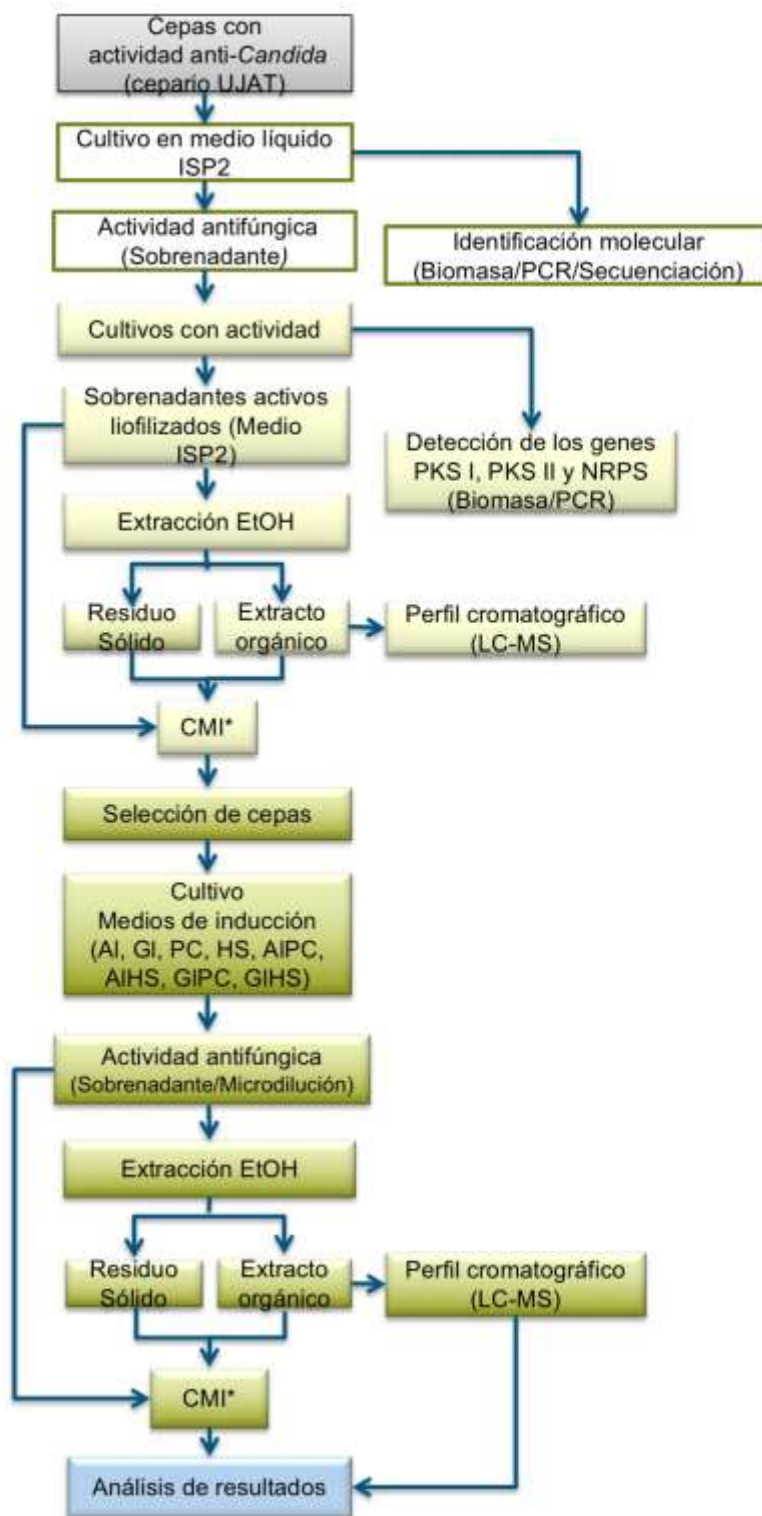


Figura 1.6 Diagrama general de la estrategia experimental. \*Concentración Mínima Inhibitoria.



## CAPITULO II

### IDENTIFICACIÓN MOLECULAR Y EVALUACIÓN ANTI-CANDIDA DE ACTINOMICETOS AISLADOS DE SUELOS TROPICALES MEXICANOS

#### 2.1 INTRODUCCIÓN

En la actualidad, el incremento en el número de cepas patógenas que han creado resistencia a los productos antimicóticos es considerada como una emergencia. Esto se ha observado durante la terapia de infecciones que se presentan en la población de edad avanzada, en pacientes inmunosuprimidos, en el trasplante de órganos y tejidos, entre otros. En levaduras patógenas como las del género *Candida*, entre las que destaca la especie *C. albicans*, poseen la capacidad de adquirir resistencia a múltiples drogas, lo que ha contribuido a la difícil tarea de tratar las infecciones micóticas de la mucosa y tejidos internos (Ayari *et al.*, 2016; Pappas *et al.*, 2016).

En comparación con la terapia antibacteriana, los tratamientos antifúngicos son limitados en cuanto a su disponibilidad y su eficacia, siendo la mayoría fungistáticos. Por lo tanto, el reducido número de fármacos disponibles para el tratamiento de las infecciones micóticas y la resistencia a los agentes antifúngicos estimulan la búsqueda de nuevos y eficientes antimicóticos (Butts y Krysan, 2012).

Para satisfacer esta necesidad clínica, la detección de metabolitos secundarios con actividad antimicrobiana en actinomicetos procedentes de hábitats inexplorados, brinda la posibilidad de generar compuestos antifúngicos. Su caracterización taxonómica es muy importante en la búsqueda de estos productos naturales, porque además de conocer su biodiversidad y la oportunidad de descubrir nuevas especies o géneros, proporciona información sobre si sus metabolitos bioactivos son o no novedosos. Para su clasificación e identificación se emplean diferentes características morfológicas, fisiológicas, ecológicas y moleculares (Goodfellow *et al.*, 2017; Singh *et al.*, 2016; Zapata-González *et al.*, 2012).

Muchas especies nuevas de actinomicetos han sido caracterizadas y nombradas. De ellas se han extraídos diferentes compuestos activos empleando diversas técnicas de producción y purificación. Los géneros que son considerados como una fuente importante de metabolitos para la medicina son *Micromonospora*, *Salinispora*, *Nocardia* y *Streptomyces*, este último es el más notable porque sintetiza metabolitos con diferentes actividades biológicas (antibacterial, antifungica, antiviral, antitumoral, inmunosupresora, entre otras) de

gran interés en la industria farmacéutica (Carro *et al.*, 2018; Ng *et al.*, 2018; Dhakal *et al.*, 2017; Rasouli-Nasab *et al.*, 2017)

En suelos tropicales de los estados de Campeche y Tabasco se aislaron actinomicetos que presentaron actividad antifúngica contra *Candida albicans* en el medio de agar ISP2, empleando los métodos de estría cruzada (cross-streak) y discos de agar. A las cepas se les realizó la caracterización morfológica y bioquímica, sin embargo, se requiere de un estudio más detallado para su identificación. En este capítulo se incorpora la identificación molecular de los acinomicetos, mediante la secuenciación del gen 16s rRNA y su evaluación de su actividad antifúngica contra *C. albicans* cuando son cultivados en el medio líquido ISP2.

## 2.2 MATERIALES Y MÉTODOS

### 2.2.1 Microorganismos

Los actinomicetos provienen del cepario de la División académica de Ciencias Biológicas de la Universidad Juárez Autónoma de Tabasco (UJAT). Estos se aislaron de suelos de diferentes localidades de Campeche y Tabasco (Cuadro 2.1).

**Cuadro 2.1** Clave, origen y características fisicoquímicas del lugar de aislamiento de los actinomicetos estudiados.

Clave	Origen	Características fisicoquímicas	Municipio/estado
S1A-33			
S1A-38			
S1A-39			
S1A-61	Calakmul	pH 7.8	
S1A-65	18° 32' 53.6" N	Temperatura	Calakmul,
S1A-66	18° 56' 23.4" O	33.2 °C	Campeche
S1A-75			
S1A-77B			
S1A-87			
S2A-04	Florida	pH 4.2	Tacotalpa,
	17° 27.8' 33" N	Temperatura	Tabasco
	99° 45' 99" O	27 °C	
S3A-03	Puyacatengo	pH 5.9	
S3A-05	17° 31' 34.2" N	Temperatura	Teapa
S3A-09	92° 55' 31" O	28 °C	Tabasco
S6A-01	Cocona	pH 5.05	

---

S6A-03	17° 33' 46.6 N	Temperatura
	92° 55' 31" O	28 °C

---

### 2.2.2 Cultivos de cepas actinomicetales en el medio ISP2

Todos los actinomicetos se cultivaron en el medio Internacional Streptomyces Project 2 (ISP2) en tubos inclinados (10.0 g de extracto de maltosa, 4.0 g de glucosa, 4.0 g de extracto de levadura, 15 g de agar por litro de medio y pH 7). Los tubos se incubaron por 7 días a 30 °C. Después de este tiempo, el crecimiento hifal se resuspendió en 2 mL de solución fisiológica estéril (0.85% NaCl) y se transfirió a matraces Erlenmeyer con 60 mL de medio líquido ISP2 para el precultivo. Los matraces se incubaron a 28 °C, con agitación de 150 rpm por 7 días. Después de la incubación 10 mL del precultivo se agregaron a 90 mL del mismo medio. Esto se realizó por triplicado para cada uno de los actinomicetos. Después de dos semanas de incubación, los cultivos se centrifugaron a 3,220 × g/15 min a 4 °C. Se separó el líquido sobrenadante de la biomasa y se determinó el pH. Cada sobrenadante (1×) se reduce a la mitad de su volumen final por liofilización (Labconco FreeZone 2.5, modelo 7670520, Houston, TX, USA), obteniéndose el sobrenadante concentrado (2×) el cual fue evaluado en el bioensayo antifúngico con *C. albicans*. La biomasa obtenida se congeló a -80 °C para la extracción de ADN.

### 2.2.3 Extracción de ADN

La extracción de ADN genómico se realizó según metodología (Tapia-Tussell *et al.*, 2006). La biomasa de los cultivos de actinomicetos en el medio ISP2 congelada a -80 °C se maceró hasta obtener una consistencia de polvo. La muestra se colocó en un tubo para microcentrífuga. Se le agregó 1000 µL de SDS al 20%, 15 µL de proteinasa K (Promega) y 15 µL de RNAsa (PureLink Rnase A, Invitrogen). La mezcla se incubó a 65 °C por 60 min. Después se le agregó 600 µL de cloroformo, se agitó por 10 min. Se centrifugó a 15,682 × g/10 min. Un volumen de 800 µL del sobrenadante se transfieren a un tubo de microcentrífuga de 1.5 mL, se le agregó 800 µL de isopropanol frío, se homogeneizó por inversión y la mezcla se colocó a -80 °C por 15 min. Después se centrifugó a 15,682 × g/10 min, el sobrenadante se decantó lentamente, se le agregó 150 µL de etanol al 70% (v/v), se homogeneizó y se centrifugó a 15,682 × g/10 min, se decantó lentamente, la pastilla se dejó secar a temperatura ambiente durante 30 min. El ADN se resuspendió con 50 µL de agua destilada ultrapura (Invitrogen). Se realizó una electroforesis en agarosa al 0.8% (p/v), con

bromuro de etidio a una concentración de 1 µg/mL. La electroforesis se corrió a 100 V por 30 min en la solución amortiguadora Tris-Borato-EDTA 1X (TBE). Transcurrido el tiempo las bandas se visualizaron en un fotodocumentador Gel Doc Ez image (Bio-Rad) utilizando el software Image Lab versión 5.1 (BioRad). La cuantificación y la calidad del ADN se realizó en un NanoDrop 2000 Thermo Scientific.

#### **2.2.4 Amplificación y secuenciación del gen 16S rRNA**

La amplificación del gen 16S rRNA se realizó empleando los cebadores 8F 5'AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3' (Forward) y 1492R 5'-GGT TAC CTT GTT ACG ACT T-3' (Reverse) (Yuan *et al.*, 2014). Para la reacción se emplearon 100 ng de ADN, 0.5 µM de cada iniciador, 0.20 µM de nucleótidos (dNTPs) y 1 U de Taq polimerasa DNA (Invitrogen) en un volumen final de 50 µL. La amplificación se llevó a cabo en un termociclador C100 touch (Bio-Rad) con una fase inicial de desnaturalización del ADN de 5 min a 95 °C; 30 ciclos de 45 s a 95 °C, alineamiento de 45 s a 55 °C, una extensión a 72 °C durante 1.5 min, seguido de una extensión final a 72 °C por 8 min. Los productos de PCR se conservaron a 4 °C.

Los productos de amplificación se les realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1.5% (p/v) en TBE 1X con bromuro de etidio a una concentración de 1 µg/mL. Se empleó el marcador 1 Kb plus DNA ladder. El gel se colocó en una cámara de electroforesis que contenía buffer TBE 1X y se corrió a 100 V por 40 min. Transcurrido el tiempo los amplicones se visualizaron con un fotodocumentador Gel Doc Ez image (Bio-Rad) utilizando el software Image Lab versión 5.1 (BioRad). Los productos de amplificación son de aproximadamente 1500 pb.

Los productos de la amplificación se secuenciaron en ambos sentidos por la empresa Macrogen en Corea. Las secuencias obtenidas fueron editadas y procesadas en el programa BioEdit versión 5.0.9 (Hall,1999). Se alinearon con otras secuencias reportadas en las bases de datos del Ribosomal database Project (RDP) para su identificación molecular. Una identidad del 99% en la secuencia del gen 16S rRNA fue el criterio utilizado para identificar un aislado a nivel de especie. El criterio utilizado para identificar un organismo a nivel de género fue una identidad del 97 al 99% en la secuencia del gen 16S rRNA y la identidad del 97% en la secuencia del gen 16S rRNA fue el criterio utilizado para definir una especie bacteriana potencialmente nueva (Drancourt *et al.*, 2004). A los aislados que



presentaron actividad se les realizó un árbol de distancia génica con el programa Mega 5.1 (Tamura, 2011) usando el método UPGMA.

### 2.2.5 Bioensayo antifúngico de los sobrenadantes

Los sobrenadantes de los cultivos, se concentraron a la mitad de su volumen original (2x) mediante liofilización (Labconco FreeZone 2.5, model 7670520, Houston, TX, USA) y se esterilizaron por filtración a través de una membrana de 0.25  $\mu\text{m}$  (Millipore). El bioensayo se realizó en placas de 96-micropozos. Un volumen de 100  $\mu\text{L}$  de cada sobrenadante esterilizado se depositó en cada micropozo, después se les adicionaron 100  $\mu\text{L}$  de la suspensión de *C. albicans* ( $1.5 \times \text{UFC/mL}$ ). Como control positivo se empleó Miconazol (1  $\mu\text{g/mL}$ ) y como control negativo el medio ISP2. Las microplacas se incubaron a 37 °C por 24 h; después de este tiempo, se replicaron todas las muestras, las cuales se inocularon en agar Saboraud. A continuación, a todos los micropozos se les adicionó 50  $\mu\text{L}$  de cloruro de 2,3,5-trifenil tetrazolium (TTC) al 1% (p/v). Las microplacas con TTC y las placas de replicación se incubaron a las mismas condiciones previamente descritas. La nula coloración de rosa a rojo en las microplacas con TTC y la falta de desarrollo de la levadura en las placas de replicación, se interpretó como actividad antifúngica contra *C. albicans* (Cantón-Lacasa *et al.*, 2007; CLSI, 2008).

## 2.3 RESULTADOS

### 2.3.1 Identificación molecular

La identificación molecular de los quince aislados reveló que pertenecen a dos familias, *Streptomycetaceae* y *Pseudonocardiaceae*. Catorce de los cuales (93% del total) pertenecen al género *Streptomyces*, con un porcentaje de similitud mayor al 99%. De las 15 cepas estudiadas, se identificaron seis especies del género *Streptomyces*: cuatro aislados (27%) correspondieron a *Streptomyces resistomycificus*, tres (20%) a *Streptomyces griseochromogenes*, dos (13%) a *Streptomyces angustmyceticus*, dos (13%) a *Streptomyces manipuerensis*, y una cepa de *Streptomyces catenulae*, *Streptomyces libani* y *Streptomyces parvisporogenes*. Sólo un aislado se identificó como *Amicolaptopsis xylanica* con un porcentaje de similitud del 97% (cuadro 2.2).

En la Figura 2.1 se observa la distribución de las especies de las cepas estudiadas. Nueve de ellas se obtuvieron del suelo de Calakmul, Campeche, en el municipio con el mismo

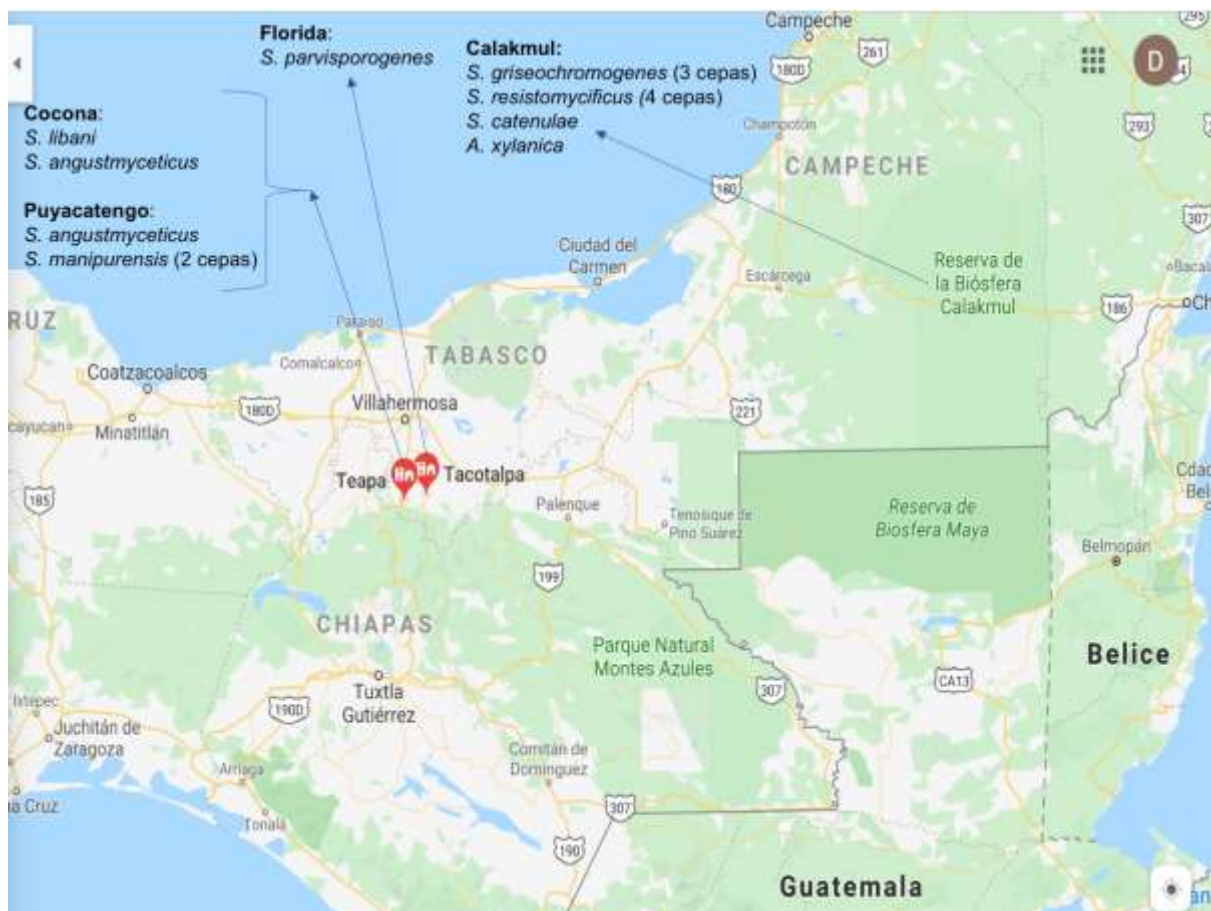
nombre. La especie más abundante en esta región correspondió a *S. resistomycificus* con cuatro cepas (44%), seguida de *S. griseochromogenes* con tres cepas (33%). En este mismo suelo se identificaron dos especies: *S. catenulae* y *A. xylanica*. Este suelo posee un pH de 7.8 y una temperatura de 33°C (Cuadro 2.1).

De las seis cepas originarias de Tabasco, dos se aislaron de Cocona y tres de Puyacatengo (ambas poblaciones pertenecientes al municipio de Teapa), mientras que una se obtuvo del municipio de Tlacotalpa en la Florida. En el presente trabajo, las especies más abundantes en esta región correspondieron a *S. angustmyceticus* y *S. manipurensis* con un porcentaje de 33% cada una. Seguidas de las especies *S. parvisporogenes* y *S. libani* con un 17% cada una. *Streptomyces angustmyceticus* se aisló en suelos con pH de 5.05 (Cocona) y 5.9 (Puyacatengo), *S. libani* solamente en pH de 5.05 (Cocona), *S. manipurensis* en pH de 5.9 (Puyacatengo) y *S. parvisporogenes* en pH de 4.2 (Florida), mientras que el rango de temperaturas oscilaba en 27-28 °C, entre los sitios de colecta (Cuadro 2.1, 2.2 y Figura 2.1).

**Cuadro 2.2** Identificación molecular de los aislados de actinomicetos tropicales, mediante las secuencias del gen 16S rRNA (Ribosomal Database Project).

Clave	Lugar de aislamiento	Identificación molecular	Número de accesión (GenBank)	% de identidad
S1A-33		<i>Streptomyces griseochromogenes</i>	AJ399491	99
S1A-38		<i>Streptomyces resistomycificus</i>	AJ399472	99
S1A-39		<i>Streptomyces griseochromogenes</i>	AJ399491	99
S1A-61		<i>Streptomyces resistomycificus</i>	AJ399472	99
S1A-65	Calakmul, Campeche	<i>Streptomyces griseochromogenes</i>	AJ399491	99
S1A-66		<i>Streptomyces resistomycificus</i>	AJ399472	99
S1A-75		<i>Streptomyces catenulae</i>	FJ486481	99
S1A-77B		<i>Streptomyces resistomycificus</i>	AJ399472	99
S1A-87		<i>Amycolatopsis xylanica</i>	FJ529702	97
S2A-04	Florida, Tabasco	<i>Streptomyces parvisporogenes</i>	AJ7813481	100
S3A-03		<i>Streptomyces angustmyceticus</i>	AB184817	99
S3A-05	Puyacatengo, Tabasco	<i>Streptomyces manipurensis</i>	JN560156	100
S3A-09		<i>Streptomyces manipurensis</i>	NR118275	100
S6A-01	Cocona, Tabasco	<i>Streptomyces libani</i>	HQ244464	99
S6A-03		<i>Streptomyces angustmyceticus</i>	AB184816	100

S1A: Calakmul, Campeche. S2A: Florida, Tabasco, S3A: Puyacatengo, Tabasco, S6A: Cocona, Tabasco.



**Figura 2.1** Distribución de las especies de las cepas estudiadas obtenidas en los suelos tropicales de Calakmul, Campeche; Florida, Puyacatengo y Cocona en Tabasco.

### 2.3.2 Actividad antifúngica

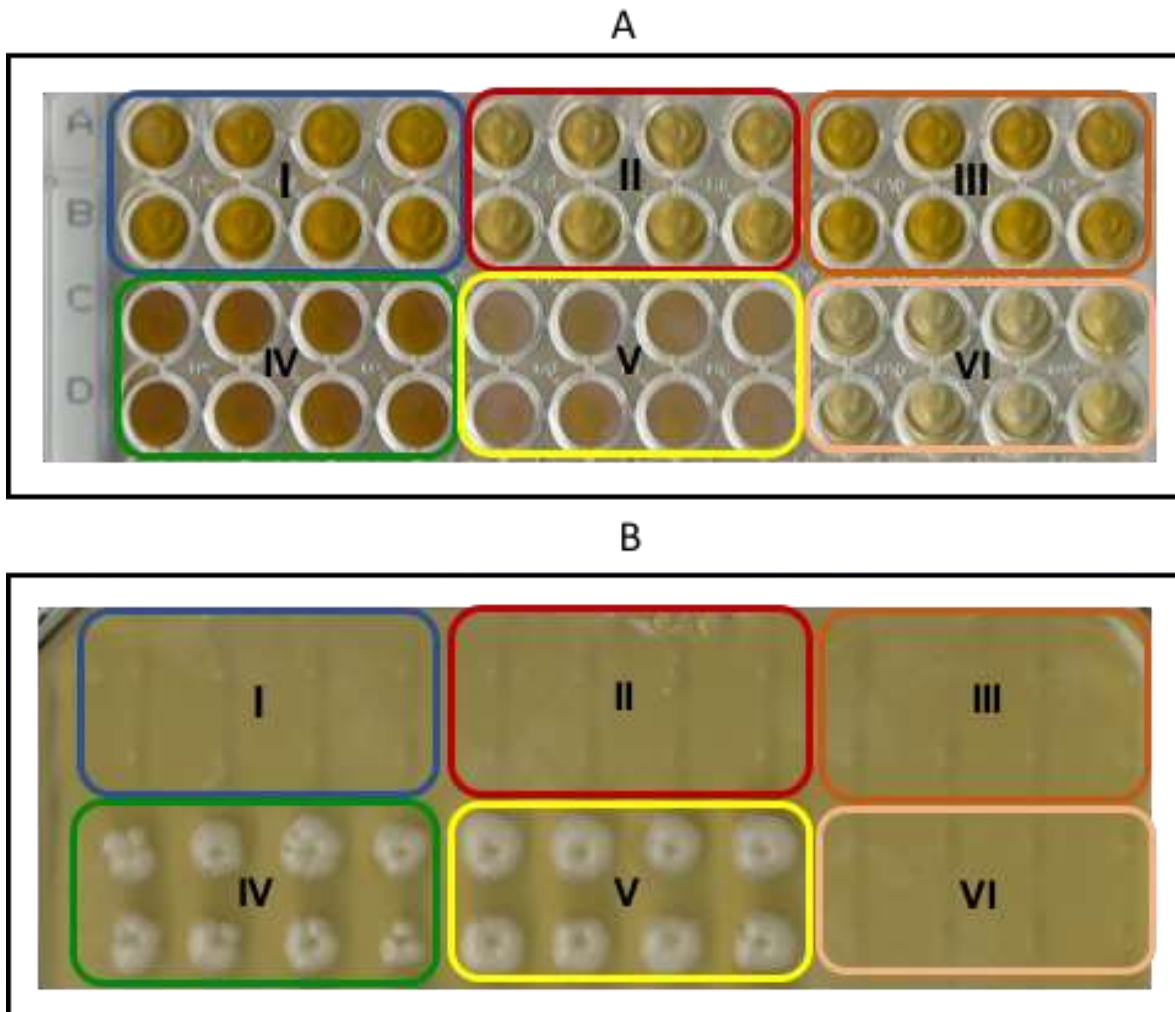
Los sobrenadantes de los cultivos mostraron variedad en el pH entre 5.32 y 8.48, con rendimientos de sólidos totales en los liofilizados entre 19-7.2 mg/mL. Las cepas *S. resistomycificus* S1A-77B, *S. manipurensis* S3A-05 y *S. manipurensis* S3A-09 presentaron en sus sobrenadantes valores de pH alcalinos (Cuadro 2.3).

**Cuadro 2.3** Actinomicetos tropicales aislados de suelos de Campeche y Tabasco cultivados en el medio líquido ISP2: pH, rendimientos de los sobrenadantes liofilizados y evaluación antifúngica de los sobrenadantes contra *C. albicans*.

Actinomiceto	pH final del cultivo	Rendimiento de SL (mg/mL)	<i>C. albicans</i>
<i>S. griseochromogenes</i> S1A-33	5.71	14.0	Na
<i>S. resistomycificus</i> S1A-38	5.61	19.0	Na
<i>S. griseochromogenes</i> S1A-39	5.25	15.0	Na
<i>S. resistomycificus</i> S1A-61	5.32	23.0	Na
<i>S. griseochromogenes</i> S1A-65	7.84	11.0	Na
<i>S. resistomycificus</i> S1A-66	5.33	19.0	Na
<i>S. catenulae</i> S1A-75	5.39	14.8	Na
<i>S. resistomycificus</i> S1A-77B	8.48	11.0	Na
<i>A. xylanica</i> S1A-87	5.25	15.0	Na
<i>S. parvisporogenes</i> S2A-04	7.75	7.0	A
<i>S. angustumyceticus</i> S3A-03	6.45	2.0	Na
<i>S. manipurensis</i> S3A-05	8.08	7.5	A
<i>S. manipurensis</i> S3A-09	8.42	10.0	A
<i>S. libani</i> S6A-01	7.08	8.1	Na
<i>S. angustumyceticus</i> S6A-03	6.28	7.0	Na

A: Activo. Na: No activo. SL: Sobrenadante liofilizado.

Los sobrenadantes de los cultivos de los actinomicetos, se evaluaron con el bioensayo antifúngico en microplaca contra la levadura *C. albicans*. Únicamente tres de ellos pertenecientes a las cepas *S. parvisporogenes* (S2A-04), *S. manipurensis* (S3A-05) y *S. manipurensis* (S3A-09) presentaron actividad contra *C. albicans* (Cuadro 2.3 y Figura 2.2 A) con un efecto fungicida en el crecimiento del patógeno (Figura 2.2 B).



**Figura 2.2** Ensayo antifúngico (Método de microplaca) contra *Candida albicans* de los sobrenadantes obtenidos de los actinomicetos cultivados en el medio ISP2 durante dos semanas contra *Candida albicans*. A) Revelado con TTC al 1%. B) Replicación en agar saboraud. I: *S. parvisporogenes* S2A-04. II: *S. manipurensis* S3A-05. III: *S. manipurensis* S3A-09. IV: *S. angustumyceticus* S6A-03. V: Control negativo (medio ISP 2). VI: Control positivo (miconazol (1 µg/mL)).

Los aislados que presentaron actividad contra el microorganismo evaluado se obtuvieron de suelos con pH ácido (4.2) y ligeramente ácido (5.9) en el estado de Tabasco (Cuadro 2.1).

## 2.4 DISCUSIÓN

Una taxonomía basada en árboles del gen 16S RNAr divide el phylum Actinobacteria en seis clases: *Actinobacteria*, *Acidimicrobiia*, *Coriobacteriia*, *Nitriliruptoria*, *Rubrobacteria* y *Termoleofilia*. La clase *Actinobacteria* contiene actualmente 16 órdenes, 14 subórdenes, 43 familias y 199 géneros. El orden *Actinomycetales* está restringido a los miembros de la familia Actinomycetaceae (Barka *et al.*, 2016; Kämpfer, 2015; Gao y Gupta, 2012; Goodfellow *et al.*, 2012). La similitud ADN:ADN se mantiene como el parámetro reconocido para delimitar especies. Un estudio más reciente, apoyado por pruebas estadísticas de validación cruzada, reveló que un valor del 98.65% de similitud del gen 16S RNA16r puede ser utilizado como umbral para la diferenciación de dos especies (Kim *et al.*, 2014). Además, se ha establecido que una similitud entre dos ARNr 16S igual o menor que el 94.5%, 86.5%, 82.0%, 78.5% ó 75.0% establece la distinción de género, familia, orden, clase y filo, respectivamente (Yarza *et al.*, 2014). De acuerdo al criterio de porcentaje de identidad con el gen 16S RNAr del 99% para identificar un aislado a nivel de especie (Abdelmohsen *et al.*, 2014, Drancourt *et al.*, 2004), los resultados del porcentaje de identidad de la mayoría de los aislados indicaron que son especies del género *Streptomyces*.

Las poblaciones del suelo están dominadas por el género *Streptomyces*, que representa más del 95% de las cepas de Actinomycetales aisladas del suelo (Lewin *et al.*, 2016). Uno de los trabajos que comprueban esta aseveración, son los realizados por Genilloud *et al.* (2011), en el que, a partir de tres muestras de suelo seleccionadas aleatoriamente, se realizaron aislamientos sistemáticos, de las cuales obtuvieron 790 cepas de actinomiceto. Estas cepas se identificaron molecularmente mediante la secuencia parcial del gen 16S rRNA, lo que dió como resultado que el 57% de ellas pertenecen al género *Streptomyces*. La colección de la Fundación Medina, cuenta con 58,000 cepas de actinomicetos obtenidas de diversos hábitats y orígenes geográficos, de los cuales el 55% pertenecen a este género.

La cepa S2A-04 presentó un porcentaje de identidad del 100% con la especie *S. parvisporogenes*. Diversos trabajos han reportado el aislamiento de *S. parvisporogenes* en diferentes tipos de suelo. Acosta-Martínez *et al.* (2014) aislaron una cepa de suelos agrícolas, en Texas, EE. UU con actividad arilsulfatasa. En 2011, Kulkarni-Almeida *et al.* (2011) aislaron de una muestra de suelo arenoso obtenido de Jaipur en Rajasthan, India, una cepa de *S. parvisporogenes* denominada PM0324667, con un micelio aéreo de color blanco y el reverso de color marrón amarillento, características morfológicas que coinciden

con la cepa (S2A-04) identificada como la misma especie (De la Rosa com. pers.). Esta especie se reportó por primera vez en 1960 por Chas. Pfizer y Co.

Las cepas S3A-05 y S3A-09 obtenidas de Puyacatengo, Tabasco presentaron una similitud del 100% de identidad con la secuencia del gen 16s rRNA de *Streptomyces manipurensis* sp. nov. Esta especie fue aislada de una cantera de piedra caliza en Hundung, Manipur India y reportada como una nueva especie por Nimaichand *et al* en 2012. El número de acceso de su secuencia del gen 16s rRNA en el GenBank es el JN560156 y la especie tipo es MBRL 201(T) (=DSM 42029(T)=JCM 17351(T)) (Nimaichand *et al.*, 2012). Esta cepa posee actividad contra *C. albicans*, detectada mediante el método de difusión en agar. Las características morfológicas (micelio aéreo de color amarillo grisáceo, micelio sustrato de color marrón) y características bioquímicas (no produce pigmentos solubles, reacción positiva a las enzimas catalasa y oxidasa) (De la Rosa com. pers.) de las dos cepas, coinciden con las características de la cepa *S. manipurensis* aislada por Nimaichand, 2014, al igual que su identificación molecular y su actividad anti-*Candida* (Nimaichand, 2012).

Las cepas con una identidad del 100% a *S. angustmyceitcus*, se aislaron de Cocona y Puyacatengo en Tabasco. Estudios realizados por Bianchi-Smiraglia *et al.*, 2015, indican que esta especie produce angustmicina, compuesto que inhibe el nucleósido guanosina monofosfato sintasa (GMPS), por lo cual, se puede usar como un agente antimelanoma cuando se considera GMPS como un impulsor del melanoma. Esta especie fue reportada por primera como productora de este compuesto, por Yüntsen *et al.*, en 1956 (Kumar *et al.*, 2010).

De Cocona, Tabasco, se identificó una cepa con 99% de similitud con *S. libani*. Diversos estudios indican que también ha sido aislada de suelos y de lodo marino (Vil *et al.*, 2019; Kim y Hwang, 1997). Las cepas obtenidas de estos nichos, poseen diferentes actividades, como la antifúngica contra los hongos fitopatógenos *Phytophthora capsici* Leonian y *Magnaporthe grisea* (Herb.) Barr y antitumoral contra células de leucemia y melanoma (Vil *et al.*, 2019;).

Las tres cepas con un 99% de identidad con *S. griseochromogenes*, se obtuvieron del suelo de Calakmul. La especie ha sido previamente reportada como productora de blasticidina, compuesto con propiedades, antivirales, antitumorales y antifúngicas, contra hongos

fitopatógenos como *Pyricularia oryzae* (Yu *et al.*, 2015). Al igual produce tautomycetina, un antifúngico con propiedades antitumorales (Yang *et al.*, 2017).

Cuatro de las cepas estudiadas obtuvieron un 99% de identidad con *S. resistomycificus*. Estudios reportan que la especie es productora de resistomicina (Ishida *et al.*, 2007); este metabolito tiene una variedad de propiedades farmacológicas, por ejemplo, inhibe la proteasa del VIH-1, 2, así como de las ARN y la ADN polimerasas; posee actividad contra bacterias Gram-positivas y micobacterias; y es un modulador de la apoptosis. También produce Heliomicina que es un policétido aromático con actividad anticancerígena, antibacteriana y antiviral (Mahmoud *et al.*, 2019).

Una de las cepas obtenida de Calakmul tuvo un 99% de identidad con *S. catenulae*. Los reportes sobre esta especie indican que produce diversos metabolitos secundarios, entre los que destacan las fibrostatinas A-F, inhibidores de prolil hidroxilasa utilizadas como agentes antifibróticos (Sabutskii *et al.*, 2016) y el  $\alpha$ -etilil glicina, el ácido 2-amino-butil-3-inoico, que presenta una actividad antibacteriana contra *Staphylococcus aureus* (Bolsakova, *et al.*, 2016).

El aislamiento SIA-87 obtenido de Calakmul fue el único que presentó un 97% de similitud con *A. xylanica*, aislada por primera vez por Chen del suelo de la provincia Qinghai en China (Chen *et al.*, 2010).

De acuerdo a los resultados obtenidos, la mayor diversidad de actinomicetos se recuperó del suelo de Calakmul, Campeche cuyo pH es de 7.8, con un 99% de similitud con miembros del género de *Streptomyces* y un 97% con *Amycolatopsis xylanica*. Los suelos de Tabasco con pH ácidos (4-2-5-9), presentaron una menor diversidad, con una similitud del 100% con miembros del género *Streptomyces*. Fierer y Jackson (2006) analizaron la diversidad microbiana y la biogeografía de las comunidades microbianas del suelo, estudiando los factores medioambientales que influyen en su biodiversidad. Estos autores concluyeron que la diversidad bacteriana no estaba relacionada con la temperatura del lugar, la latitud ni con otras variables que habitualmente predicen la diversidad de plantas y animales. Sin embargo, la diversidad y riqueza de las comunidades de bacterias del suelo podrían explicarse en gran parte a su tipo de pH.

A pesar de que las cepas estudiadas presentan halos de inhibición (método de estría cruzada y discos de agar) contra *C. albicans* en el agar ISP2 (De la Rosa, com. per.), el 80%



de los sobrenadantes de los cultivos de las cepas en el medio ISP2, no mostraron actividad antifúngica. Las cepas cuyos sobrenadantes de sus cultivos demostraron actividad contra *C. albicans* fueron *S. parvispirogenes* (S2A-04), *S. manipurensis* (S34-05) y *S. manipurensis* (S3A-09). Estos resultados podrían deberse a que las cepas que no presentaron actividad producen el antifúngico en el medio sólido, pero no en el medio líquido. En medios sólidos, el metabolismo secundario se activa, cuando las hifas del micelio sustrato comienzan a diferenciarse, formando hifas multinucleadas (etapa MII), que son las productoras de los metabolitos (Yague *et al.*, 2016). Algunos autores han afirmado que en el cultivo líquido la formación de pelets reduce la formación de metabolitos secundarios, como la nistatina en *S. noursei* (Jonsbu, *et al.*, 2002). Por lo tanto, la clave en la activación de la producción de antimicrobianos es la diferenciación de las hifas (Manteca *et al.* 2005). La diferenciación del micelio productor (MII) en cepas de *Streptomyces* como un método no específico para activar la síntesis de metabolitos secundarios permanece casi inexplorada (Manteca y Yagüe, 2018). También se ha observado que en la producción de *N*-carbamoil-*D*-glucosamina por *Streptomyces halstedii*, su actividad antibiótica se manifiesta en el medio sólido, pero no en líquido; debido a que el micelio permanece intacto en el medio sólido, pero en el medio líquido se fragmenta. Esto se corroboró cuando se empleó una cepa mutante de la misma especie cuyo micelio no se fragmenta durante su crecimiento en el medio líquido, lo que permitió la producción del antibiótico (Meurant, 2012).

En los cultivos de los diferentes actinomicetos, se observó el cambio de pH, del valor inicial de 7 a valores ácidos (5.25-5.71), ligeramente ácidos (6.45, 6.28), ligeramente alcalinos (7.75) y alcalinos (8.08, 8.42). En nueve de los cultivos se pudo observar una disminución del pH. La síntesis de compuestos biológicos activos, a menudo se asocian con un período de crecimiento rápido de trofofase seguido de un período de fase idiofásica donde se lleva a cabo la producción de metabolitos secundarios. El inicio de la producción coincide con la disminución de la tasa de crecimiento (Ghashghaei *et al.*, 2017). Durante esa transición el perfil de pH del cultivo cambia. Los cultivos que inicialmente son neutros se convierten en alcalinos probablemente debido a la aparición de subproductos de nitrógeno como el amonio de las proteínas metabolizadas (Jiang *et al.*, 2018). El pH del caldo en algunos casos se vuelve ácido, a medida que disminuyen los niveles de amonio, se producen ácidos orgánicos (Xia *et al.*, 2013).

### CAPITULO III

## MOLECULAR IDENTIFICATION OF SELECTED *STREPTOMYCES* STRAINS ISOLATED FROM MEXICAN TROPICAL SOILS AND THEIR ANTI-CANDIDA ACTIVITY

### 3.1 RESUMEN

La creciente incidencia de infecciones por *Candida albicans* y la resistencia a las terapias antimicóticas actuales ha llevado a la búsqueda de compuestos antimicóticos nuevos y más efectivos. Las especies actinobacterianas del género *Streptomyces* son reconocidas como una de las principales productoras de compuestos antimicrobianos. Por lo tanto, los objetivos de este estudio fueron: (1) la identificación de cepas de *Streptomyces* aisladas de suelos ácidos tropicales mexicanos, (2) la evaluación de su actividad antifúngica en *C. albicans* y (3) la exploración de la presencia de genes policétido sintasa en su genoma y metabolitos secundarios antifúngicos en sus extractos. Se seleccionaron cuatro cepas de actinobacterias, aisladas de suelos previamente inexplorados con antecedentes antibacterianos. Estas cepas se identificaron como *Streptomyces angustmyceticus* S6A-03, *Streptomyces manipurensis* S3A-05 y S3A-09 y *Streptomyces parvisporogenes* S2A-04, según sus análisis moleculares. El extracto de etanol del sobrenadante liofilizado de *S. parvisporogenes* mostró la actividad antifúngica más interesante contra *C. albicans*, con una concentración inhibitoria mínima (MIC) de 0.5 mg/mL. Se detectaron genes de policétido sintasa tipo I (PKS-I) y péptido sintasa no ribosomal (NRPS) en todas las cepas. Además, también se encontraron genes PKS tipo II (PKS-II) en *S. manipurensis* S3A-05 y *S. parvisporogenes*. El análisis LC-UV-HRMS del extracto orgánico activo de *S. parvisporogenes* indicó la presencia del compuesto antifúngico conocido carbazomicina G como componente principal.

El presente capítulo se encuentra publicado en la revista *International Journal of Environmental Research and Public Health*. Los autores son: Diana Escalante-Réndiz, Susana de-la-Rosa-García, Raúl Tapia-Tussell, Jesús Martín, Fernando Reyes, Francisca Vicente y Marcela Gamboa-Angulo. Fecha de publicación: 30 de mayo de 2019. *Int. J. Environ. Res. Public Health* **2019**, *16*, 1913.

### 3.2 ABSTRACT

The increasing incidence of *Candida albicans* infections and resistance to current antifungal therapies has led to the search for new and more effective antifungal compounds. Actinobacterial species from the *Streptomyces* genus are recognized as some of the major producers of antimicrobial compounds. Therefore, the aims of this study were: (1) the identification of *Streptomyces* strains isolated from Mexican tropical acidic soils, (2) the evaluation of their antifungal activity on *C. albicans*, and (3) the exploration of the presence of polyketide synthase genes in their genome and antifungal secondary metabolites in their extracts. Four actinobacterial strains, isolated from previously unexplored soils with antibacterial antecedents, were selected. These strains were identified as *Streptomyces angustmyceticus* S6A-03, *Streptomyces manipurensis* S3A-05 and S3A-09, and *Streptomyces parvisporogenes* S2A-04, according to their molecular analyses. The ethanol extract of the lyophilized supernatant of *S. parvisporogenes* displayed the most interesting antifungal activity against *C. albicans*, with a minimum inhibitory concentration (MIC) of 0.5 mg/ mL. Type I polyketide synthase (PKS-I) and non-ribosomal peptide synthase (NRPS) genes were detected in all strains. In addition, type II PKS genes (PKS-II) were also found in *S. manipurensis* S3A-05 and *S. parvisporogenes*. LC-UV-HRMS analysis of the active organic extract of *S. parvisporogenes* indicated the presence of the known antifungal compound carbazomycin G as the major component.

### 3.3 INTRODUCTION

*Candida albicans* is part of the normal microbiota of the mucosa from the oral cavity, gastrointestinal tract, and vagina in healthy humans. Under some circumstances and in susceptible individuals, it can cause superficial and systemic infections in immunocompromised situations due to their great adaptability to different host niches (Naglik, *et al.*, 2017; Prasad *et al.*, 2011). The recent increase in the number of *C. albicans* strains resistant to the antifungal drugs currently in use has triggered the search for new sources of antifungal molecules to effectively treat mycotic infections (Sardi *et al.*, 2013). Unfortunately, antifungal therapies using the currently available drugs are limited by their toxicity, side effects, and the development of drug resistance. The ideal antifungal drug should have a broad spectrum, low toxicity, activity in both oral and parenteral administrations, adequate pharmacokinetics, and low cost (Scorzoni *et al.*, 2017). However,

given the absence of this ideal drug and taking into account the large number of variables that can affect its activity both *in vitro* and *in vivo*, it is necessary to continue the search for new antifungal agents.

Actinomycete species belonging to the genus *Streptomyces* are recognized as some of the most valuable sources of secondary metabolites, covering a wide range of structural diversity and biological properties. These include, among others, antifungal, antibacterial, antiviral, antitumoral, anti-hypertensive, and immunosuppressive properties. These secondary metabolites provide unlimited opportunities for discovering novel natural antifungal drugs, because of the matchless availability of chemical diversity (De Lima Procópio *et al.*, 2012). Non-ribosomal peptide synthetases (NRPSs) and polyketide synthases (PKSs) are involved in the biosynthesis of a large number of important antimicrobials produced by actinomycetes, including antibacterial drugs such as tetracycline, erythromycin, and kanamycin, as well as antifungal agents such as candicidin and nystatin, among others (De Lima Procópio *et al.*, 2012; Undabarrena *et al.*, 2016). The incidence and presence of genes that code these enzymes are used as an alternative to evaluate their biosynthetic potential (Adegboye *et al.*, 2015). *Streptomyces* strains are highly abundant in soil, where the number and type of strains present in a particular soil are greatly influenced by environmental conditions such as temperature, pH, amount of organic matter, aeration etc. (Bontemps *et al.*, 2013; Adam *et al.*, 2018).

Mexico is one of the countries with the greatest biodiversity world-wide, represented by a wide variety of ecosystems that influence variations in the type of soil, thereby providing a very complex habitat for the microbes residing therein (Cespedes *et al.*, 2015; Urbina-Cardona *et al.*, 2010). In particular, the tropical soils are scarcely explored ecological niches which can be used as a priceless reservoir in the search for natural products from actinomycetes. In this regard, only two previous studies have been reported which included *Streptomyces* strains obtained from soil collected in the Los Petenes reserve biosphere (state of Campeche) and actinobacteria isolated from cenote waters (state of Yucatan) with activity against *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, fungal phytopathogens, and the yeast *C. albicans* (Evangelista-Martínez *et al.*, 2014, De la Rosa-García *et al.*, 2011). In recent studies, actinobacterial strains from tropical acidic soils of the state of Tabasco, in Mexico, were isolated, identified as *Streptomyces* according to their morphological and biochemical characteristics, and screened against several bacterial pathogens (De la Rosa-García, 2016). As a continuation of this work, the aim of the present study was to carry out the

molecular characterization and evaluation of the antifungal activity against *C. albicans* ATCC (American type culture collection) 10231 of four selected *Streptomyces* strains isolated from tropical acid soil in Tabasco, Mexico. The selected strains were identified using the analysis of 16S ribosomal RNA (rRNA) sequencing; the biosynthetic gene clusters associated with PKS-I, PKS-II, and NRPS were detected, and the presence of antifungal compounds in active extracts of these strains was analyzed using liquid chromatography-ultraviolet-high resolution mass spectrometry (LC-UV-HRMS).

### **3.4 Materials and Methods**

#### **3.4.1 Streptomyces strains**

The actinobacterial strains were provided by the Autonomous University of Tabasco. These strains were isolated from tropical soils in the state of Tabasco, Mexico. Strain S2A-04 was from Florida (pH 4.2), strain S6A-03 was from Cocona (pH 5.05), and strains S3A-05 and S3A-09 were from Puyacatengo (pH 5.89). The strains were isolated using Internacional Streptomyces Project 2 (ISP2) medium, with incubation temperature and time of 25 °C and 7 days, respectively. The strains were morphologically characterized by gram staining and their corresponding biochemical tests (De la Rosa-García, 2016).

#### **3.4.2 Culture of the *Streptomyces* Strains**

Cultivation of all of the *Streptomyces* strains first involved the generation of a seed culture. The strains were grown in Internacional Streptomyces Project 2 (ISP2) liquid medium (10 mL), adjusted to pH 7.0, and incubated at  $28 \pm 1$  °C with shaking at 125 rpm. After 5 days, mycelia were collected by centrifugation, frozen at  $-80$  °C, and macerated to a powder consistency for DNA extraction. After 7 days of incubation, this seed culture (10 mL) was used to inoculate 90 mL of ISP2 liquid medium (10 %, v/v), and this was incubated under the conditions described above for 15 days. After this period, the culture broth was centrifuged at  $3220 \times g/15$  min at 4 °C to precipitate the cells and the supernatant (SN) was obtained by decantation. Each SN (1x) was reduced to a half of its original volume by lyophilization (Labconco FreeZone 2.5, model 7670520, Houston, TX, USA), obtaining the concentrated SN (2x) which was tested in the initial antifungal bioassay (Abdelmohsen, 2014).

### 3.4.3 Genomic DNA Extraction, Amplification and Sequencing of 16S rRNA

The DNA from macerated mycelia was extracted according to the method of Tapia-Tussell *et al.*, 2006. Each reaction mixture (50  $\mu$ L final volume) consisted of 100 ng DNA template, 1 $\times$  PCR buffer (10 $\times$  200 mM Tris-HCl, 500 mM KCl, pH 8.4; Invitrogen), 0.2 mM of dNTP mixture, 0.5  $\mu$ M of each primer (Invitrogen), 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, and 1.5 U of Taq DNA polymerase (Invitrogen). PCR amplification of the 16S rRNA gene was conducted using the general primers 8F 5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3' and 1492R 5'-GGT TAC CTT GTT ACG ACT T-3'. DNA amplification was performed in a C100 touch Thermal Cycler (Bio-Rad, Foster city, CA, USA). The reaction conditions were as follows: initial denaturation at 95 °C for 5 min, 30 cycles of 95 °C for 45 s, 55 °C for 45 s, and 72 °C for 1.5 min, with a final extension of 8 min at 72 °C. Amplified DNA fragments were separated by electrophoresis in 1.5% (w/w) agarose gels (Invitrogen) in 1 $\times$  Tris-Borate-EDTA (TBE) buffer at 100 V for 40 min, and stained with ethidium bromide. DNA banding patterns were visualized, and images were acquired with a GelDoc EZ imager (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) (Yuan *et al.*, 2014). The PCR products were directly sequenced using the same primers by Macrogen (Seoul, Korea). The 16S rDNA sequences were compared to the sequences within the Ribosomal Database Project (RDP) using the Sequence Match algorithm. The genetic relation between the strains was evaluated based on standard genetic distances, using the software Molecular evolutionary genetics analysis (Mega) 5.1 (Tamura, PL, USA) (Tamura *et al* 2011). Results were used to build a dendrogram with the unweighted pair group method with arithmetic mean (UPGMA), with 1000 bootstrap repetitions.

### 3.4.4 Detection of PKS-I, PKS-II, and NRPS gene clusters

Polyketide synthase (PKS) type I gene fragments were amplified using degenerate primers: K1F 5'-TSA AGT CSA ACA TCC GBCA-3' and M6R 5'-CGC AGG TTS CSG TAC CAG TA-3'. Non-ribosomal peptide synthetase (NRPS) gene fragments were amplified using degenerate primers: A3F 5'-GCS TAC SYS ATS TAC ACS TCS GG-3' and A7R 5'-SAS GTC VCC SGT SGC GTA S-3' [19]. Gene PKS-II was amplified using the degenerate primer: KS $\alpha$  5'-TSG CST GCT TGG AYG CSA TC-3' and KS $\beta$  5'-TGG AAN CCG CCG AAB CCG CT-3'. The amplification was performed in a C100 touch Thermal Cycler (Bio-Rad, CA, USA). Each reaction mixture (25  $\mu$ L final volume) consisted of 400 ng DNA template, 1 $\times$  PCR buffer (10 $\times$  200 mM Tris-HCl, 500 mM KCl, pH 8.4; Invitrogen), 0.2 mM of dNTP mixture (Invitrogen), 0.4  $\mu$ M of each primer, 2.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1.5 U of Taq DNA polymerase (Invitrogen), and 10 %

dimethyl sulfoxide (DMSO). The PCR amplification program consisted of an initial denaturation at 95 °C for 5 min, followed by 35 cycles of 95 °C for 30 s, an annealing step of 2 min at 55 °C with K1F/M6R, at 58 °C with KS $\alpha$ /KS $\beta$ , and at 59 °C with A3F/A7R, with an extension of 4 min at 72 °C, and a final extension at 72 °C for 10 min (Ayuso-Sacido *et al.*, 2005; Metsä-Ketelä *et al.*, 1999). All amplification products were visualized on 1.5 % (w/v) agarose gels prepared in 1× Tris-Borate-EDTA (TBE) buffer (Invitrogen) and stained with ethidium bromide. DNA banding was visualized, and images were acquired with a GelDoc EZ imager (Biorad, CA, USA).

The bands in ranges of 1200–1400, 800–900, and 700 bp were classified as products of the PKS-I, PKS-II, and NRPS genes, respectively.

### 3.4.5 Antifungal bioassay of supernatants

#### Microbroth bioassay of supernatants of the actinobacterial cultures

Microbroth assays were conducted in sterile 96-well plates. The concentrated SNs (2X) were sterilized using 0.22- $\mu$ m pore size filters (Millipore) and tested against *C. albicans* ATCC 10231. The yeast was grown on Sabouraud's agar at 35 °C for 24 h and the inoculum was prepared in sterile saline solution (0.85%) and adjusted to match the turbidity of 0.5 McFarland standard at 530 nm (Spectrophotometer SP-830 plus, Nangang, Taipei, Taiwan) comprising 10<sup>6</sup> colony-forming unit (CFU)/mL<sup>-1</sup>, subsequently diluted at 1:1000 dilution with Sabouraud's broth. A volume of 100  $\mu$ L of each SN (2X) was deposited in each microwell, and 100  $\mu$ L of the dilution of *C. albicans* was added. The final concentration of the SN was 1X, and that of the inoculum was 1–2.5  $\times$  10<sup>3</sup> CFU/mL. Miconazole (10  $\mu$ g/mL) and the ISP2 medium were used as the positive and negative control, respectively. Four repetitions were made for each sample of the *Streptomyces* culture supernatants and controls. The microplates were incubated at 35  $\pm$  2 °C for 24 h. After incubation, (1) with a metal replicator, a sample from each of the microwells was transferred onto Sabouraud's agar plates free of the extracts (replication agar plates), and (2) immediately, 50  $\mu$ L of 2,3,5-triphenyl tetrazolium chloride (TTC) 1% (w/v) was added to each microwell. Both cultures, the replication agar plates and microwell plates with TTC 1% (w/v), were incubated under the same, aforementioned conditions. Viability data were recorded at 48 h; the absence of fungal growth on the replication plates and the absence of pink or red coloring in the microwells with TTC 1% (w/v) were interpreted as fungicidal action (Cantón-Lacasa *et al.*, 2007; CLSI, 2008).

### **Minimum inhibitory concentration of lyophilized supernatants**

Minimum inhibitory concentration (MIC) values were determined according to the M27-A3 methodology for microdilution by the Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI), with slight modifications. The supernatants of the strains of *Streptomyces* that demonstrated antifungal effect were fully lyophilized in a freeze-dryer (Labconco FreeZone 2.5, model 7670520, Houston, Texas, USA). The lyophilized SNs were dissolved in distilled water (20 mg/mL) and sterilized through 0.22- $\mu$ m millipore filters (Millipore). These samples were tested at final concentrations of 10, 5, 2.5, and 1.25 mg/mL. The final concentration of inoculum of *C. albicans* was  $1\text{--}2.5 \times 10^3$  CFU/mL. The positive and negative controls were the same as those mentioned above. After incubation at 35 °C for 24 h, the MIC was determined as the lowest concentration which yielded no visible microbial growth in the wells with TTC 1% and on the replicate Sabouraud's agar plate (Cantón-Lacasa *et al.*, 2007; CLSI, 2008).

#### **3.4.6 Antifungal assay of organic extracts**

##### **Ethanol extraction of lyophilized supernatant from strains**

The lyophilized SNs of *Streptomyces manipurensis* S3A-05 and S3A-09 and *Streptomyces parvisporogenes* (647, 380 mg, respectively) with demonstrated antifungal effect were extracted with ethanol (three times, w/v) at room temperature. The solvents were removed in a rotary evaporator (Ika RV 10 Control, Staufen, Germany) at 40 °C under reduced pressure until dryness. In this way, the ethanol extract (a) and an insoluble fraction corresponding to the residual solid (b) were obtained.

##### **Minimum inhibitory concentration of fractions from organic extraction**

The organic extracts (a) were dissolved in DMSO at a concentration of 40 mg/mL. The residual solids (b) were treated as lyophilized SN as mentioned above at the same concentrations. The MIC value of the active extracts was determined based on the microdilution method (CLSI, 2008), 10  $\mu$ L (0.4 mg) of each extract were tested using a 2-fold serial dilution method, with final concentrations of 1, 0.5, 0.25, 0.125, 0.062, and 0.031 mg/mL. The final concentration of DMSO did not exceed 0.5 %.





### 3.4.7 LC-HRMS analysis

The organic extracts of the three active *Streptomyces* strains were filtered by RP-18C (40–60  $\mu\text{m}$ , Merck) and analyzed by liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS) on an Agilent 1260 RR chromatograph (Santa Clara, CA, USA). A Zorbax SB-C8 column (2.1  $\times$  30 mm), maintained at 40  $^{\circ}\text{C}$  with a flow rate of 300  $\mu\text{L}/\text{min}$  was used. Solvent A consisted of 10% acetonitrile and 90% water with 0.01% trifluoroacetic acid and 1.3 mM ammonium formate, while solvent B was 90% acetonitrile and 10% water with 0.01% trifluoroacetic acid and 1.3 mM ammonium formate. The gradient started at 10% B and reached 100% B in 6 minutes; it was then kept at 100% B for 2 minutes and returned to 10% B for 2 minutes to initialize the system. Full diode array UV scans from 100 to 900 nm were collected in 4-nm steps at 0.25 s/scan. Mass spectrometry acquisition was performed on a Bruker maXis HR-QTOF mass spectrometer (Bruker Daltonics GmbH, Bremen, Germany) coupled to the previously described LC system. Ionization of the eluting solvent was obtained using the standard maxis ESI source adjusted to a drying gas flow of 11 l/min at 200  $^{\circ}\text{C}$  and a nebulizer pressure of 40 psig. The capillary voltage was set to 4000 V. High Resolution Mass Spectra (HRMS) were collected from 150  $m/z$  to 2000  $m/z$  in positive mode. The chemical profiles were compared to internal proprietary databases of more than 900 known active molecules. Database searching was carried out in MEDINA proprietary database of microbial metabolites and the Chapman & Hall Dictionary of Natural Products v25.1 (CRC Press, Boca Raton, FL, USA) (Martín *et al.*, 2014; Pérez-Victoria *et al.*, 2016).

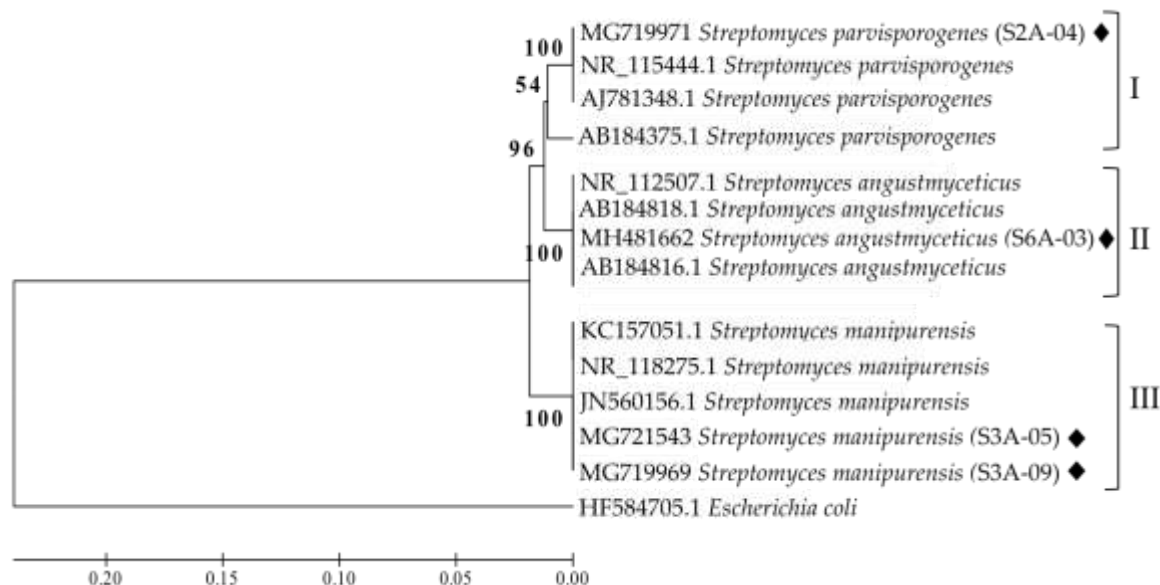
### 3.5 RESULTS

#### 3.5.1 Molecular identification and screening of antifungal activity of *Streptomyces* strains

The sequencing result of 16S rRNA gene from the four strains showed a similarity level of 100% to other sequences from species belonging to the genus *Streptomyces*. The products of the amplification of the 16S rRNA gene, of approximately 1200 bp of the four strains of *Streptomyces*, were sequenced and blasted against the National Center for Biotechnology Information (NCBI) Gen Bank database. The results are shown in Table 3.1. The strains S2A-04 and S6A-03 were identified as *Streptomyces parvisporogenes* and *Streptomyces angustmyceticus*, respectively, while both S3A-05 and S3A-09 were identified as *Streptomyces manipurensis*. To corroborate this identification, a phylogenetic tree based on gene distance using the UPGMA method was built (Figure 3.1). The four strains were separated into three clades. In clade I, the strain S2A-04 grouped with the species *S. parvisporogenes*, in clade II, S6A-03 grouped with *S. angustmyceticus*, and in clade III the strains S3A-05 and S3A-09 grouped with *S. manipurensis* species.

**Cuadro 3.1** 16S ribosomal RNA gene taxonomic affiliation of *Streptomyces* strains isolated from tropical acidic soils in the state of Tabasco, Mexico.

Strain	Accession Number GenBANK	Closest Relative by BLAST	% SEQUENCE similarity
S2A-04	MG719971	<i>Streptomyces parvisporogenes</i> (AJ7813481)	100
S3A-05	MG721543	<i>Streptomyces manipurensis</i> (JN560156.1)	100
S3A-09	MG719969	<i>Streptomyces manipurensis</i> (NR118275.1)	100
S6A-03	MH481662	<i>Streptomyces angustmyceticus</i> (AB184816)	100



**Figura 3.1** Genetic distance tree grouped by the unweighted pair group method with arithmetic mean (UPGMA) using the 16S ribosomal RNA gene sequence (Ribosomal Date Base Project), showing the genetic relations between the strains in this study (black rhombuses). *Escherichia coli* (HF584705.1) was employed as an outgroup.

The results of the evaluation performed in the microdilution broth assay against *C. albicans* indicated that all supernatants except that of *S. angustmyceticus* showed activity. The *S. manipurensis* S3A-05 and S3A-09 strains displayed both MIC values of 2.5 mg/mL, while *S. parvisporogenes* S2A-04 exhibited a MIC value of 5 mg/mL (Table 3.2). All active strains exhibited a fungicidal effect.

The ethanol extracts from the lyophilized SNs of *S. parvisporogenes* S2A-04 and *S. manipurensis* S3A-05 and S3A-09 cultivated in ISP2 were subsequently tested against *C. albicans*. Only the ethanol extract from *S. parvisporogenes* (S2A-04) inhibited the growth of the pathogenic yeast, with an MIC value of 0.5 mg/mL showing fungicidal effect. The ethanol extracts of both *S. manipurensis* strains showed no inhibitory activity on *C. albicans*. The solid residual fractions obtained from the three strains were not active either (Table 3.2).

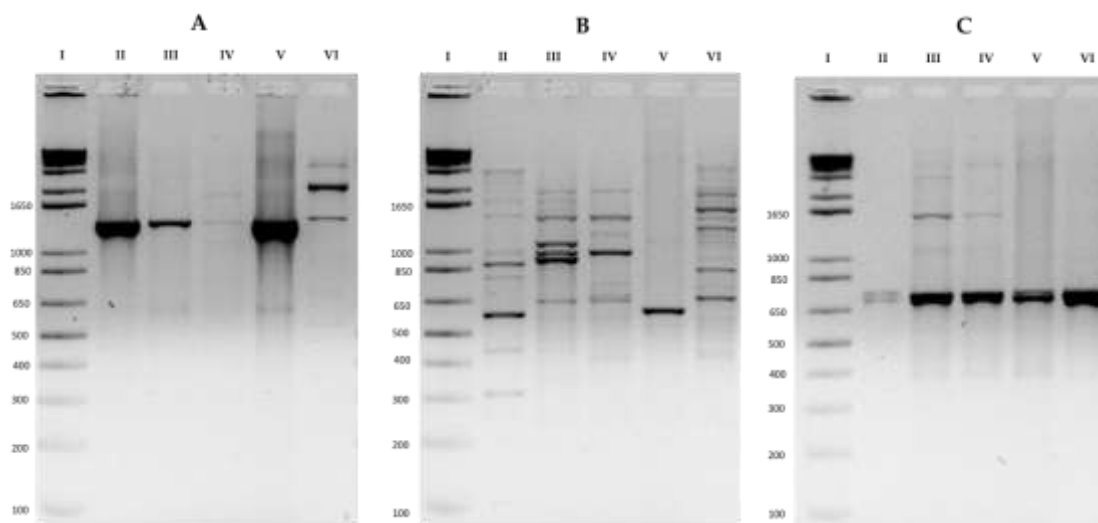
**Cuadro 3.2** Minimum inhibitory concentration (*MIC*) of supernatants and fractions of *Streptomyces* sp. collected in tropical acidic soils of the state of Tabasco, Mexico.

Strains	pH Soil	Collection Site	SN (1×) Activity	MIC (mg/mL)		
				Lyophilized SN	Ethanol Extract	Residual Solid
<i>Streptomyces parvisporogenes</i> S2A-04	4.2	Florida	+	5	0.5	>1.0
<i>Streptomyces manipurensis</i> S3A-05	5.89	Puyacatengo	+	2.5	>1.0	>1.0
<i>Streptomyces manipurensis</i> S3A-09	5.89	Puyacatengo	+	2.5	>1.0	>1.0
<i>Streptomyces angustmyceticus</i> S6A-03	5.05	Cocona	–	>10	NE	NE

+: Active, – : Not active. NE: Not evaluated. SN: Supernatant (1×): original concentration tested bioassay.

### 3.5.2 Detection of biosynthetic genes of active strains

The presence of PKS-I, PKS-II, and NRPS biosynthetic genes in the *Streptomyces* strains under study was analyzed. PKS-I and NRPS genes were present in all four of the strains (Figure 3.2A and 3.2C). Additionally, the strains *S. parvisporogenes* (S2A-04) and *S. manipurensis* (S3A-05) presented a band (Figure 3.2B) belonging to expected amplicons (900 bp) for PKS-II type genes (Table 3.3). According to the results, differences in the biosynthetic potential of *S. manipurensis* S3A-05 and S3A-09 strains were detected.



**Figura 3.2** Agarose gel electrophoresis of the biosynthetic gene amplification products. **(A)** 1200–1400 bp fragments of polyketide synthase I (PKS-I) genes, **(B)** 800 to 900 bp fragments of type II polyketide synthase (PKS-II) genes, and **(C)** 700 bp fragments of non-ribosomal peptide synthase (NRPS) genes. Lane, I: 1 kb molecular weight marker; lane II: *Streptomyces parvisporogenes* (S2A-04); lane III: *Streptomyces manipurensis* (S3A-05); lane IV: *Streptomyces manipurensis* (S3A-09); lane V: non-active strain *Streptomyces angustumyceticus* S6A-03; and lane VI: *Streptomyces coelicolor* (control + PKS-I and NRPS).

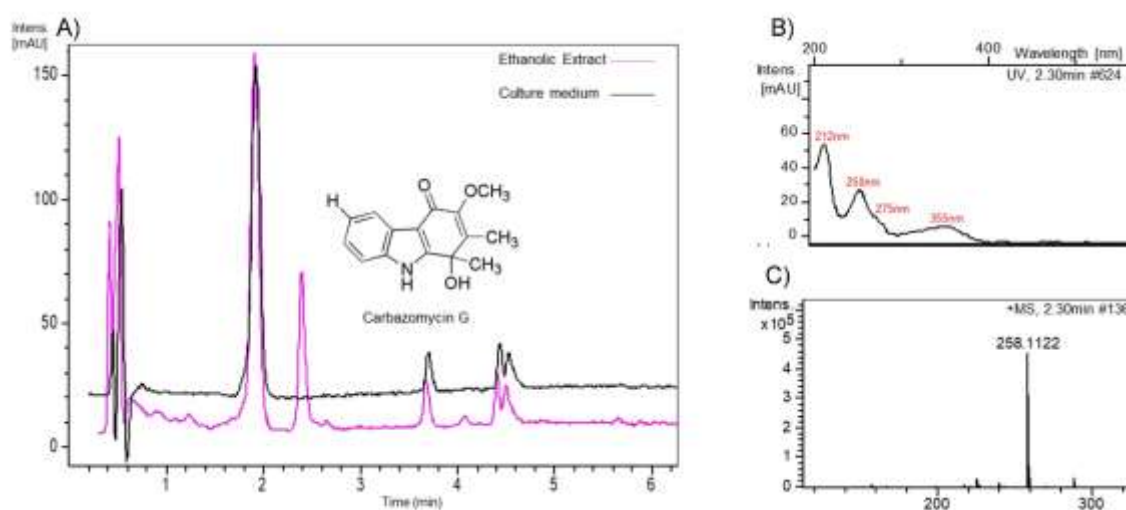
**Cuadro 3.3.** Detection of biosynthetic genes in active *Streptomyces* strains.

Strains	Gene Type		
	PKS-I	PKS-II	NRPS
<i>S. parvisporogenes</i> (S2A-04)	+	+	+
<i>S. manipurensis</i> (S3A-05)	+	+	+
<i>S. manipurensis</i> (S3A-09)	+	–	+
<i>S. angustumyceticus</i> (S6A-03)	+	–	+

+ Gene present; – Gene not present.

### 3.5.3 LC-UV-HRMS Analysis

The ethanolic crude extracts of the three bioactive *Streptomyces* strains were analyzed by LC-UV-HRMS. The HRMS of a major peak eluting at a retention time of 2.30 min in the extract of *S. parvisporogenes* displayed a protonated ion at  $m/z$  258.1122, in accordance with a molecular formula of  $C_{15}H_{15}NO_3$  (calc. for  $C_{15}H_{16}NO_3^+$ , 258.1130), and its UV spectrum presented maxima at 212, 250, 275, and 355 nm (Figure 3.3). Dereplication of that molecular formula and UV features using the Chapman & Hall Dictionary of Natural Products identified carbazomycin G as the major component of the extract. The LC-UV-HRMS analysis of both *S. manipurensis* strains showed no significant differences with respect to that of an extract of the culture medium (blank).



**Figura 3.3** (A) LC-UV chromatogram (210 nm) of the ethanolic extract of the *S. parvisporogenes* (S2A-04) strain vs. an extract of the non-fermented culture medium, (B) Ultraviolet spectra and (C) HRMS spectra of the major peak at 2.30 min and structure of carbazomycin G

### 3.6 DISCUSSION

The analysis of the 16S rRNA gene sequences confirmed that the four tropical strains studied herein belong to three different species of the *Streptomyces* genus, *S. angustmyceticus*, *S. manipurensis*, and *S. parvisporogenes*. These isolations represent the first contribution to the description of actinobacteria isolated from the state of Tabasco, enriching the knowledge of the bacterial biodiversity present in the southeast of Mexico. The

*Streptomyces* strains analyzed belong to species not commonly isolated. In particular, this is the third report of *S. manipurensis* species (Nimaichand *et al.*, 2012; Elkholy *et al.*, 2018). Our isolates were obtained from acidic soils; these data are in accordance with previous results indicating that the most frequently found acidotolerant actinomycetes in acid soils are representative of the *Streptomyces* genus. This fact is most likely related to their significant predominance in almost all the soils (Hasani *et al.*, 2014; Nguyen *et al.*, 2015; Zenova *et al.*, 2011). Our *S. manipurensis* S3A-05 and S3A-09 strains come from tropical slightly acidic soils, while the only two previously isolated were obtained from a tropical basic (pH 9.26) soil of limestone quarry at Hundung (Manipur India) (Nguyen *et al.*, 2015; Tamereihao *et al.*, 2016) and from calcareous soils in Egypt (El-Kholy *et al.*, 2013). The other two strains, *S. parvisporogenes* S2A-04 and *S. angustmyceticus* S6A-03, come from soils with higher acidity. In 2011, Kulkarni-Almeida *et al.*, (2011) isolated *S. parvisporogenes* PM0324667 from a neutral to alkaline sandy soil (Rajasthan, India) (Meena *et al.*, 2006). Pithakkit *et al.*, 2015, reported the isolation of *S. angustmyceticus* NR8-2 from slightly acidic soils from palm tree plantations in the south of Thailand (Unjan *et al.*, 2017). The *Streptomyces* strains studied in this research, according to the pH of the soil where they were isolated, could be considered as moderately acidophilic (Guo *et al.*, 2015). Other actinomycetes living in Mexican tropical soils have scarcely been investigated.

The SNs that showed the most potent antifungal effect against *C. albicans* belong to the *S. manipurensis* S3A-05 and S3A-09 strains. Previous studies of *S. manipurensis* MRLB 201 and isolate H21, cultured in starch–nitrate–casein broth and soybean broth, respectively, reported a strong inhibitory effect on several pathogenic bacteria and lower activity against *C. albicans* by the agar well diffusion method (Nimaichand *et al.*, 2015; Elkholy *et al.*, 2018). The ethanolic extract and the residual solid obtained from both lyophilized SNs of *S. manipurensis* showed no antifungal activity. This fact might indicate the existence of a synergistic effect among metabolites of both fractions which is lost when they are separated during the ethanolic extraction (Gómez-Guiñán *et al.*, 2003). Alternatively, the antifungal activity might be related to the presence of proteins as in *Nocardiopsis dassonvillei* (Selvin *et al.*, 2009) or enzymes such as chitinases and glucanases (Hassan *et al.*, 2011, Saini *et al.*, 2016), capable of degrading the cell wall of the fungi but labile to hydrophilic solvents (Stepankova *et al.*, 2013).

The PKS-I and NRPS biosynthetic genes detected in all four of the strains studied have also been frequently found in other species *Streptomyces* genus (Passari *et al.*, 2015; Salam *et*



*al.*, 2017; Harsonowati *et al.*, 2017). The presence of these genes in our strains indicates their potential to biosynthesize macrolide, polyether, and non-ribosomal peptide-like molecules, among others (Kwan *et al.*, 2011; Agrawal *et al.*, 2017). The PKS-II genes detected in the strains *S. manipurensis* S3A-05 and *S. parvisporogenes* provide information regarding their capability to biosynthesize aromatic polyketides (Zhang *et al.*, 2017). Several studies associate the presence of the PKS-II gene in actinomycete strains with antifungal activity (Salam *et al.*, 2017; Ahmad *et al.*, 2017). Interestingly, different biosynthetic gene cluster profiles were detected in both *S. manipurensis* strains, even when they have same origin, suggesting differences in their chemical and fingerprint profile. However, to date no metabolites have been isolated from *S. manipurensis* and our initial assessment of their chemical composition on organic extract by LC-UV-HRMS revealed no significant differences between the composition of the actinomycete extracts and the culture medium. To fully understand the biosynthetic capacity of our strains, perhaps new cultivation strategies should be attempted. Among them, the most straightforward will be the use of one strain-many compounds (OSMAC) approaches (Bode *et al.*, 2002) or microbial co-cultivation experiments (Abdelmohsen *et al.*, 2015) which for sure will elicit the production of new natural products that might have applicability in the fight against fungal or other microbial infections.

On the other hand, the initial low anti-*Candida* activity observed for *S. parvisporogenes* S2A-04 was significantly increased after organic extraction of the lyophilized supernatant, leading to a final MIC value of 0.5 mg/mL. Similar results have been reported with ethyl acetate extracts from *Streptomyces* sp. ERINLG-51 (Balachandran *et al.*, 2015). In this case, our results indicated that the existence of ethanol soluble compounds in the extract is responsible for the antifungal activity observed. Based on its HRMS and UV spectra, a metabolite tentatively identified as carbazomycin G was detected as one of the major components of our *S. parvisporogenes* S3A-04 ethanolic extract. This is an aromatic alkaloid related to the presence of PKS-II genes in the strain. In contrast, various secondary metabolites have been identified from other *S. parvisporogenes* strains. These include an antifungal polyene named PA 616 by Chas (Hamilton-Miller *et al.*, 1973), acetyl, butyl, and propionyl pepstatins with inhibitory activity of pepsin, cathepsin D, and renin (Aoyagui *et al.*, 1973). Additionally, an aromatic metabolite, NFAT-33, with antidiabetic properties was isolated from *Streptomyces* sp. PM0324667, a striking strain related to *S. parvisporogenes*, according to their DNA sequences (Kulkarni-Almeida *et al.*, 2011). Carbazomycin G was previously reported from *Streptoverticillium ehimense* together with carbazomycins A–F and

H. It is an alkaloid with a moderate antifungal activity against species of *Trichophyton* (Kaneda *et al.*, 1988; Sakano *et al.*, 1980; Naid *et al.*, 1987). The structure of carbazomycins possesses a carbazole core originating from a tryptophan unit, coupled to a pyruvate and an acetate unit, pointing to a possible relation with the PKS genes existing in the strain (Kaneda *et al.*, 1990; Herberth *et al.*, 2003). The total synthesis of this compound has been reported by several authors (Hagiwara *et al.*, 2000; Knölker *et al.*, 2003; Chakraborty *et al.*, 2013). It will be necessary to isolate the active compound in order to confirm its activity and its structure in the ethanolic extract from *S. parvisporogenes* S2A-04



## CAPITULO IV

### EFFECTO DE ALGUNAS FUENTES NUTRICIONALES DE CARBONO Y NITRÓGENO EN LA ACTIVIDAD ANTI-CANDIDA DE TRES *STREPTOMYCES* NATIVOS DE TABASCO

#### 4.1 INTRODUCCIÓN

Los productos naturales (PN) son moléculas orgánicas producidas por organismos vivos con diversas actividades biológicas. Más del 10% de los PN bioactivos conocidos provienen de microorganismos, especialmente los actinomicetos producen alrededor del 45% (Demain *et al.*, 2009). El género *Streptomyces* es el más reportado con la capacidad de producir una innumerable cantidad de metabolitos secundarios terapéuticos (MS) (Barka *et al.*, 2016). Por otro lado, las condiciones ambientales representan un factor muy importante en la biosíntesis de MS en las cepas actinomicetales (Genilloud *et al.*, 2011). Las variaciones nutritivas (fuente de carbono, nitrógeno, fosfatos etc.) o ambientales (temperatura, pH, presión osmótica, etc.) en las condiciones de cultivo podrían inducir a producir un cambio completo en el perfil metabólico, lo que conduciría a una diversidad química (Rebets *et al.*, 2014). Esta estrategia se conoce como "una cepa/muchos compuestos" (OSMAC, por sus siglas en inglés) y se ha utilizado para inducir u optimizar la biosíntesis de MS novedosos de la misma cepa. Cuando se agrega o agota algún componente químico se pueden observar variaciones en el perfil metabólico. De manera similar se observa cuando se supe un precursor o sustrato, impactando en los niveles de producción (Zarins-tutt *et al.*, 2015).

La producción de MS antimicrobianos por actinomicetos está altamente vinculada a la disponibilidad de carbono y nitrógeno (Van der Meij *et al.*, 2017). Innumerables estudios han demostrado que el tipo de fuente de carbono disponible afecta la producción de MS y al desarrollo morfológico de los actinomicetos (Romano, *et al.*, 2018). Particularmente, en el género *Streptomyces*, la síntesis de MS parece estar regulada por un sistema conocido como la represión por catabolito del carbono (RCC). Esto se define como la inhibición de la expresión génica requerida para la utilización de las fuentes secundarias de carbono, causada por los sustratos carbonatados que se degradan rápidamente, como la glucosa. Por lo tanto, cuando las especies de este género se cultivan en condiciones limitadas de carbono, la represión del catabolito se detiene y comienza la síntesis de las enzimas requeridas para la biosíntesis de MS (Sánchez *et al.*, 2010). De manera similar, el tipo de

fuerza de nitrógeno tiene una influencia significativa en la producción de varias sustancias antimicrobianas. El metabolismo secundario también está influenciado negativamente por el nitrógeno. Cuando está presente una buena fuente de nitrógeno, se usa rápidamente junto con el carbono para la producción de biomasa, reprimiendo la síntesis de enzimas involucradas en la producción de MS (Van Wezel *et al.*, 2011).

En el aislamiento de actinomicetos de suelos tropicales de México, se encontraron tres cepas de *Streptomyces* cuyos cultivos en el medio ISP2 presentaron actividad antifúngica contra *C. albicans*. Las cepas se identificaron como *Streptomyces parvisporogenes* S3A-04, *Streptomyces manipurensis* S3A-05 y *S. manipurensis* S3A-09. El extracto etanólico del sobreadante del cultivo de *S. parvisporogenes* presentó actividad y en él se identificó la presencia de un compuesto identificado como carbazomicina G, reportado previamente con propiedades antimicóticas. Por lo cual, para incrementar la actividad anti-*Candida* de estas cepas, se llevó a cabo la estrategia OSMAC, utilizando dos fuentes diferentes de carbono (almidón y glicerol) y nitrógeno (peptona de carne y harina de soya). Previamente, y debido a que las dos cepas de *S. manipurensis* (S3A-05 y S3A-09) presentan actividades similares y se obtuvieron del mismo sitio de colecta, pero mostraron diferente perfil de genes PKS, se caracterizaron molecularmente mediante la huella genética, para esto se eligieron los marcadores moleculares DAMD (amplificación dirigida del ADN de la región de minisatélites) y los iniciadores arbitrarios de PCR (AP-PCR). DAMD es una técnica desarrollada por Heath y col. (1993) para dirigir la amplificación mediada por PCR de la región de ADN de minisatélite. Los minisatélites son regiones de genomas de ADN repetidas en tándem, muchas de las cuales muestran altos niveles de variación de la longitud alélica debido a diferencias en el número de unidades repetidas, este polimorfismo identifica un *locus* que resulta ser multialélico debido a un elevado número de unidades repetidas, que corresponden a muchos alelos (Claes, 1997). Estos marcadores genéticos altamente informativos, se han utilizado ampliamente en muchas áreas de la genética para mostrar variaciones dentro de una especie o entre especies (Borozan *et al.*, 2017). Los AP-PCR son usados para generar perfiles genéticos simples y reproducibles, no se requiere información previa de la secuencia. Los cebadores arbitrarios elegidos se unen a un segmento complementario del ADN genómico y generan una serie de amplicones que se separan electroforéticamente para formar patrones, que se comparan y analizan en busca de similitudes y diferencias (Ly y Caufield, 1998). Los enfoques de AP-PCR identifican variaciones genómicas dentro de una especie y generan perfiles únicos de diferentes cepas (Vickery *et al.*, 1999). Por lo

tanto, las cepas pueden ser distinguidas por comparación polimórfica en las huellas dactilares genómicas. Se puede aplicar a cualquier especie bacteriana (Czekajło *et al.*, 2006). La actividad antifúngica de los sobrenadantes de los cultivos, sus extractos etanólicos y sus fases residuales después de la extracción orgánica se evaluaron contra *C. albicans*. Los extractos etanólicos activos, se analizaron por LC-MS.

## 4.2 MATERIALES Y METODOS

### 4.2.1 Microorganismos

Las cepas *S. parvisporogenes* S2A-04, *S. manipurensis* S3A-05 y S3A-09 utilizadas en esta investigación provienen del cepario de la Universidad Juárez Autónoma de Tabasco, como se indica previamente en sección 2.2.1.

### 4.2.2 Huella genética de *Streptomyces manipurensis* S3A-05 y S3A-09

Los cebadores arbitrarios para PCR (AP-PCR) y la amplificación directa del ADN de la región del minisatélite (DAMD), se utilizaron para el análisis de huellas dactilares de cepas activas identificadas como *Streptomyces manipurensis* S3A-05 y *S. manipurensis* S3A-09. Esto se llevó a cabo utilizando seis cebadores: M13 (5'-GAG GGT GGC GGT TCT-3'), HVA (5'-AGG ATG GAA AGG AGG C-3'), HBV (5'-GGT GTA GAG AGG GGT- 3'), INS (5'-ACA GGG GTG TGG GG-3'), YNZ-22 (5'-CTC TGG GTG TGG TGC-3') y 33.6 (5'-GGAGGTGGGCA-3' (Bridge *et al.*, 1997; Zhou *et al.*, 1997; Nakamura *et al.*, 1988). La amplificación se realizó en un volumen de 25 µL que contenía 10 ng de ADN, 1 x tampón de PCR (10x: Tris-HCl 200 mM, KCl 500 mM, pH 8.4; Invitrogen), dNTP 0.25 mM, MgCl<sub>2</sub> 0.5 mM y 1 pmol de cebador usando el siguiente programa: 95 °C por 5 min, 40 ciclos de 94 °C por 1 min, 55 °C por 2 min, extensión 72 °C durante 2 min y la etapa de extensión final de 7 min a 72 °C. La amplificación se realizó utilizando un termociclador táctil C100 (Bio-Rad, California, EE. UU.). La AP-PCR se realizó utilizando tres cebadores de 15 bp derivados de las secuencias repetidas (GTG)<sub>5</sub>, (CAG)<sub>5</sub> y (GAC)<sub>5</sub> (Nguyen *et al.*, 2009; Pérez-Brito *et al.*, 2007). Las reacciones se realizaron en un volumen final de 25 µL que contenían: 100 ng de ADN, 1x tampón de PCR (10x: Tris-HCl 200 mM, KCl 500 mM, pH 8.4; Invitrogen), 0.25 mM de cada dNTP (Invitrogen), MgCl<sub>2</sub> 2 mM, cebadores 0.8 µM y 1.25 U Taq polimerasa (Invitrogen). La amplificación se realizó en un termociclador táctil C100 (Bio-Rad, California, EE. UU.). El programa utilizado fue: un paso de desnaturalización inicial a 95 °C durante 5 min, seguido de 40 ciclos de 95 °C 40 s, la

temperatura de alineamiento fue a 42 °C para (GTG)<sub>5</sub>, 50 °C para (GAC)<sub>5</sub> y 60 °C para (CAG)<sub>5</sub> durante 60 s, extensión durante 1 min a 72 °C; y una etapa de extensión final de 5 min a 72 °C. Los productos de amplificación se analizaron por electroforesis en geles de agarosa al 1.5% (p/v) y se detectaron mediante tinción con bromuro de etidio. Se visualizaron patrones de bandas de ADN y se adquirieron imágenes con un generador de imágenes GelDoc EZ (Pérez-Brito *et al.*, 2018)

A los datos de la huella genética, se les asignaron valores utilizando 1 para indicar la presencia de una banda y 0 para indicar su ausencia. Los datos calculados se emplearon para obtener el contenido de información de polimorfismo (PIC) de cada marcador (DAMD y AP-PCR) de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$PIC=1-\sum_{i=1}^k P_i^2$$

Donde  $P_i$  es la frecuencia del alelo  $i$ -ésimo, y  $k$  es el número total de alelos diferentes en el locus. El valor de PIC de cada combinación de cebadores fue el promedio de las bandas (Pérez-Brito *et al.*, 2018; Anderson *et al.*, 1992).

#### 4.2.3 Cultivo de las cepas de *Streptomyces* en medios ISP2 modificados

Los tres aislados se cultivaron en ocho medios de cultivo modificados, denominados medios de inducción y en el medio de referencia ISP2. Estos medios se formularon siguiendo como el contenido del medio ISP2, cambiando la fuente de carbono (extracto de malta) y nitrógeno (extracto de levadura) (Cuadro 4.1) al 1% (p/v) de concentración (10 g/L). El extracto de malta se sustituyó por almidón (Al) y glicerol (Gl); el extracto de levadura se cambió por peptona de carne (PC) y harina de soya (HS). Paralelamente, se realizaron cuatro mezclas binarias de una fuente de carbono y una fuente de nitrógeno (AIPC, AIHS, GIPC y GIHS) (Al-Hulu *et al.*, 2015; Bahavana *et al.*, 2014; Houssam *et al.*, 2011). En total se obtuvieron ocho diferentes medios de inducción (Tratamientos) y junto con el medio ISP2 (referencia) se describen en la Cuadro 4.2. Todos los medios contienen 4 g (0.4 % p/v) de glucosa y se ajustaron a pH 7.0. El cultivo-semilla de cada cepa se realizó en medio ISP2 a  $28 \pm 2$  °C, 125 rpm, 7 días. El cultivo-semilla (10 mL, 10% v / v) de cada actinomiceto se inoculó en 90 mL de cada medio. Los cultivos en los medios de inducción y en el medio ISP2, al igual que sus controles negativos (medios de cultivo sin inocular) se incubaron en las mismas condiciones durante 15 días. Después del período

de incubación, el caldo de cultivo se centrifugó (3.220 g / 15 min a 4 °C). El sobrenadante (SN) obtenido se congeló y el volumen original se redujo a la mitad (concentrado 2x) por liofilización (Labconco FreeZone 2.5, modelo 7670520, Houston, Texas, EE. UU.). Se hicieron tres repeticiones para cada tratamiento. Este material se almacenó hasta su uso en el bioensayo antifúngico.

**Cuadro 4.1** Lista de medios de cultivo líquidos modificados a partir del medio de referencias ISP2.

Medio de cultivo	Fuente de Carbono	Fuente de nitrógeno	Abreviatura
International <i>Streptomyces</i> Project Yeast Malt Extract Agar (ISP2)	Extracto de Malta	Extracto de levadura	ISP2
Almidón	Almidón	Extracto de levadura	AI
Glicerol	Glicerol	Extracto de levadura	GI
Peptona de carne	Extracto de Malta	Peptona de carne	PC
Harina de soya	Extracto de Malta	Harina de soya	HS
Almidón y peptona de carne	Almidón	Peptona de carne	AIPC
Almidón y harina de soya	Almidón	Harina de soya	AIHS
Glicerol y peptona de carne	Glicerol	Peptona de carne	GIPC
Glicerol y harina de soya	Glicerol	Harina de soya	GIHS

**Cuadro 4.2** Medios de inducción (Tratamientos) y medio de referencia (ISP2) utilizados en el cultivo de los tres aislados de *Streptomyces* seleccionados para incrementar efecto anti-*Candida*.

Medios	Aislado					
	Blancos			Tratamientos		
	ISP2	AI	GI	ISP2	AI	GI
ISP2	x	x	x	x	x	x
PC	x	xx	xx	x	xx	xx
HS	x	xx	xx	x	xx	xx

AI: almidón. GI: glucosa. PC: peptona de carne HS: Harina de soya. X:Simple. XX:Combinación (Fuente de nitrógeno-Fuente de Carbono).

#### 4.2.4 Bioensayo anti-*Candida* de sobrenadantes de cultivos de *Streptomyces*

Los SN concentrados (2x) se esterilizaron por filtración y se evaluaron contra la levadura *C. albicans* ATCC 10231 en placas estériles de 96 pocillos como se describió anteriormente (Escalante-Réndiz *et al.*, 2019; Cantón-Lacasa *et al.*, 2007; CLSI, 2008). Se



hicieron cuatro repeticiones para cada muestra de los sobrenadantes y controles de cultivo de *Streptomyces*.

#### **4.2.5 Concentración mínima inhibitoria (CMI) de sobrenadantes liofilizados**

Los SN de las tres cepas de *Streptomyces* que demostraron un efecto antifúngico se liofilizaron completamente (Labconco FreeZone 2.5, modelo 7670520, Houston, Texas, EE. UU.) y se evaluaron de acuerdo con la metodología del CLSI con ligeras modificaciones, para detectar los valores de CMI (Escalante-Réndiz *et al.*, 2019; Cantón-CLSI, 2008; Lacasa *et al.*, 2007)

#### **4.2.6 Extracción etanólica y bioensayo anti-*Candida* de los extractos**

Los SN liofilizados de los cultivos de las tres cepas, se extrajeron por maceración con etanol (3x). Los extractos orgánicos y los sólidos residuales se evaluaron contra *C. albicans* siguiendo el método de microdilución en las mismas concentraciones, como se describió previamente en el apartado 3.3.5.

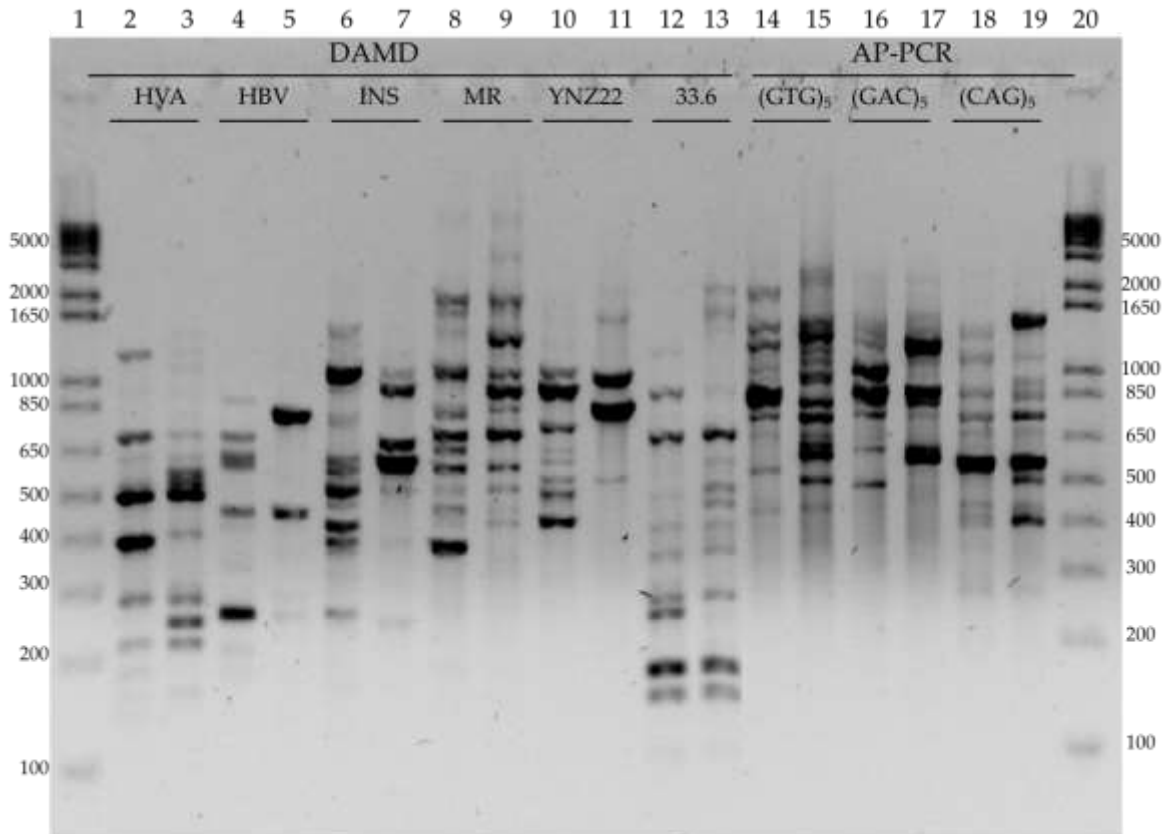
#### **4.2.7 Análisis de LC-MS de los extractos orgánicos**

Previo a su análisis por LC-MS, los extractos orgánicos de la cepa *S. parvisporogenes* S2A-04 se limpiaron a través de una capa de gel de sílice de fase reversa (C-18, 40-60 µm, Merck) y se analizaron en un cromatógrafo Agilent 1260 RR (Agilent, Santa Clara, CA, EE. UU.). En las mismas condiciones y analizadas como se describió anteriormente 3.3.6.

### **4.3 RESULTADOS**

#### **4.3.1 Huella genética de las cepas de *S. manipurensis* S3A-05 y S3A-09**

El análisis de la huella genética de *S. manipurensis* S3A-05 y S3A.09 utilizando nueve cebadores, seis DAMD y tres AP-PCR, dio como resultado perfiles genéticos diferentes en ambas cepas. En el Cuadro 4.3 se puede apreciar el número total de bandas, el número de bandas polimórficas, el porcentaje de polimorfismo y el contenido de información polimórfica (PIC) obtenidos. La Figura 4.1 muestra el resultado de los perfiles genéticos de las dos cepas con los diferentes cebadores.



**Figura 4.1** Patrón de bandas obtenidas con los primers Banding DAM (carriles 2-13) y AP-PCR (carriles 14-19). Carriles 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16 y 18 *S. manipurensis* S3A-05. Carriles: 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17 y 19 *S. manipurensis* S3A-09. Carriles, 1 y 20: 1 kb marcador de peso molecular.

Los seis cebadores DAMD obtuvieron el mayor número de bandas amplificadas (83) y el mayor rango de tamaño de fragmentos (141-5000 pb). Del total de las bandas, 31 fueron polimórficas con una frecuencia promedio de polimorfismo del 35%. El número de fragmentos polimórficos varió de 2 a 8, con un promedio de 5. El cebador MR tuvo el polimorfismo más alto (50%). El rango de tamaño de las bandas polimórficas fue de aproximadamente 425-1,020 pb. Se obtuvo un total de 8 fragmentos polimórficos con un PIC de 0.38 (Cuadro 4.3 y Figura 4.1).

Los marcadores AP-PCR, a pesar de revelar un número menor de bandas amplificadas, tuvieron el mayor porcentaje de polimorfismo (40%). En total, se amplificaron 39 bandas, de los cuales 16 fueron polimórficas. El cebador (CAG)<sub>5</sub> fue el más informativo, revelando el mayor grado de polimorfismo entre las cepas (50%). El rango de tamaño de bandas

polimórficas observadas fue de aproximadamente 406-850 bp, se obtuvieron 7 fragmentos polimórficos con un PIC de 0.38 (Cuadro 4.3 y Figura 4.1).

El estudio indicó que el polimorfismo más alto fue para los cebadores AP-PCR con un 40% y el valor PIC más alto fue para los cebadores DAMD con un promedio de 0.49 (Cuadro 4.3).

**Cuadro 4.3** Número total de bandas, bandas polimórficas, polimorfismo y contenido de información polimórfica (PIC) obtenidos de los cebadores DMAD y AP-PCR.

Nombre del cebador	Rango del tamaño de banda (pb)	Número total de Bandas	Bandas monomórficas	Bandas Polimórficas	% Polymorfismo	PIC
DAMD	-					
HVA	141-13541	17	9	8	47	0.40
HBV	214-879	10	8	2	20	0.60
INS	248-1432	13	9	4	31	0.52
MR	340-5000	16	8	8	50	0.38
YNZ22	425-2000	11	9	2	18	0.61
33.6	157-2000	16	9	7	44	0.42
Total	141-5000	83	52	31	210	2.93
Mean	—	14	9	5	35	0.49
AP-PCR						
(GTG) <sub>5</sub>	445-2500	16	10	6	37	0.47
(GAC) <sub>5</sub>	500-2000	9	6	3	33	0.50
(CAG) <sub>5</sub>	275-3000	14	7	7	50	0.38
Total	275-3000	39	23	16	120	1.35
Promedio	—	13	8	5	40	0.45

#### 4.3.2 Actividad anti-Candida de cepas de *Streptomyces* cultivadas en los medios de inducción

La mayoría de los sobrenadantes activos de las cepas cultivadas en los medios de inducción presentaron valores de pH alcalinos o ligeramente alcalinos. Los cultivos con pH ácido fueron *S. manipurensis* S3A-05 en el medio GIPC (pH 4.5), *S. manipurensis* S3A-09 en los medios GI (pH 5.3), PC (pH 5.5) y GIPC (pH 4.7). El sobrenadante del

cultivo de *S. parvisporogenes* S2A-04 en el medio GIHS correspondió al único que tuvo un pH neutro (Cuadro 4.4).

El 92% de los sobrenadantes de cultivos de las tres cepas en estudio tuvieron actividad anti-*Candida* en los medios de inducción evaluados, con excepción del cultivo de la cepa *S. parvisporogenes* en el medio AI y *S. manipurensis* S3A-09 en el medio GIPC. Todos los cultivos de la cepa de *S. manipurensis* S39-05 fueron activos (Cuadro 4.4.). Los sobrenadantes de los cultivos activos de las tres cepas presentaron un efecto fungicida sobre la levadura. Ninguno de los blancos presentó actividad antifúngica (Anexo 1).

El porcentaje de rendimiento que se obtuvo al liofilizar los sobrenadantes estuvo entre el 0.1% y 1%. Comparados con el medio ISP2 de referencia, los rendimientos obtenidos son bajos. Los liofilizados de los sobrenadantes de los cultivos de *S. manipurensis* S39-05 en el medio AIHS y los de de *S. manipurensis* S39-09 en los medios PC, HS y GIPC, fueron los que tuvieron el mayor porcentaje. Los SN del cultivo de *S. parvisporogenes* S2A-04 en los medios PC y GIHS, mostraron el más bajo rendimiento (<0.1%), (Anexo 2).

**Cuadro 4.4** Actividad anti-*Candida* de los sobrenadantes de *Streptomyces* sp. cultivadas en los diferentes medios de inducción y el medio ISP2.

Medios	SN Actividad			pH del cultivo		
	S.04	S.05	S.09	S.04	S.05	S.09
AI	-	+	+	8.5	8.5	7.4
GI	+	+	+	8.1	8.7	5.3
PC	+	+	+	8.0	8.8	5.5
HS	+	+	+	7.7	8.9	8.6
AIPC	+	+	+	7.9	8.8	8.5
AIHS	+	+	+	7.5	8.8	8.4
GIPC	+	+	-	8.1	4.5	4.7
GIHS	+	+	+	7.1	8.7	8.6
ISP2	+	+	+	7.7	8.1	8.4

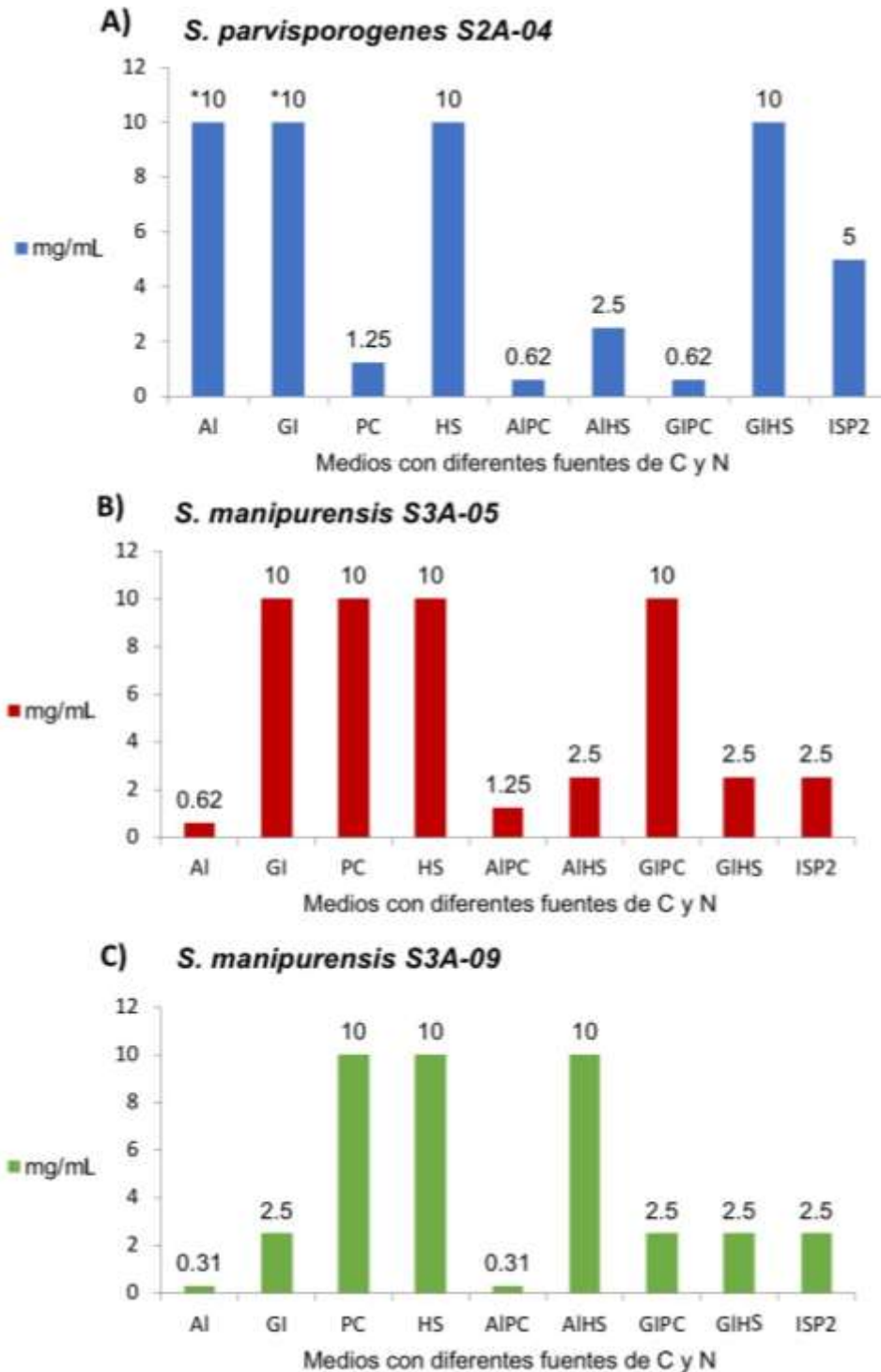
S.04: *S. parvisporogenes* S2A-04. S.05: *S. manipurensis* S3A-05. S.09: *S. manipurensis* S3A-09. SN: Sobrenadante, (+): Activo, (-): No activo

Cuatro de los SN liofilizados activos de la cepa *S. parvisporogenes* S2A-04 presentaron una CMI menores (0.6–2 mg/mL) respecto al medio de referencia ISP2 (5 mg/mL). Estos correspondieron a los medios PC, AIPC, AIHS y GIPC, donde la mezcla binaria de PC con AI y GI mostraron la menor MIC de 0.62 mg/mL. Los cultivos en HS y GIHS tuvieron una menor actividad con una MIC de 10 mg/mL (Figura 4.2A).

Los SN liofilizados de la cepa *S manipurensis* S3A-05 con mayor actividad fueron los cultivos de los medios AI y AIPC con una MIC de 0.31 mg/mL, menor al del cultivo en el medio de referencia (2.5 mg/mL). Los SN de los cultivos en los medios GI, GIPC y GIHS, tuvieron una MIC igual al medio ISP (Figura 4.2B).

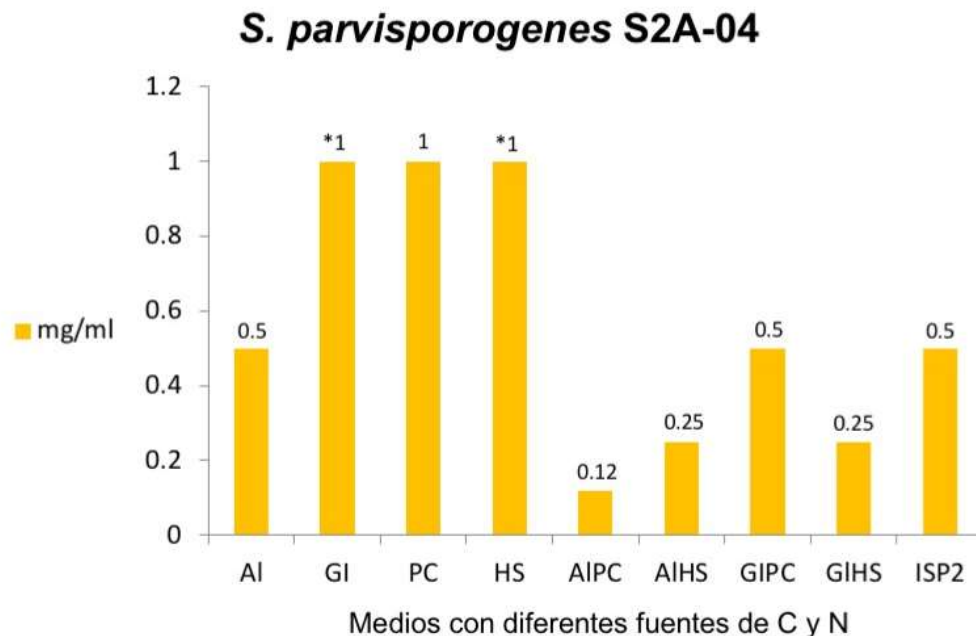
El SN de *S manipurensis* S3A-09, presentó su mayor actividad anti-*Candida* en el medio AI, con una CMI d de 0.62 mg/mL. Los sobrenadantes de los cultivos que tuvieron una CMI igual al medio ISP2 (5 mg/mL) se detectaron con los medios AIHS y GIHS. (Figura 4.2C).

Al comparar la CMI de los sobrenadantes de las tres cepas cultivadas en los medios de inducción con la obtenida en el medio de referencia ISP2, se observó que las cepas incrementan su actividad anti-*Candida* en el medio AIPC. Sin embargo, es notorio que en el medio AI, las dos cepas de *S. manipurensis* mantienen su más baja CMI, no así en *S. parvisporogenes* que en los medios binarios con PC (AIPC y GIPC) y en el medio PC mantienen su mejor efectividad. Cuando los medios se enriquecen sólo con HS, la actividad anti-*Candida* se pierde en las tres cepas, pero la respuesta es variable en los medios binarios (Figura 4.2).



**Figura 4.2** Concentración mínima inhibitoria (MIC) de los sobrenadantes liofilizados de cepas de *Streptomyces* sp. cultivadas en los diferentes medios de inducción (AI, GI; PC, HS, AIPC, AIHS, GIPC y GIHS) y en el medio de referencia (ISP2). (\*) Valores de MIC >10 mg/mL. A) *S. parvisporogenes*. B) *S. manipurensis* S3A-05. C) *S. manipurensis* S3A-09. C: Carbono. N: Nitrógeno.

Los extractos etanólicos de los sobrenadantes liofilizados de las tres cepas cultivadas en los medios de inducción, se evaluaron contra *C. albicans*. La actividad antifúngica solo se detectó en los extractos etanólicos de los SN de la cepa *S. parvisporogenes* S2A-04. Los extractos etanólicos de las cepas *S. manipurensis* S3A-05 y *S. manipurensis* S3A-09, no presentaron actividad anti-*Candida* a una concentración de 1 mg/mL, la cual fue la mayor concentración a la que se evaluaron (Figura 4.3).



**Figura 4.3** Concentración mínima inhibidora (CMI) de los extractos etanólicos de los sobrenadantes de los cultivos de *Streptomyces parvisporogenes* S2A-04 en los diferentes medios de inducción y en el medio ISP2. (\*) Valores de CMI >1 mg/mL.

Los residuos obtenidos de la extracción etanólica de los SN liofilizados de las tres cepas, no presentaron actividad anti-*Candida* (Anexo 3).

#### 4.3.3 Análisis de LC-MS de los extractos orgánicos

El análisis de dereplicación LC/MS de los extractos etanólicos de los sobrenadantes de los cultivos de *S. parvisporogenes* S2A-04 en los medios de inducción, indicó la aparición de compuestos conocidos pertenecientes a diferentes clases, estos se identificaron utilizando la base de datos de metabolitos microbianos propietaria de MEDINA y el Diccionario Chapman & Hall de Productos Naturales. El resultado reveló la presencia de carbazomicina G en todos

los extractos de los sobrendantes del cultivo de la cepa en los medios de inducción (Anexo 5). Este compuesto fue detectado como mayoritario en el extracto etanólico del cultivo de la cepa en el medio ISP2 (capítulo III). Los picos de carbazomicina G (2.30 min RT) con mayor intensidad en los cromatogramas se detectaron en los extractos de los medios AI, GI, HS y GIHS, pero es minoritario en el extracto orgánico de mayor efectividad anti-*Candida*, AIPC (0.12 mg/mL). (Anexo 5 y 6).

Además de la carbazomicina G se detectaron once compuestos conocidos en los extractos etanólicos de los cultivos de *S. parvisporogenes* S2A-04 en los diferentes medios de inducción. Algunos de ellos están presentes en más de un extracto de los medios de cultivo, otros sólo en uno en particular. Los compuestos identificados correspondieron a 2-(1,3-pentadienil)-piperidina, *N*-(2-(1*H*-indol-3-il)-2-oxoetil)-acetamida, coproporfirina III, estreptazolina, *N*-acetiltiramina, *N,N*-dimetiladenosina, hemioxantromicina A, albociclina, daidzeína, gliciteína y piracrimicina A (Cuadro 4.5).

**Cuadro 4.5.** Análisis de los extractos activos por LC/MS y algunos de los compuestos sugeridos por la base de datos de metabolitos microbianos, propiedad de la Fundación MEDINA (Granada, España) y el Diccionario Chapman & Hall de Productos Naturales (v25.1).

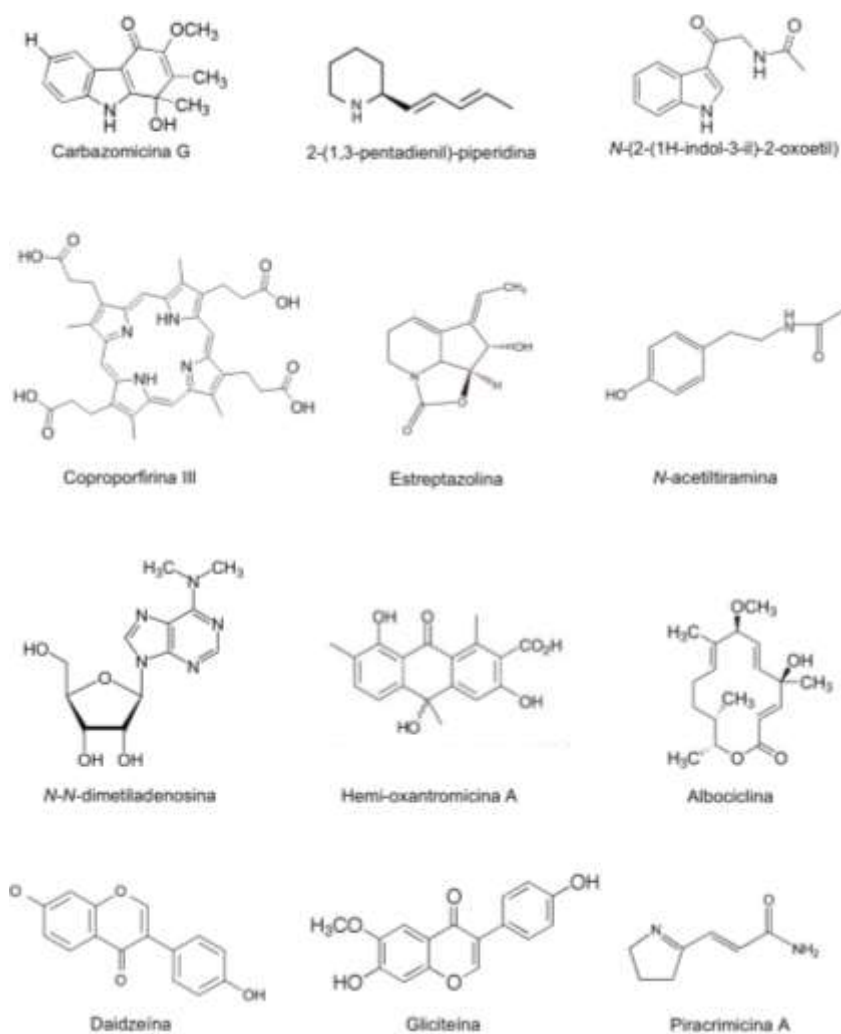
Compuesto sugerido	TR	<i>m/z</i>	Fórmula	Extractos etanólicos									
				AI	GI	PC	HS	AIPC	AIHS	GIPC	GIHS	ISP2	
Carbazomicina G	2.30	258.1122	C <sub>15</sub> H <sub>15</sub> NO <sub>3</sub>	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
2-(1,3-Pentadienil) piperidina	1.15	152.1433	C <sub>10</sub> H <sub>17</sub> N	—	X	—	X	X	X	X	X	X	—
<i>N</i> -(2-(1 <i>H</i> -indol-3-il)-2-oxo-etil) acetamida	1.29	217.0972	C <sub>12</sub> H <sub>12</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	X	—	—	X	—	—	—	—	X	—
Coproporfirina III	4.2	655.2729	C <sub>36</sub> H <sub>38</sub> N <sub>4</sub> O <sub>8</sub>	—	—	X	—	—	—	—	X	—	—
Estreptazolina	1.5	208.0952	C <sub>11</sub> H <sub>13</sub> NO <sub>3</sub>	X	—	—	—	—	—	—	—	X	—
<i>N</i> -acetiltiramina	0.6	180.1012	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	—	—	—	—	—	—	X	—	—	X
<i>N,N</i> -Dimetiladenosina	0.65	296.1310	C <sub>12</sub> H <sub>17</sub> N <sub>5</sub> O <sub>4</sub>	X	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Hemi-oxantromicina A	3.28	330.1025	C <sub>18</sub> H <sub>16</sub> O <sub>6</sub>	—	—	—	X	—	—	—	—	—	—
Albociclina	4.84	309.2062	C <sub>18</sub> H <sub>28</sub> O <sub>4</sub>	—	—	—	—	—	—	—	X	—	—
Daidzeina	2.48	255.0653	C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>4</sub>	—	—	—	—	—	—	—	—	X	—
Gliciteina	2.63	285.0761	C <sub>16</sub> H <sub>12</sub> O <sub>5</sub>	—	—	—	—	—	—	—	—	X	—
Piracrimicina A	0.95	138.0818	C <sub>7</sub> H <sub>10</sub> N <sub>2</sub> O	—	—	—	—	—	—	—	—	X	—

Presencia: X. Ausencia: —. AI (almidón), GI (glicerol), PC (peptone de carne), HS (harina de soya), Almidón-Peptona de carne (AIPC), Almidón-Harina de soya (AIHS), Glicerol-Peptona de carne (GIPC), Glicerol-Harina de soya (GIHS).



El actinomiceto *S. parvisporogenes* S2A.04 produjo el compuesto 2-(1,3 pentadienil) piperidina en la mayoría de los EE de los SN liofilizados, estos se detectaron en los medios GI, HS, AIPCP, AIHS, GIPC y GIHS. El compuesto *N*-(2(1*H*-indol-3-il)-2-oxoetil) acetamida se detectó en tres extractos, AI, HS y GIHS. Se encontró coproporfirina III en los extractos PC y GIPC, estreptazolina en AI y GIHS, se detectó *N*-acetiltiramina en AIHS y el medio de referencia ISP2.

El medio de cultivo con el mayor número de compuestos conocidos detectados correspondió al extracto obtenido del medio enriquecido con GIHS, estos fueron seis, 2-(1,3-pentadienil) piperidina, *N*-(2-(1*H*-indol-3-il)-2-oxo-etil) acetamida, estreptazolina, daidzeína, gliciteína y una posible piracrimicina A.



**Figura 4.4** Compuestos identificados en los extractos etanólicos del cultivo de *S. parvisporogenes* S2A-04 en los diferentes medios de inducción.

#### 4.4 DISCUSIÓN

Las técnicas moleculares AP-PCR y DAMD utilizadas para la huella genética de las cepas de *S. manipurensis* revelaron un perfil genético diferente entre ellas. Los cebadores MR de DAMD y (CAG)<sub>5</sub> de AP-PCR fueron los que produjeron patrones de banda útiles para la diferenciación intraespecífica de las cepas. Los valores para el índice del contenido polimórfico demuestran la utilidad de estas dos técnicas para describir la variabilidad genética entre los aislados de *S. manipurensis* estudiados en este trabajo, sin embargo, el cebador (GAC)<sub>5</sub> tiene el mayor poder de discriminación a nivel intraespecie. La técnica de AP-PCR se ha utilizado en diversos trabajos para diferenciar cepas de una misma especie obtenidas en un mismo nicho ecológico. Quadrie *et al.* (2016) utilizó esta técnica para identificar tres cepas de *Actinorectispora* aisladas de un suelo en la India. Sree *et al.* (2014) analizó con tres cebadores dos cepas de actinomicetos aisladas en suelos de Colachel, Kanyakumari, India, obteniéndose siete bandas de las cuales tres fueron polimórficas con un porcentaje de polimorfismo de 42.58%.

Los resultados del estudio revelaron una diversidad genética a nivel intraespecie, por lo tanto, los marcadores AP-PCR y DAMD son muy eficientes para revelar la variabilidad interespecífica entre los aislados de esta especie, siendo una herramienta poderosa en los estudios de diversidad genética. Estas técnicas son utilizadas para distinguir organismos estrechamente relacionados mediante patrones polimórficos, obtenidos de la amplificación del ADN con cebadores aleatorios, por lo cual, no se necesita información sobre una secuencia (Cheepnam, 2013). Peteira *et al.*, 2014, empleó cebadores arbitrarios para conocer mediante sus huellas genéticas, la variabilidad molecular en una colección de bacterias simbiotes de nemátodos entomopatógenos, con los cebadores utilizados obtuvo elevados porcentajes de polimorfismo. Borozan *et al.*, 2017; empleo DAMD para el estudio de la diversidad genética en las poblaciones de actinomicetos en la rizosfera de la vid. El polimorfismo detectado en las cepas *S. manipurensis* (S3A-05 y S3A-09), refleja la diversidad genética a nivel especie. Actualmente, se considera que una especie procariota es un grupo genómicamente coherente de individuos/cepas, que comparten un alto grado de similitud en características independientes (Rosselló-Mora y Amann 2001). Estos hallazgos indican un vínculo entre las características de su actividad anti-candida y la presencia o ausencia de sus genes biosintéticos en las cepas de *S. manipurensis*. Sin embargo, la desventaja de los marcadores inespecíficos, es que

fragmentos del mismo tamaño podrían ser originados en regiones no homólogas, lo que puede distorcionar las estimaciones de similitud génica (Hoz *et al.*, 1996).

Los resultados de la evaluación anti-*Candida* de los tres aislados, mostraron variabilidad del efecto en al menos dos medios de inducción donde se cultivaron, respecto del medio de referencia ISP2. Por otra parte, la mayoría de estos sobrenadantes mostraron pH alcalino, independientemente de la actividad encontrada contra *C. albicans*, esto indica que el pH alcalino no causa ninguna interferencia con el crecimiento o la supervivencia del patógeno. Lo mismo sucede con los sobrenadantes con pH ácido, esto se debe a que el rango de crecimiento de *C. albicans* es entre 3-8, con condiciones óptimas entre 5.1-6.9 (Sánchez-Vargas *et al.*, 2002).

Los SN que mostraron un incremento de su actividad contra *C. albicans* son los de *S. manipurensis* S3A-05 cultivados en los medios AI y AIPC y el cultivo de *S. manipurensis* S3A-09 en medio AI (0.31 mg/mL y 0.62 mg/mL respectivamente). En el caso de *S. manipurensis* S3A-09 cuando se cultiva en el medio AIPC, la actividad disminuye respecto del medio AI (0.62 mg/mL) y en el medio AIHS la actividad permanece igual a la del medio de referencia (2.5 mg/mL). El cambio de la fuente de carbono (extracto de malta) en el medio ISP2 por almidón y el aumento de la actividad antifúngica para las cepas de *S. manipurensis* estudiadas coinciden con lo informado por Houssam *et al.* (2011), quienes revelaron que el almidón es la mejor fuente de carbono para la biosíntesis de compuestos antifúngicos durante la optimización de la producción. Bhosale *et al.* (2015) describieron que en los estudios de optimización para la producción de compuestos antifúngicos por *Streptomyces werraensis* se observó la producción máxima de antimicóticos con fuentes de carbono complejas como el almidón. El rápido crecimiento respaldado por altas concentraciones de azúcares metabolizados rápidamente a menudo suprime la producción de metabolitos secundarios a través del mecanismo regulador de la represión del catabolito de carbono (Lee *et al.*, 2014). En *Streptomyces*, la regulación de la fuente de carbono, comúnmente conocida como represión del catabolito de carbono (CCR), es uno de los mecanismos más conservados que protegen las células contra el desperdicio de la maquinaria de síntesis de proteínas. Este mecanismo regula la expresión de genes involucrados en la absorción y utilización de fuentes alternativas de carbono y funciona cuando más de un sustrato utilizable está presente en el medio ambiente. Hasta 10% de todos los genes bacterianos están sujetos a este tipo de regulación. (Romero-Rodríguez *et al.*, 2016). A menudo, se sabe que las fuentes de carbono complejas de asimilación

lenta, como los polisacáridos, estimulan la producción de metabolitos secundarios, ya que estas sustancias no causan la represión de catabolitos en los que se inhibe la producción de enzimas de la biosíntesis de metabolitos secundarios (Holkar *et al.*, 2013). Esto significa que el almidón como fuente de carbono podría ser una influencia para el aumento de la actividad.

La cepa de *S. parvisporogenes* S2A-04 cultivada en los medios de inducción con almidón (Al), glicerol (Gl) y con harina de soja (HS) por separado, mostró una actividad menor que la obtenida usando el medio de referencia ISP2 (10 mg/mL). Sin embargo, cuando la cepa se cultiva con peptona de carne como fuente de nitrógeno, sola o mezclada con almidón o glicerol como fuentes de carbono (PC, AIPC y GIPC), tuvo mayor actividad que el medio de referencia ISP2 (1.25, 0.62, 0.62 mg/mL respectivamente). Estos datos coinciden con diferentes trabajos desarrollados. Mangamuri *et al.* (2012) informaron que una concentración de 1% de peptona de carne en los medios de cultivo es positiva para el aumento de la actividad antimicrobiana de *Streptomyces cheonanensis* VUK-A. Ayari *et al.* (2016) investigaron la influencia de las fuentes de nitrógeno en la actividad anti-*Candida* de la cepa de *Streptomyces* sp. AA13. La mayor actividad se produjo a través de la suplementación con peptona. Cuando la cepa se cultiva en una mezcla de almidón y harina de soya (AlHS), la actividad aumenta (2.5 mg/mL) en comparación con el medio de referencia, esto muestra que dos fuentes complejas de carbono y nitrógeno mezcladas influyen en la elevación de la actividad fúngica de la cepa. Entre los factores externos con influencia en la biosíntesis de metabolitos secundarios por microorganismos, las fuentes de carbono y nitrógeno son muy relevantes, ya que están relacionadas tanto con la disponibilidad del sustrato para la síntesis de metabolitos como con la modulación del proceso enzimático y pueden activarse y estabilizar las enzimas involucradas en el proceso (El-Naggar *et al.*, 2015).

Los resultados de la actividad de *S. parvisporogenes* S2A-04 sugieren que la peptona de carne, como fuente de nitrógeno, influye en su actividad antifúngica. Es bien sabido que los cambios en el tipo y la concentración de las fuentes de nitrógeno afectan la síntesis de antibióticos. El efecto inhibitor de muchos compuestos N sobre la síntesis de antibióticos puede observarse mediante fuentes de nitrógeno rápidamente utilizadas, como el amoníaco, el nitrato y ciertos aminoácidos. Por lo tanto, la selección adecuada de la fuente de nitrógeno puede mejorar la producción de antibióticos, particularmente usando compuestos de N de liberación lenta para evitar la inhibición (Shao *et al.*, 2015). Para

responder a los cambios en la disponibilidad de nitrógeno, las Actinobacterias han desarrollado un complejo sistema regulador para la asimilación de nitrógeno, que comprende el control transcripcional y postraduccion. La respuesta celular a la limitación de nitrógeno en el nivel transcripcional, es controlada por el regulador global de respuesta al nitrógeno GlnR, cuyo rol fue ampliamente explorado para *S. coelicolor* (Amin *et al.*, 2016). Aunque la presencia de altas concentraciones de amonio generalmente se correlaciona positivamente con la tasa de crecimiento, el amonio generalmente reprime la utilización de fuentes alternativas de nitrógeno y retrasa el inicio de la producción secundaria de metabolitos. Por lo tanto, el agotamiento del amonio favorece una tasa de crecimiento más baja y estimula la producción de antibióticos en muchas especies (Wohlleben *et al.*, 2017). En *Streptomyces*, los estudios muestran que la fuente de carbono compleja induce, en la mayoría de las veces, el aumento de la actividad, en lugar de la fuente de nitrógeno (Bhavana *et al.*, 2014; Holkar *et al.*, 2013, Vijayakumar *et al.*, 2012).

Los extractos etanólicos y los residuos sólidos de los SN liofilizados de las cepas de *S. manipurensis* cultivadas en los medios de inducción, no mostraron actividad. El resultado coincide con el trabajo anterior, donde el extracto etanólico y el residuo del SN liofilizado del cultivo del medio de referencia ISP2, no presentaron actividad. Esto prueba que los compuestos antifúngicos producidos por estas cepas podrían ser proteínas o enzimas que perdieron su actividad durante la extracción etanólica o que existe un efecto sinérgico entre los compuestos en el sobrenadante que se pierde durante la separación en la extracción orgánica (Escalante-Réndiz *et al.*, 2019). Otro factor podría ser la naturaleza hidrófilica de los compuestos presentes en los residuos, determinante para la actividad. Lo anterior debido a que deben producirse en una gran cantidad para mantener la concentración efectiva cerca de la superficie de la célula, lo que significa un mayor uso de energía para estos microorganismos (Thakur y Anil, 2000).

Los resultados del bioensayo antifúngico para los extractos etanólicos de los SN liofilizados de *S. parvisporogenes* S2A-04 en los medios de inducción muestran que la actividad se encuentra en los extractos orgánicos obtenidos con etanol y no en los residuos sólidos. El extracto del SN liofilizado del cultivo en AIPC fue el que tuvo la menor CMI (0.12 mg/mL), seguido por los extractos etanólicos de los cultivos AIHS y GIHS a CMI de 0.25 mg/mL. En este último, a pesar de no mostrar una actividad en su SN liofilizado, la actividad fue buena en el extracto orgánico. Esto podría deberse a un aumento de la

concentración de los compuestos anti-*Candida* de mediana polaridad después de la extracción, cuando las fases hidrofílicas y orgánicas se separan. Lo opuesto ocurre con el extracto del sobrenadante liofilizado del cultivo de PC, que mostró una actividad más alta que la del cultivo del medio de referencia, pero cuando se le realizó la extracción orgánica, la actividad disminuyó, dando como resultado una CMI más alta que el extracto del SN liofilizado del medio de referencia.

Los análisis de LC-MS para los extractos orgánicos de los SN liofilizados de *S. parvisporogenes* cultivados en los medios de inducción se compararon con sus respectivos blancos. En ellos se observó claramente la presencia de carbazomicina G en los extractos de todos los medios, con las mismas características detectadas en el extracto orgánico ISP2, con un tiempo de retención de 2.30 min (Escalante-Réndiz *et al.*, 2019). Comparando el área debajo del pico de carbazomicina G de todos los extractos orgánicos, podemos observar que la abundancia del compuesto en los extractos activos no es proporcional a la actividad anti-*Candida* que presentan. Esto sugiere que carbazomicina G no es el único responsable de la actividad antifúngica. Incluso lo que lleva a la posibilidad de la existencia de otros compuestos involucrados en esta actividad. Un segundo compuesto en común en seis de los extractos de *S. parvisporogenes* correspondió al 2-(1,3-pentadienil)-piperidina, detectado al cultivarlo en los medios GI, HS, AIPC, AIHS, GIPC y GIHS. Las piperidinas se han informado de otros estreptomicetos, siendo detectadas por primera vez en esta especie (Ohno *et al.*, 2015; Groenhagen *et al.*, 2014).

Entre los otros diez componentes detectados, la molécula *N*-(2-(1*H*-indol-3-il)-2-oxoetil) acetamida, es un alcaloide derivado de indol detectado en los extractos AI, HS y GIHS. Esta molécula ya se ha descrito a partir de especies del género *Streptomyces*. Las actividades reportadas incluyen la antitumoral, antibacterianas contra bacterias Gram-positivas (*Micrococcus luteus* y *S. aureus*) y Gram-negativas (*Salmonella enterica* y *Escherichia coli*), así como actividades antifúngicas (*Fusarium* sp.), (Abdelkader *et al.*, 2017; Smaoui *et al.*, 2012).

Entre los otros diez componentes detectados, la molécula *N*-(2-(1*H*-indol-3-il)-2-oxoetil) acetamida es un alcaloide derivado de indol detectado en los extractos AI, HS y GIHS. Esta molécula ya se ha descrito a partir de especies del género *Streptomyces*. Las actividades reportadas incluyen la antitumoral, antibacterianas contra bacterias Gram-

positivas (*Micrococcus luteus* y *S. aureus*) y Gram-negativas (*Salmonella enterica* y *Escherichia coli*), así como actividades antifúngicas (*Fusarium* sp.) (Abdelkader *et al.*, 2017; Smaoui *et al.*, 2012).

Las coproporfirinas III presentes en los extractos PC y GIPC son compuestos de la serie de porfirinas aislados de *Streptomyces* sp., son ampliamente utilizadas en la esterilización de la sangre, la terapia contra el cáncer y las terapias fotodinámicas de control de insectos y malezas (Martinez *et al.*, 2017; Locatelli *et al.*, 2013).

La estreptazolina se identificó en los extractos de AI y GIHS. Se informó por primera vez como un metabolito aislado de cultivos de *Streptomyces viridochromogenes* cepa Tü1678. También se reportó de *Streptomyces chartreusis* NA02069, junto con los nuevos alcaloides estreptazolininas A y B y de *Streptomyces thermoviolaceus* SRC3. Esta cepa, recientemente aislada de los sedimentos del río argelino, exhibió una amplia actividad contra varios patógenos humanos bacterianos y contra *C. albicans*. Recientemente se ha demostrado que la estreptazolina aumenta la destrucción bacteriana y la elaboración de citocinas inmunoestimuladoras por macrófagos *in vitro* (Djinni *et al.*, 2018; Luo *et al.*, 2018; Yang *et al.*, 2017).

La *N*-acetiltiramina está presente en los extractos de AIHS e ISP2. Este compuesto se aisló del endófito *Streptomyces* sp. YIM67086 con actividad antimicrobiana contra *B. subtilis*, también se ha aislado de *Streptomyces alni* sp. *nov* y tuvo actividad contra *S. aureus* y la línea celular de melanoma de ratón B16; el organismo lo produce en el caldo de fermentación ISP2 (Yang *et al.*, 2014; Liu *et al.*, 2009).

Vaden *et al.* (2017) aislaron y caracterizaron la *N-N*-dimetiladenosina de *Streptomyces coeruleoaurantiacus* SNA-024 aislado del mar. Este compuesto inhibe la señalización de AKT en una variedad de líneas celulares de cáncer de células no pequeñas. Este compuesto fue identificado por primera vez por Hammargren *et al.* (1991) y lo biosintetizó *S. parvisporogenes* únicamente en el medio de AI.

La hemi-oxantromicina A es un policétido de tipo antraquinona que se ha aislado de los actinomicetos terrestres *Actinomodura* sp. BCC47066 y *Streptomyces* sp. MST-134270. Las oxantromicinas naturales y sintéticas son inhibidores potentes y selectivos de la localización de la membrana plasmática (PM) de K-Ras, un factor clave de la oncogénesis en adenocarcinomas pancreáticos, adenomas de colon y cáncer de pulmón no

microcítico, su inhibición bloquea toda actividad oncogénica (Bunbamrung *et al.*, 2018, Salim *et al.*, 2014).

La macrolactona albociclina fue aislada por Tanabe Seiyaku Company en 1967 y Upjohn (como ingramicina) en 1968 a partir de cepas de *Streptomyces*. Gu *et al.* (2019) identificaron y caracterizaron recientemente 10 macrólidos de tipo albociclina, producidos por *Streptomyces* sp. 4205 aislada del suelo de arroz. Esta cepa mostró actividades antimicrobianas contra *C. albicans* con un valor de MIC de 10.0 mg/mL; también es un candidato muy prometedor para el tratamiento de MRSA y *S. aureus* resistente a la vancomicina (VRSA), se sugiere que la albociclina bloquea la biosíntesis de peptidoglucano de la pared celular de esta bacteria Gram positiva (Liang *et al.*, 2018, Chatare *et al.*, 2017; Koyama *et al.*, 2013).

Se ha informado que los isoflavonoides como la daidzeína poseen diversas actividades biológicas. Por ejemplo, actividades antioxidantes, antiinflamatorias, son inhibidores de diversas enzimas líticas o tienen actividades antifúngicas o estrogénicas. La daidzeína se ha aislado de *Streptomyces* de origen marino y terrestre, cuando se cultivan en extracto de malta o en medios de harina de soya (Shi *et al.*, 2012; Maskey *et al.*, 2003). El endófito *Streptomyces* sp. BT01 aislado del tejido radicular de *Boesenbergia rotunda* (L.) Mansf., produjo daidzeína en el caldo de fermentación ISP2, que fue activo contra bacterias Gram positivas: *S. aureus*, *Bacillus cereus* y *B. subtilis* y fue débilmente activo contra bacterias gram negativas: *E. Coli*, *Pseudomonas aeruginosa* (Taechowisan *et al.*, 2014).

La gliciteína es una isoflavona aglicona, generalmente se produce por biotransformación bacteriana de sustancias de medios de cultivo con glicitina (Rao *et al.*, 2013). *Streptomyces* sp. AC35 y *Streptomyces* spp. 060524 producen gliciteína con fuerte citotoxicidad contra la leucemia crónica humana K562 (Ondrejic̃ková *et al.*, 2016; Kannabiran y Deepika, 2016; Hu *et al.*, 2009).

La piracrimicina A o ciclamidomicina es una acrilamida con actividad antitripanosomal y antibacteriana, aislada por primera vez, por Coronelli en 1972 de *Streptomyces eridani*. Su modo de acción es mediante la inhibición de la nucleósido difosfato quinasa y la piruvato quinasa (en *E. coli*) y la fosforilación oxidativa en las mitocondrias hepáticas de ratas (Otoguro *et al.*, 2010; Coronelli *et al.*, 1972;).



De acuerdo a la bibliografía consultada, *S. parvisporogenes* S2A-04, produce en todos los medios de inducción metabolitos reportados con actividad citotóxica, antitumoral y cancerígena. En la mayoría de los medios el microorganismo produce compuestos antimicrobianos; en AI, GIPC y GHS sintetiza compuestos antifúngicos. En este último medio produce el compuesto estreptazolina reportado con actividad contra *C. albicans*, lo cual coincide en el presente trabajo. En los medios PC y GIPC produce el compuesto coproporfirina reportado como insecticida. El medio de inducción GHS presenta el perfil químico con la mayoría de los compuestos identificados, en este medio *S. parvisporogenes* sintetiza metabolitos con actividades citotóxica, antimicrobiana contra bacterias Gram positivas y negativas, antifúngica contra *C. albicans*, antiinflamatorias, antioxidantes y antitripanosomal (Djinni *et al.*, 2018; Deepika, 2016; Taechowisan *et al.*, 2014; Smaoui *et al.*, 2012; Kannabiran y Otoguro *et al.*, 2010).

## CAPITULO V

### 5.1 CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

#### 5.1.1 CONCLUSIONES

1. El 93% de las cepas identificadas molecularmente pertenecen al género *Streptomyces*, correspondientes a siete diferentes especies, siendo éstas *S. angustumyceticus*, *S. griseochromogenes*, *S. manipurensis*, *S. resistomycificus*, *S. parvisporogenes* y *S. libani*.
2. Las cepas *S. manipurensis* se reportan por primera vez para Latinoamérica y es el primer registro de una cepa de *S. parvisporogenes* obtenida en México.
3. El análisis de la huella genética de las dos cepas de *S. manipurensis* S3A-05 y S3A-09, aisladas en el mismo sitio de muestreo, evidenció que son diferentes.
4. Entre los 15 aislados, *S. parvisporogenes* (S2A-04) y las dos cepas de *S. manipurensis* (S3A-05 y S3A-09) son las que poseen actividad anti-*Candida*.
5. La presencia de los genes PKS y NRPS en las tres cepas estudiadas indica la existencia en sus genomas de un potencial biosintético de naturaleza policétida y péptidos no ribosomales.
6. Las tres cepas reaccionaron de manera particular a las diferentes fuentes de carbono y nitrógeno evaluadas. El almidón influye en el incremento de la actividad antifúngica en los cultivos de las cepas de *S. manipurensis*. La actividad de la cepa *S. parvisporogenes* aumenta con la peptona de carne como fuente de nitrógeno y se potencializa con la presencia de almidón o glicerol.
7. La cepa *S. parvisporogenes* cultivada en el medio de glicerol con harina de soya (GIHS) biosintetiza diversos metabolitos secundarios reportados con diferentes actividades biológicas.
8. La presente contribución confirma que los actinomicetos de los suelos tropicales mexicanos constituyen una fuente importante en la búsqueda de productos alternativos contra *C. albicans*.

### 5.1.2 PERSPECTIVAS

Los resultados de la presente contribución proporcionan la evidencia de la microflora de las regiones tropicales de México, los cuales deben continuar siendo explorados.

La cepa *S. parvisporogenes* S2A-04 debe continuar siendo estudiada para aislar el metabolito carbazomicina G, purificarlo y corroborar su actividad anti-*Candida*.

De igual manera, el resultado de la pérdida de la actividad de los extractos etanólicos de las cepas de *S. manipurensis* da la premisa de realizar estudios más amplios para corroborar si la actividad es dada por proteínas o enzimas quitinasas o gluconasas.

La presencia de los genes PKS y NRPS en el genoma de las cepas proporciona el conocimiento para realizar el análisis de su expresión génica, utilizando primers específicos, con la finalidad de determinar el gen o los genes involucrados en la síntesis de los metabolitos activos para mejorar su producción.

Este estudio da la pauta para continuar con la optimización en la producción de compuestos de interés con diferentes actividades biológicas, modificando en el cultivo otros factores tales como la temperatura, pH, cantidad de inóculo, entre otros, de esta manera se podrá realizar un estudio biodirigido en su producción.

**BIBLIOGRAFÍA**

- Abdelkader, M., T. Philippon, J. Asenjo, A. Bull, M. Goodfellow, R. Ebel, M. Jaspars y M. Rateb. (2018). Asenjonamides A–C, antibacterial metabolites isolated from *Streptomyces asenjonii* strain KNN 42.f from an extreme-hyper arid Atacama Desert soil. *The Journal of Antibiotics* 71, 425-431.
- Abdelmohsen, U.R.; T. Grkovic, S. Balasubramanian, M. S. Kamel, R. J. Quinn y U. Hentschel. (2015). Elicitation of secondary metabolism in actinomycetes. *Biotechnology Advances* 33, 798-811.
- Abdelmohsen, U. R., C. Yang, H. Horn, D. Hajjar, T. Ravasi y U. Hentschel. (2014). Actinomycetes from Red Sea Sponges: Sources for chemical and phylogenetic diversity. *Marine Drugs* 12, 2771-2789.
- Acosta-Martínez, V., J. Cotton, T. Gardner, J. Moore-Kucera, J. Zak, D. Wester y S. Cox. (2014). Predominant bacterial and fungal assemblages in agricultural soils during a record drought/heat wave and linkages to enzyme activities of biogeochemical cycling. *Applied Soil Ecology* 84, 69-82.
- Adam, D., M. Maciejewska, A. Naômé, L. Martinet, W. Coppieters, L. Karim, D. Baurain y S. Rigali. (2018). Isolation, characterization, and antibacterial activity of hard-to-culture actinobacteria from cave moonmilk deposits. *Antibiotics* 7, 28-48.
- Adegboye, M.F. y O. O. Babalola. (2015). Evaluation of antibiotic biosynthetic potential of actinomycete isolates to produce antimicrobial agents. *British Microbiology Research Journal* 5, 243-254.
- Adegboye, M. F. y O. O. Babalola. (2012). Taxonomy and ecology of antibiotic producing actinomycetes. *African Journal of Agricultural Research* 15, 2255-2261.
- Agrawal, S., D. Acharya, A. Adholeya, C. J. Barrow y S. K. Deshmukh. (2017). Nonribosomal peptides from marine microbes and their antimicrobial and anticancer potential. *Frontiers in Pharmacology* 8, 828.

- Ahmad, M.S., A. El-Gendy, R. R. Ahmed, H. Hassan, H. M. El-Kabbany y A. Merdash. (2017). Exploring the antimicrobial and antitumor potentials of *Streptomyces* sp. AGM12-1 isolated from Egyptian soil. *Frontiers in Microbiology* 8, 43.
- Al-Hulu, S. (2015). Effects of some conditions on antibacterial activity of actinomycetes spp. isolated from soil samples. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences* 9,1, 86-90.
- Ali, S., S. T. Asma, S. F. Nadeem y M. Samar. (2018). Strategies and kinetics of industrial fermentation for the mass production of various primary and secondary metabolites from microbes. *European journal of pharmaceutical and medical research* 5, 6, 595-606.
- Amin, R., M. Franz-Wachtel, Y. Tiffert, M. Heberer, M. Meky, Y. Ahmed, A. Matthews, S. Krysenko, M. Jakobi, M. Hinder, J. Moore, N. Okoniewski, B. Maček, W. Wohlleben y A. Bera. (2016). Post-translational serine/threonine phosphorylation and lysine acetylation: A novel regulatory aspect of the global nitrogen response regulator GlnR in *S. coelicolor* M145. *Frontiers in Molecular Biosciences* 3, 38.
- Anderson, J. A., G. A. Churchill, J. E. Autrique, S.D. Tanksley y M. E. Sorrels. (1992). Optimizing parental selection for genetic linkage maps. *Genome* 36, 181-186.
- Aoyagui, T., Y. Yagisawa, M. Kumagai, M. Hamada, H. Morishima, T. Takeuchi y H. Umezawa. (1973). New pepstatins, pepstatins BU, PR y AC produced by *Streptomyces*. *Journal of Antibiotics (Tokyo)* 26, 539-541.
- Arendrup, M. C., y T. F. Patterson. (2017). Multidrug-resistant *Candida*: Epidemiology, molecular mechanisms, and treatment. *The Journal of Infectious Diseases*, 216(suppl\_3), S445-S451.
- Arikan, S., L. Ostrosky-Zeichner, M. Lozano-Chiu, V. Paetznick, D. Gordon y T. Wallace. (2002). *In Vitro* activity of nystatin compared with those of liposomal nystatin, amphotericin B, and fluconazole against clinical *Candida* isolates. *Journal of Clinical Microbiology* 40, 1406-12.
- Ayari, A., H. Morakchi y D. Kirane-Gacemi. (2016). Evaluation of antifungal activity of novel marine actinomycete, *Streptomyces* sp. AA13 isolated from sediments of

- Lake Oubeira (Algeria) against *Candida albicans*. African Journal of Microbiology Research 10, 6, 156-171.
- Ayuso, A., D. Clark, I. Gonzalez, O. Salazar, A. Anderson y O. Genilloud. (2005). A novel actinomycete strain de-replication approach based on the diversity of polyketide synthase and nonribosomal peptide synthetase biosynthetic pathways. Applied Microbiology and Biotechnology 67, 795-806.
- Ayuso-Sacido, A. y O. Genilloud. (2005). 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. Microbial Ecology 49, 10-24.
- Balachandran, C., V. Duraipandiyar, N. Emi y S. Ignacimuthu. (2015). Antimicrobial and cytotoxic properties of *Streptomyces sp.* (ERINLG-51) isolated from Southern Western Ghats. South Indian Journal of Biological Sciences 1, 7-14.
- Banga, J., V. Praveen, V. Singh, C. K. M. Tripathi y V. Bihari. (2008). Studies on medium optimization for the production of antifungal and antibacterial antibiotics from a bioactive soil actinomycete. Medicinal Chemistry Research 17, 425-436.
- Baral, B., A. Akhgari y M. Metsä-Ketelä. (2018). Activation of microbial secondary metabolic pathways: Avenues and challenges. Synthetic and Systems Biotechnology 3, 3, 163-178.
- Barka, E. A., P. Vatsa, L. Sanchez, N. Gaveau-Vaillant, C. Jacquard, H. Klenk, Ch. Clément, Y. Ouhdouch y G. Wezeld. (2016). Taxonomy, physiology, and natural products of actinobacteria. Microbiology and Molecular Biology Reviews 8, 1, 1-43.
- Barona, G. F., U. Wong, A. E. Giannakopoulos, P. J. Derrick y G. L. Challis. (2004). Identification of a cluster of genes that directs desferrioxamine biosynthesis in *Streptomyces coelicolor* M145. Journal American Chemical Society 126, 16282-16283
- Bastidas, R. J., C. A. Shertz, S. C. Lee, J. Heitman y M. E. Cardenas. (2012). Rapamycin exerts antifungal activity *in vitro* and *in vivo* against *Mucor circinelloides* via FKBP12-dependent Inhibition of tor. Eukaryotic Cell 11, 3, 270-28.

- Bérdy, J. (2012). Thoughts and facts about antibiotics: Where we are now and where we are heading. *The Journal of Antibiotics* 65, 385-395.
- Bhatti, A. A., S. Haq y R. A. Bhat. (2017). Actinomycetes benefaction role in soil and plant health. *Microbial Pathogenesis* 111, 458-467.
- Bhavana, M., V. P. Talluri, K. Siva Kumar y S. V. Rajagopal. (2014). Optimization of culture conditions of *Streptomyces carpaticus* (MTCC-11062) for the production of antimicrobial compound. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences* 6, 8, 281-285.
- Bhosale, H. J., T. A. Kadam, S. G. Fulwad, M. A. Karale y O. S. Kanse. (2015). Optimization of antifungal compound production by a moderately halophilic *Streptomyces werraensis* HB-11. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research* 6, 3, 1190-1199.
- Bianchi-Smiraglia, A., J. A. Wawrzyniak, A. Bagati, E. K. Marvin, J. Ackroyd, S. Moparthy y M. A. Nikiforov. (2015). Pharmacological targeting of guanosine monophosphate synthase suppresses melanoma cell invasion and tumorigenicity. *Cell Death and Differentiation* 22, 11, 1858-1864.
- Bode, H. B.; B. Bethe, R. Höfs y A. Zeeck. (2002). Big effects from small changes: Possible ways to explore nature's chemical diversity. *ChemBioChem* 3, 619-627.
- Bolsakova, J. y A. Jirgensons. (2016). Synthesis of  $\alpha$ -ethynyl glycines. *European Journal of Organic Chemistry* 27, 4591-4602.
- Bontemps, C., M. Toussaint, P. V. Revol, L. Hotel, M. Jeanbille, S. Uroz, M. P. Turpault, D. Blaudez y P. Leblond. (2013). Taxonomic and functional diversity of *Streptomyces* in a forest soil. *FEMS Microbiology Letters* 342, 157-167.
- Borozan, A. H., S. Popescu, y O. M. Boldura. (2017). Plants root interference area, a benefit to the microbial community. *Bulletin of University of Agricultural Sciences and Veterinary Medicine Cluj-Napoca. Horticulture* 74, 1, 1.
- Bose, U., A. K. Hewavitharana, M. E. Vidgen, Y. K. Ng, P. N. Shaw, J. A. Fuerst y M. P. Hodson. (2014). Discovering the recondite secondary metabolome spectrum of

- Salinispora* species: A study of inter-species diversity. PLoS One 9, e91488.
- Brautaset, T., H. Sletta, K. F. Degnes, O. N. Sekurova, I. Bakke, O. Volokhan y S. B. Zotchev. (2011). New nystatin-related antifungal polyene macrolides with altered polyol region generated via biosynthetic engineering of *Streptomyces noursei*. Applied and Environmental Microbiology 77, 18, 6636-6643.
- Bridge, P.D., A. Pearce y M.A. Rutherford. (1997). VNTR derived oligonucleotides as PCR primers for population studies in filamentous fungi. Letters in Applied Microbiology 24, 426-430.
- Brudal, E., H. Winther-Larsen, D. J. Colquhoun, y S. Duodu. (2013). Evaluation of reference genes for reverse transcription quantitative PCR analyses of fish-pathogenic *Francisella* strains exposed to different growth conditions. BMC Research Notes 6, 76.
- Bunbamrungra, N., K. Supongb, Ch. Intaraudoma, A. Dramaeva, P. Auncharoena y P. Pittayakhajonwut. (2018). Anthrone derivatives from the terrestrial actinomycete *Actinomadura* sp. BCC47066. Phytochemistry Letters 25, 109-117.
- Butts, A., y D. J. Krysan (2012). Antifungal drug discovery: Something old and something new. PLoS Pathogens, 8, 9, e1002870.
- Cantón-Lacasa, E., E. Martín-Mazuelos y A. Espinel-Ingroff. (2007). Métodos estandarizados por el CLSI para el estudio de la sensibilidad a los antifúngicos (documentos M27-A3, M38-A y M44-A.). En Guía práctica de identificación y diagnóstico en micología clínica, 2nd ed.; Martín-Mazuelos, E., Rubio Calvo, C., Pemán García, F., Eds.; Asociación Española de Micología: Bilbao, España, 15, 1, 1-17; ISBN 978-84-611-8776-8.
- Canale-Guerrero, A., P. Chombo-Morales, C. Soto-Velazco, R. Sigüenza-López y A. I. Feria-Velasco. (2012). Biosíntesis de tetraciclina. e-Gnosis 10, 3, 1-10.
- Carro, L., V. Razmilic, I. Nouioui, L. Richardson, C. Pan, P. Golinska, J. A. Asenjo, A. T. Bull, HP. Klenk y M. Goodfellow. (2018). Hunting for cultivable *Micromonospora* strains in soils of the Atacama Desert. Antonie van Leeuwenhoek, 8, 1375-1387.



- Cespedes, C. L., J. Alarcon, P. M. Aqueveque, T. Lobo, J. Becerra, C. Balbontin, J. G. Avila, I. Kubo y D. S. Seigler. (2015). New environmentally-friendly antimicrobials and biocides from Andean and Mexican biodiversity. *Environmental Research* 142, 549-562.
- Claes, R. (1997). Mini- and microsatellites. *Environmental Health Perspectives* 105, Supplement 4.
- Clinical and Laboratory Standards Institute. (2008). Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts, Approved standard, 3rd ed.; CLSI document M27-A3; Clinical and Laboratory Standards Institute: Wayne, PA, USA, 14, 1-25.
- Concurso, H. L. y S. D. Bruner. (2012). Structure and noncanonical chemistry of nonribosomal peptide biosynthetic machinery. *Natural Product Reports* 29, 1099-1110.
- Córdova-Dávalos, L. E., K. G. Escobedo-Chávez y Z. Evangelista-Martínez. (2018). Inhibition of *Candida albicans* cell growth and biofilm formation by a bioactive extract produced by soil *Streptomyces* strain GCAL-25. *Archives of Biological Sciences* 70, 2, 387-96.
- Coronelli, C., G. Tamoni, G. Beretta y G. C. Lancini. (1972). Production, isolation and properties of pyrachimycin a, a new antibiotic from *Streptomyces eridani*. *The journal of antibiotics* 24, 8, 491-496.
- Czekajło, K. U., S. Giedrys-Kalemba y D. Mędrala. (2006) Phenotypic and genotypic characteristic of *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from hospitals in the north-west region of Poland. *Polish J Microbiol* 55,103-112.
- Chakraborty, S. y C. Saha (2013). Total synthesis of carbazomycin G. *European Journal of Organic Chemistry* 25, 5731-5736.
- Challis G. L. (2014). Exploitation of the *Streptomyces coelicolor* A3(2) genome sequence for discovery of new natural products and biosynthetic pathways. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 41, 219-232.

- Chas, Pfizer. (1960). Antibiotic designated compound 616 from *Streptomyces parvisporogenes*. Incorporation British Patent 832391.
- Chatare, V.K. y R. B. Andrade. (2017). Total Synthesis of (-)-Albocycline. *Angewandte Chemie International Edition* 56, 5909-5911.
- Chater, K. F (2016). Recent advances in understanding *Streptomyces*. *F1000Research* 5, 2795.
- Chaudhary, H. S., B. Soni, A. R. Shrivastava y S. Shrivastava. (2013). Diversity and versatility of actinomycetes and its role in antibiotic production. *Journal of Applied Pharmaceutical Science* 3, 8, 83-94.
- Chavan Dilip, V., S. S. Mulaje y R.Y. Mohalkar. (2013). A review on actinomycetes and their biotechnological application. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research* 4, 5, 1730-1742.
- Chen, H. y L. Du. (2015). Iterative polyketide biosynthesis by modular polyketide synthases in bacteria. *Applied Microbiology and Biotechnology* 100, 2, 541-557.
- Chen, J., J. J. Su, Y. Z. Wei, Q. P Li, L. Y. Yu, H. Y Liu, Y. Q. Zhang y Y. Q. Zhang. (2010). *Amycolatopsis xylanica* sp. nov., isolated from soil. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 60, 2124-2128.
- Dadar, M., R. Tiwari, K. Karthik, S. Chakraborty, Y. Shahali y K. Dhama. (2018). *Candida albicans*-biology, molecular characterization, pathogenicity, and advances in diagnosis and control – An update. *Microbial Pathogenesis* 117, 128-138.
- De La Rosa-García, S. (2007). Evaluación del potencial antimicrobiano de microorganismos aislados de cenotes de la península de Yucatán. Tesis de doctorado. Centro de Investigación Científica de Yucatán. 147, 148 pp.
- De la Rosa-García, S. y M. Gamboa-Angulo. (2011). Propiedades antimicrobianas de bacterias nativas de cenotes de Yucatán. En *Recursos genéticos microbianos en la zona golfo-sureste de México*, 1st ed.; Gamboa-Angulo, M., Rojas-Herrera, R., Eds.; Morevalladolid: Morelia, Michoacan, México; Chapter 7, Volume 1, pp. 98-108; ISBN 978-607-424-274-4.

- De la Rosa, García, S. (2016). Universidad Juárez Autónoma de Tabasco, Villahermosa, Tabasco, México. Comunicación Personal.
- De Lima Procópio, R. M., I. R Da Silva, M. K., Martins, J. L. De Azevedo y J. M. De Araújo. (2012). Antibiotics produced by *Streptomyces*. The Brazilian Journal of Infectious Diseases 5, 466-471.
- Demain, A. L. y S. Sanchez. (2009). Microbial drug discovery: 80 years of progress. The Journal of Antibiotics 62, 5-16.
- Demain, A.L. (2014). Importance of microbial natural products and the need to revitalize their discovery. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology 41, 185-201.
- Dhakal, D., A. R. Pokhrel, B. Shrestha y J. K. Sohng. (2017). Marine rare actinobacteria: Isolation, characterization, and strategies for harnessing bioactive compounds. Frontiers in Microbiology 8, 1106.
- Ding, D., G. Chen, B. Wang, Q. Wang, D. Liu, M. Peng y P. Shi. (2013). Culturable actinomycetes from desert ecosystem in northeast of Qinghai-Tibet Plateau. Annals of Microbiology 63, 259-266.
- Djinni, I., W. Djoudic, S. Souaguia, F. Rabiaa, S. Rahmounia, I. Mancinib y M. Kecha. (2018). *Streptomyces thermoviolaceus* SRC3 strain as a novel source of the antibiotic adjuvant streptazolin: A statistical approach toward the optimized production. Journal of Microbiological Methods 148, 161-168.
- Drancourt, M., P. Berger, y D. Raoult. (2004). Systematic 16S rRNA gene sequencing of atypical clinical isolates identified 27 new Bacterial species associated with humans. Journal of Clinical Microbiology 42, 5, 2197-2202.
- Dutta, S., J. R. Whicher, D. A. Hansen, W. A. Hale, J. A. Chemler, G. R. Congdon, A. R. H. Narayan, K. Hakansson, D. H. Sherman, J. L. Smith<sup>1</sup> y G. Skinotis. (2014). Structure of a modular polyketide synthase. Nature 510, 7506, 512-517.
- Dyson, P. (2011). *Streptomyces*: Biología molecular y Biotecnología. Edit. Horizonte de prensa científica. Pp: 195.

- Escalante-Réndiz, Diana, S. C. De-la-Rosa-García, J. Martín, F. Reyes, F. Vicente, R. Tapia-Tussell y M. Gamboa-Angulo. (2019). Molecular characterization and chemical profile of selected selected actinomycetes from Mexican tropical soils against *Candida albicans*. International Journal of Environmental Research and Public Health 16, 1913.
- Escher, S. K. S., J. J. V. de Sousa Júnior, A. L. Dias, E. L. C. de Amorim y J. M. Araújo. (2016). Influence of glucose and stirring in the fermentation process in order to produce anti-*Candida* metabolites produced by *Streptomyces* sp. Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences, 52, 2, 265-272.
- El-Kholy, A.M., O. M. Ali, E. M. El-Sikhry y A. I. Mohamed. (2013). Effect of sulphur application on the availability of some nutrients in Egyptian soils. Egyptian Journal of Soil Science 53, 361-377.
- Elkholy, Y.N., K. M. Aboshanab, W. F. Elkhatib, M. M. Aboulwafa y N. A. Hassouna. (2018). Isolation, screening and identification of two *Streptomyces* soil isolates exhibiting strong antimicrobial activities against extended spectrum Beta lactamase (ESBL) producers. World Journal of Pharmaceutical Sciences 6, 8, 65-78.
- Elks, J. y C. R. Ganellin. (2014). Dictionary of drugs. Chemical date, structures and bibliographies. Springer-science+business media, B.V. 950-951.
- El-Naggar, N-A., H. Moawad, N. M. El-Shweihy y S. M. El-Ewasy. (2015). Optimization of culture conditions for production of the anti-leukemic glutaminase free L-asparaginase by newly isolated *Streptomyces olivaceus* NEAE-119 using response surface methodology. Biomed Research International ID 627031.
- Evangelista, Z. y A. Moreno (2007). Metabolitos secundarios de importancia farmacéutica producidos por actinomicetos. Biotecnología 11, 3, 37-48.
- Evangelista-Martínez, Z. (2014). Isolation and characterization of soil *Streptomyces* species as potential biological control agents against fungal plant pathogens. World Journal of Microbiology and Biotechnology 30, 1639-1647.

- Fierer, N. y Jackson, R. B. (2006). The diversity and biogeography of soil bacterial communities. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103, 3, 626-631.
- Fjaervik, E. y S.B. Zotchev. (2005). Biosynthesis of the polyene macrolide antibiotic nystatinin *Streptomyces nourse*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 67, 4, 436-443.
- Flores, J., R. Durán y J. Ortiz. (2011). Comunidades terrestres. Comunidades vegetales terrestres. Ecosistemas y comunidades. Biodiversidad y desarrollo humano en Yucatán. Centro de Investigación científica de Yucatán (CICY).
- Forero, A., M. Sánchez, A. Chávez, B. Ruiz, R. Rodríguez-Sanoja, L. Servín-González y S. Sánchez. (2012). Possible involvement of the sco2127 gene product in glucose repression of actinorhodin production in *Streptomyces coelicolor*. *Canadian Journal of Microbiology* 58, 10, 1195-1201.
- Gao, B. y R. S. Gupta. (2012). Phylogenetic framework and molecular signatures for the main clades of the phylum Actinobacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 76, 66-112.
- Genilloud, O., I. González, O. Salazar, J. Martín, J. R. Tormo y F. Vicente. (2011). Current approaches to exploit actinomycetes as a source of novel natural products. *Journal of Industrial Microbiology* 38, 3, 375-389.
- Ghashghaei, S., Z. Etemadifar y M. R Mofid. (2017). Studies on the kinetics of antibacterial agent production in two actinomycete strains, F9 and Is5, isolated from soil samples, Iran. *Iranian Journal of Science and Technology, Transactions A: Science* 42, 3, 1139-1147.
- Gil, J. A. y A. B. Campelo-Diez. (2003). Candicidin biosynthesis in *Streptomyces griseus*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 60, 6, 633-642.
- Golińska, P. y H. Dahm. (2011). Occurrence of actinomycetes in forest soil. *Dendrobiology* 66, 3-13.

- Gómez-Guiñán, Y., J. Hidalgo, M Jiménez y J. Salcedo. (2003). Obtención de extractos orgánicos con actividad antimicrobiana a partir de *Penicillium* sp. (Moniliales) aislado de la esponja *Ircinia felix* (Porifera: Demospongiae). *Revista de biología tropical* 51, 141-147.
- Gómez-Krupko, M. (2014). Aislamiento y evaluación antifúngica de hongos endófitos de *Acalypha gaumeri* pax y K. Hoffm. Tesis de maestría. Centro de Investigación Científica de Yucatán. 74, 75.
- Goodfellow, M., K. Busarakam, H. Idris, D. P. Labeda, I. Nouioui, R. Brown, B. Y. Kim, M. C. Montero-Calasanz, B. A. Andrews y A. T. Bull. (2017). *Streptomyces asenjonii* sp. nov., isolated from hyper-arid Atacama Desert soils and emended description of *Streptomyces viridosporus* Pridham *et al.* 1958 Michael. *Antonie van Leeuwenhoek*, 110, 1133-1148.
- Goodfellow, M., P., H.J. Busse, M.E. Trujillo, K. Suzuki, W. Ludwig y W.B. Whitman. (2012). *Bergey's manual of systematic bacteriology*, vol 5. The actinobacteria, part A and B. Springer, New York, NY.
- Groenhagen, U., M. Maczka, J. S. Dickschat y S. Schulz. (2014). Streptopyridines, volatile pyridine alkaloids produced by *Streptomyces* sp. FORM5. *Beilstein Journal of Organic Chemistry* 10, 1, 1421-1432.
- Gu, CZ., S. H. Yuan, J. Lü, YJ. Qiao, YY. Song, MEA. Elzaki, CR. Yang, YJ. Zhang y RS. Zeng. (2019). Albocycline-type macrolides with antibacterial activities from *Streptomyces* sp. 4205. *Chemistry and Biodiversity*, 16, 1, 7.
- Guo, X., N. Liu, X. Li, Y. Ding, F. Shang, Y. Gao, J. Ruan y Y. Huang. (2015). Red soils harbor diverse culturable actinomycetes that are promising sources of novel secondary metabolites. *Applied and Environmental Microbiology* 81, 9, 3086-3103.
- Gutierrez-Lugo, M. y R. Mata. (2015). El género *Actinomadura* como una fuente de principios biodinámicos de interés medicinal y agroquímico. *Microbios en línea*. Ed. Martínez Romero E y Martínez Romero J, editores. Universidad Nacional Autónoma de México. ISBN 968-36-8879-9 <http://www.biblioweb.tic.unam.mx/libros/microbios/Cap14/>.

- Hagiwara, H., T. Choshi, H. Fujimoto, E. Sugino y S. Hibino. (2000). A novel total synthesis of antibiotic carbazole alkaloid carbazomycin G. *Tetrahedron* 56, 5807-5811.
- Hall, T. (1999). BioEdit software, version 5.0. 9. North Carolina State University, Raleigh, NC.
- Hamilton-Miller, J.M. (1973). Chemistry and biology of the polyene macrolide antibiotics. *Bacteriology Reviews* 37, 2, 166-196.
- Hammargren, W. M., K. H. Schram, K. Nakano, y T. Yasaka. (1991). *Analytica chimica acta*. Edit. Board 247, 201-209.
- Harsonowati, W., R. I. Astuti y A. T. Wahyudi. (2017). Leaf blast disease reduction by rice-phyllosphere actinomycetes producing bioactive compounds. *Journal of General Plant Pathology* 83, 98-108.
- Hasani, A., A. Kariminik y K. Issazadeh. (2014). *Streptomyces*: Characteristics and their antimicrobial activities. *International Journal of Advanced Biological and Biomedical Research* 2, 63-75.
- Hassan, A. A., A. M. El-Barawy M. N. El Mokhtar. (2011). Evaluation of biological compounds of *Streptomyces* species for control of some fungal diseases. *American Journal of Science* 7, 752-760.
- Heath, D. D., G. K. Iwama y R. H. Devlin. (1993). PCR primed with VNTR core sequence yields species specific patterns and hypervariable probes. *Nucleic Acids Res.* 21, 5782- 5785.
- Herberth, R.B. (2003). The biosynthesis of plant alkaloids and nitrogenous microbial metabolites. *Natural Product Reports* 20, 494-508.
- Holkar, S. K., D. N. Begde, N.A. Nashikkar, T. A. Kadam y A. A. Upadhyay. (2013). Optimization of some culture conditions for improved biomass and antibiotic production by *Streptomyces spectabilis* isolated from soil. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research* 4, 8, 2980-2987.
- Hong, K., A. Gao, Q. Xie, H. Gao, L. Zhuang, H. Lin, H. Yu, J. Li y X Yao, M. Goodfellow y

- J. Ruan. (2009). Actinomycetes for marine drug discovery isolated from mangrove soils and plants in China. *Marine Drugs* 7, 1, 24-44.
- Houssam, M. A., A. S. Bahobail y M. H. El-Sehrawi. (2011). Studies on isolation, classification and phylogenetic characterization of antifungal substance produced by *Streptomyces albidoflavus* -143. *New York Science Journal* 43, 40-53.
- Hoz, M. P. S., J. A. de la Dávila, Y Loarce y E. Ferrer. (1996). Simple sequence repeat primers used in polymerase chain reaction amplifications to study genetic diversity in barley. *Genome* 39, 1, 112-117
- Hsu, Y.-H., H.-Y. Chen, J.-C. Chen, Y.-H. Yu, Y.-C. Chou, S. W.-N. Ueng y S.-J. Liu. (2019). Resorbable beads provide extended release of antifungal medication: *In vitro* and *in vivo* analyses. *Pharmaceutics* 11, 11, 550.
- Hu, S. C., K. Hong, Y. C. Song, J. Y. Liu y R. X. Tan. (2009). Biotransformation of soybean isoflavones by a marine *Streptomyces* sp. 060524 and cytotoxicity of the products. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 25, 115-121.
- Hwang, K-S., H. U. Kima, P. Charusanti, B. Ø. Palsson y S. Y. Lee. (2014). Systems biology and biotechnology of *Streptomyces* species for the production of secondary metabolites. *Biotechnology Advances* 32, 2, 255-268.
- Ikeda, H., K., Shin-ya y S. Omura. (2013). Genome mining of the *Streptomyces avermitilis* genome and development of genome-minimized hosts for heterologous expression of biosynthetic gene clusters. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 41, 2, 233-250.
- Ishida K., K. Fritzsche y C. Hertweck. (2007). Geminal tandem c-methylation in the discoid resistomycin pathway. *Journal of the American Chemical Society* 129, 42, 12648-12649.
- Jiang, J., Y.-F. Sun, X. Tang, C.-N. He, Y.-L. Shao, Y.-J. Tang y W.-W. Zhou. (2018). Alkaline pH shock enhanced production of validamycin A in fermentation of *Streptomyces hygroscopicus*. *Bioresource Technology* 249, 234-240.



- Jonsbu, E.; M. McIntyre y J. Nielsen. (2002). The influence of carbon sources and morphology on nystatin production by *Streptomyces noursei*. *Journal of Biotechnology* 95, 2, 133-144.
- Kämpfer, P. (2015). *Streptomyces*. *Bergey's manual of systematics of Archaea and Bacteria*, 1-414.
- Kannabiran K. y L. Deepika. (2016). Cytotoxic activity of (2S, 5R, 6R)-2-Hydroxy- 3,5,6-trimethyloctan-4-one extracted from marine coastal soil derived *Streptomyces* sp. VITDDK3. *Advances in Biology, Biotechnology and Genetics* 3, 2, 01-08.
- Kaneda, M., T. Kithara, K. Yamasaki y S. Nakamura. (1990). Biosynthesis of carbazomycin B II. Origin of the whole carbon skeleton. *The Journal of Antibiotics (Tokyo)* 43, 1623-1626
- Kaneda, M., T. Naid, T. Kithara, S. Nakamura, T. Kitahara y S. Nakamura. (1988). Carbazomycins G and H, novel carbazomycin-congeners containing a quinol moiety. *The Journal of Antibiotics (Tokyo)* 45, 602-608.
- Kawai, K., G. Wang, S. Okamoto y K. Ochi. (2007). The rare earth, scandium, causes antibiotic overproduction in *Streptomyces* spp. *FEMS Microbiology Letters* 274, 2, 311-315.
- Keikha, N., S. A. A. Mousavi, A. R. Nakhaei, M. H. Yadegari, G. H. S. Bonjar y S. Amiri. (2015). *Vitro* evaluation of enzymatic and antifungal activities of soil- *Actinomycetes* Isolates and Their Molecular Identification by PCR. *Jundishapur Journal of Microbiology* 8, 5, e14874.
- Kim, B. S., S. S. Moon, y , B. K. Hwang. (1999). Isolation, identification, and antifungal activity of a macrolide antibiotic, oligomycin A, produced by *Streptomyces libani*. *Canadian Journal of Botany* 77, 6, 850-858.
- Kim, M., H.S. Oh, S. C. Park y J. Chun. (2014). Towards a taxonomic coherence between average nucleotide identity and 16S rRNA gene sequence similarity for species demarcation of prokaryotes. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 64, 346-351.

- Kim, S. H. y B. G. Kim. (2016). NAD(+)-specific glutamate dehydrogenase (EC.1.4.1.2) in *Streptomyces coelicolor*; *in vivo* characterization and the implication for nutrient-dependent secondary metabolism. *Applied Microbiology and Biotechnology* 100, 12, 5527-5536.
- Knölker, H.J., W. Fröhner y K. R. Reddy. (2003). Iron-mediated synthesis of carbazomycin G and carbazomycin H, the first carbazole-1,4-quinol alkaloids from *Streptoverticillium ehimense*. *European Journal of Organic Chemistry* 4, 740-746.
- Koneman, E.W. y S. Allen. (2008). Koneman. Diagnóstico microbiológico. 6ª edición. Editorial médica panamericana. Pp 818.
- Koyama, N., M. Yotsumoto, H. Onaka y H. Tomoda. (2013). New structural scaffold 14-membered macrocyclic lactone ring for selective inhibitors of cell wall peptidoglycan biosynthesis in *Staphylococcus aureus*. *The Journal of Antibiotics* 66, 303-304.
- Kulkarni-Almeida, A. A., M. K. Brahma, P. Padmanabhan, P. D. Mishra, R. R. Parab, N. V. Gaikwad, C. S. Thakkar, P. Tokdar, P. V. Ranadive, A. S. Nair, A. A. Damre, U. A. Bahirat, N. J. Deshmukh, L. S. Doshi, A. V. Dixit, S. D. George, R. A. Vishwakarma, K. V. S. Nemmani y G. B. Mahajan. (2011). Fermentation, isolation, structure, and antidiabetic activity of NFAT-133 produced by *Streptomyces* strain PM0324667. *AMB Express* 1, 42.
- Kumar, Y. y M. Goodfellow. (2010). Reclassification of *Streptomyces hygroscopicus* strains as *Streptomyces aldersoniae* sp. nov., *Streptomyces angustmyceticus* sp. nov., comb. nov., *Streptomyces ascomycinicus* sp. nov., *Streptomyces decoyicus* sp. nov., comb. nov., *Streptomyces milbemycinicus* sp. nov. and *Streptomyces wellingtoniae* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 60, 4, 769-75.
- Kumari, N., G. Luhadia, R. Mithal y E. Menghani. (2014). Search for antimicrobial agents produced by the soil actinomycetes. *International Journal of Genetic Engineering and Biotechnology* 5, 2, 147-152.
- Kwan, D.H. y F. Frank Schulz. (2011). The stereochemistry of complex polyketide biosynthesis by modular polyketide synthases. *Molecules* 16, 6092-6115.

- Lai, J. C., S. Feng y J. P. Roberts. (2012). An examination of liver offers to candidates on the liver transplant wait-list. *Gastroenterology* 143, 5, 1261-1265.
- Lautru, S., R. J. Deeth, L. M. Bailey y G.L. Challis. (2005) Discovery of a new peptide natural product by *Streptomyces coelicolor* genome mining. *Nature Chemical Biology* 1, 5, 265-269.
- Lee, J. Y. y B. K. Hwang. (2002). Diversity of antifungal actinomycetes in various vegetative soils of Korea. *Canadian Journal of Microbiology* 48, 5, 407-417.
- Lee, Y., MJ. Lee, YE. Choi, GT. Chun y YS. Jeong. (2014). Optimization of cultivation medium and fermentation parameters for lincomycin production by *Streptomyces lincolnensis*. *Biotechnology and Bioprocess Engineering* 19, 1014-1021.
- Leveau, J. Y. y M. Boux. (2000). *Microbiología Industrial: Los microorganismos de interés industrial*. Editorial ACRIBIA. España pp. 417-437.
- Lewin, G. R., C. Carlos, M. G.. Chevrette, H. A. Horn, B. R. McDonald, R. J. Stankey, B. G. Fox y C. R. Currie. (2016). Evolution and ecology of actinobacteria and their bioenergy. *Annual Review of Microbiology* 70, 1, 253-254.
- Li, J., J. Dong, J. Yang, M. Luo y S. Zhang. (2014). Detection of polyketide synthase and nonribosomal peptide synthetase biosynthetic genes from antimicrobial coral associated actinomycetes. *Antonie van Leeuwenhoek* 106, 623-635.
- Li, Y. y P. W. Caufield. (1998). Arbitrarily primed polymerase chain reaction fingerprinting for the genotypic identification of mutans streptococci from humans. *Oral Microbiol Immunol* 13, 1, 17-22.
- Liang, H., G. Zhoua, Y. Gea, E. A. D'Ambrosiob, T. M. Eidemc, C. Blanchardc, C. Shehatouc, V. K. Chatarea, P. M. Dunmanc, A. M. Valentinea, V. A. Voelza, C. L. Grimesb y R. B. Andradea. (2018). Elucidating the inhibition of peptidoglycan biosynthesis in *Staphylococcus aureus* by albocycline, a macrolactone isolated from *Streptomyces maizeus*. *Bioorganic and Medicinal Chemistry* 26, 3453-3460.

- Liu, C., J. Juanli Zhang, C. Chunhua Lu y Y. Shen. (2015). Heterologous expression of galbonolide biosynthetic genes in *Streptomyces coelicolor*. *Antonie van Leeuwenhoek* 107, 1359-1366.
- Liu, N., H. Wang, M. Liu, Q. Gu, W. Zheng y Y. Huan. (2009). *Streptomyces alni* sp. nov., a daidzein-producing endophyte isolated from a root of *Alnus nepalensis* D. Don. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 59, 254-258.
- Locatelli, F. M., K. S. Gooa y D. Ulanova. (2013). Effects of trace metal ions on secondary metabolism and morphological development of *Streptomyces*. *Metallomics* 8, 5, 469-480.
- Luo, N., YB. Yang, XQ Yang, CP. Miao, YQ. Li, LH. Xu, ZT. Ding y LX. Zhao. (2018). The streptazolin- and obscurolide-type metabolites from soil-derived *Streptomyces alboniger* YIM20533 and the mechanism of influence of g-butyrolactone on the growth of *Streptomyces* by their non-enzymatic reaction biosynthesis. *RSC Advances* 8, 61, 35042-35049.
- MacFaddin, J.F. (2003). Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica. 3ª edición. Ed. Médica Panamericana. Pp. 308.
- Mahajan, G. B. y L. Balachandran. (2012). Antibacterial agents from actinomycetes - A Review. *Frontiers in Bioscience* 4, 1, 240-253.
- Mahmoud, A. A., E. A. Essawy, M. S. Abdalla y M. S. Abdelfattah. (2019). Production of heliomyacin from actinomycete and evaluation of its antimicrobial activities. *Journal of Bioscience and Applied Research* 5, 4, 429-436.
- Mahmoudabadi, A. Z., M. Zarrin y N. Kiasat. (2014). Biofilm formation and susceptibility to amphotericin B and fluconazole in *Candida albicans*. *Jundishapur Journal of Microbiology* 7, 7, e17105.
- Maheshwari, D., R. Dubey y R. Saravanamurthu. (2010). Industrial exploitation of microorganisms. International Publishing house Pvy. Ltd, New Delhi, India, 436.
- Malla, S., N. P. Niraula, B. Singh, K. Liou. y J. K. Sohng. (2010). Limitations in doxorubicin production from *Streptomyces peucetius*. *Microbiological Research* 165, 427-435.

- Mangamuri, U. K., V. Muvva, S. Poda y D. Agasar. (2014). Optimization of process parameters for improved production of bioactive metabolites by *Streptomyces tritolerans* DAS 165T. *British Microbiology Research Journal* 4, 4, 428-442.
- Manteca, A., M.; Fernandez y J. Sanchez. (2005). A death round affecting a young compartmentalized mycelium precedes aerial mycelium dismantling in confluent surface cultures of *streptomyces antibioticus*. *Microbiology* 151, 3689-3697.
- Manteca, Á., y P.Yagüe. (2018). *Streptomyces* differentiation in liquid cultures as a trigger of secondary metabolism. *Antibiotics* 7, 2, 41.
- Martín, J., G. Crespo, V. González-Menéndez, G. Pérez-Moreno, P. Sánchez-Carrasco, I. Pérez Victoria, L. M. Ruiz-Pérez, D. González-Pacanowska, F. Vicente, O. Genilloud, G. F.Bills y F. Reyes. (2014). MDN-0104, an antiplasmodial betaine lipid from *Heterospora chenopodii*. *Journal of Natural Products* 77, 9, 2118-2123.
- Martinez, A. F. C., L. G. de Almeida, L. A. B. Moraes y F. L. Cônsoli. (2017). Tapping the biotechnological potential of insect microbial symbionts: new insecticidal porphyrins. *BMC Microbiology* 17, 1.
- Maskeya, R.P, R. N. Asolkara, M. Speitlinga, V. Hoffmanna, I. Grün-Wollnyb, W. F. Fleckc y H. Laatsch. (2003). Flavones and new Isoflavone derivatives from microorganisms: Isolation and structure elucidation. *Zeitschrift fur Naturforschung B* 58, 7, 686-691.
- McCraken, R., S. Buol y F. Hole. (1983). Génesis y clasificación de suelos. Trillas. 2da Ed. México. 417 pp.
- Meena, H. B., R. P. Sharma y U. S. Rawat. (2006). Status of macro- and micronutrients in some soils of Tonk District of Rajasthan. *Journal of the Indian Society of Soil Science* 5, 54, 4, 508-512.
- Metsä-Ketelä, M., V. Salo, L. Halo, A. Hautala, J. Hakala, P. Mäntsälä y K. Ylihonko. (1999). An efficient approach for screening minimal PKS genes from *Streptomyces*. *FEMS Microbiology Letters* 180, 1, 1-6.

- Melander, R. J., D. V. Zurawski y C. Melander. (2018). Narrow-spectrum antibacterial agents. *Medicinal Chemistry Communication* 9, 1, 12-21.
- Menard, C., R. Brousseau y C. Mouton. (1992). Application of polymerase chain reaction with arbitrary primer (AP-PCR) to strain identification of *Porphyromonas* (Bacteroides) *gingivalis*. *FEMS Microbiol Lett.* 95, 163-168.
- Meurant, G. (2012). *Actinomycetes in biotechnology*. Edit. Elsevier. Pp. 38.
- Muñoz-López, A. (2015). Aislamiento y modo de acción del *Streptomyces* (*Griseus*) (Doctoral dissertation).
- Moretto, L., R. Heylen, N. Holroyd, S. Vance y R. W. Broadhurst. (2019). Modular type I polyketide synthase acyl carrier protein domains share a common N-terminally extended fold. *Scientific Reports* 9, 1, 1-16.
- Morgan, J., M.I. Meltzer, B. D. Plikaytis, A. N. Sofair, S. Huie-White, S. Wilcox, L. H. Harrison, E. C. Seaberg, R. A. Hajjeh y S. Teutsch. (2005). Excess mortality, hospital stay, and cost due to candidemia: A case-control study using data from population-based candidemia surveillance. *Infection Control and Hospital Epidemiology* 26, 6, 540-547.
- Miyaoka, R., M. Hosokawa, M. Ando, T. Mori, H. O. Hamaguchi y H. Takeyama. (2014). In situ detection of antibiotic amphotericin B produced in *Streptomyces nodosus* using Raman microspectroscopy. *Marine Drugs* 12, 5, 2827-39.
- Naglik, J. R., A. König, B. Hube y S. L. Gaffen. (2017). *Candida albicans*–epithelial interactions and induction of mucosal innate immunity. *Current opinion in microbiology* 40, 104-112.
- Naglik, J. R., J. P. Richardson y D. L. Moyes. (2014). *Candida albicans* pathogenicity and epithelial immunity. *PLoS Pathogens* 10, 8, 1004257.
- Naid, T., T. Kitahara, M. Kaneda y S. Nakamura. (1987). Carbazomycins C, D, E and F, minor components of this carbazomycin complex. *Journal of Antibiotics* 40, 2, 157-164.

- Nakamura, Y., M. Carlson, K. Krapcho, M. Kanamori y R. White. (1988). New approach for isolation of VNTR markers. *The American Journal of Human Genetics* 43, 6, 854-859.
- Naragani, K., R. K. Munaganti y V. Muvva. (2014). Optimization studies for enhanced bioactive metabolite production by *Streptomyces violaceoruber* VLK-4 isolated from the south coast of Andhra Pradesh, India. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research* 5, 11, 4760-4768.
- Naragani, K., R. K. Munaganti, U. K. Mangamuri y V. Muvva. (2014). Optimization of culture conditions for enhanced antimicrobial activity of *Rhodococcus erythropolis* VLK-12 Isolated from south coast of Andhra Pradesh, India. *British Microbiology Research Journal* 4, 1, 63-79.
- Ng, Z. Y., y G. Y. A. Tan. (2018). Selective isolation and characterisation of novel members of the family *Nocardiopsaceae* and other actinobacteria from a marine sediment of Tioman Island. *Antonie van Leeuwenhoek* 111, 5, 727-742.
- Ngo, H. X., S. Garneau-Tsodikova y K. D. Green. (2016). A complex game of hide and seek: The search for new antifungals. *Medicinal Chemistry Communication* 7, 7, 1285-1306.
- Nguyen, T. H. P., T. Säll, T. Bryngelsson y E. Liljeroth. (2009). Variation among *Colletotrichum gloeosporioides* isolates from infected coffee berries at different locations in Vietnam. *Plant Pathology* 58, 898-909.
- Nguyen, T. M. y J. Kim. (2015). Antifungal and antibacterial activities of *Streptomyces polymachus* sp. nov. isolated from soil. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 65, 8, 2385-2390.
- Nikolouli K., y D. Mossialos. (2012). Bioactive compounds synthesized by non-ribosomal peptide synthetases and type-I polyketide synthases discovered through genome-mining and metagenomics. *Biotechnology Letters* 34, 8, 1393-1403.
- Nimaichand, Salam. (2014). Studies of actinomycete diversity in Hundung Limestone sites in Manipur and their antimicrobial activities. Tesis de doctorado. Department of Biochemistry School of Life Sciences Manipur University, Canchipur, India.

- Nimaichand, S., A. M. Devi, K. Tamreihao, D. S. Ningthoujam y W. J. Li. (2015). Actinobacterial diversity in limestone deposit sites in Hundung, Manipur (India) and their antimicrobial activities. *Frontiers in Microbiology* 6, 413.
- Nimaichand, S., W. Zhu, L. Yang, H. Ming, G. Nie, S. Tang, D. Ningthoujam y W. Li. (2012). *Streptomyces manipurensis* sp. nov., a novel actinomycete isolated from a limestone deposit site in Manipur, India. *Antonie van Leeuwenhoek* 102, 133-139
- Núñez, L. E., C. Méndez, A. F. Braña, G. Blanco, y J. A. Salas. (2003). The biosynthetic gene cluster for the  $\beta$ -lactam carbapenem thienamycin in *Streptomyces cattleya*. *Chemistry and biology* 10, 4, 301-311.
- Ohno, S., Y. Katsuyama, Y. Tajima, M. Izumikawa, M. Takagi, M. Fujie, N. Satoh, K. Shin-ya y Y. Ohnishi. (2015). Identification and characterization of the Streptazone E biosynthetic gene cluster in *Streptomyces* sp. MSC090213JE08. *ChemBioChem* 16, 16, 2385-2391.
- Olano, C., I. A. García, González, M. Rodríguez, D. Rozas, J. Rubio y J. A. Salas. (2014). Activation and identification of five clusters for secondary metabolites in *Streptomyces albus* J1074. *Microbial biotechnology* 7, 3, 242-256.
- Olano, C., C. Méndez, y J. Salas. (2010). Post-PKS tailoring steps in natural product-producing actinomycetes from the perspective of combinatorial biosynthesis. *Natural Product Reports* 27, 4, 571-616.
- Oliylyk, M., M. Samborsky, J. B. Lester, T. Mironenko, N. Scott, S. Dickens y P. F. Leadlay. (2007). Complete genome sequence of the erythromycin-producing bacterium *Saccharopolyspora erythraea* NRRL23338. *Nature biotechnology*, 25, 4, 447-453.
- Ondrejčková, P., M. Šturdíková, A. Hushegyi, E. Švajdlenka, K. Markošová y M. Čertík. (2016). Endophytic *Streptomyces* sp. AC35, a producer of bioactive isoflavone aglycones and antimycins. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 43, 9, 1333-1344.



- Otoguro, K., M. Iwatsuki, A. Ishiyama, M. Namatame, A. Nishihara-Tukashima, S. Shibahara, S. Kondo, H. Yamada y S. Omura. (2010). Promising lead compounds for novel antiprotozoals. *The Journal of Antibiotics* 63, 381-384
- Páez, H., L. P. Vargas, M. P. Sarmiento y A. Flórez. (2014). Rare adverse reactions to antibiotics: vancomycin induced agranulocytosis. *Acta Médica colombiana* 39, 3, 279-282.
- Palomo, S., I. González, M. De la cruz, J. Martín, J. Tormo, M. Anderson, R. Hill, F. Vicente, F. Reyes y O. Genilloud. (2013). Sponge-Derived *Kocuria* and *Micrococcus* spp. as sources of the new thiazoly peptide antibiotic Kocurin. *Marine Drugs* 11, 1071-1086.
- Pan, R., X. J. Chen, H. Zhang y H. Wang. (2019). Exploring structural diversity of bai, microbe secondary metabolites using OSMAC strategy: A literature review. *Frontiers in Microbiology* 10.
- Pappas, P. G., C. A. Kauffman, D. R. Andes, C. J. Clancy, K. A. Marr, L. Ostrosky-Zeichner, A. C. Reboli, M. G. Schuster, J. A. Vazquez, T. J. Walsh, T. E. Zaoutis y J. D. Sobel. (2016). Clinical practice guideline for the management of candidiasis: Update by the infectious diseases Society of America. *Clinical Infectious Diseases* 62, 4, e933.
- Parajuli, B., S. J. Shin, S. H. Kwon, S. D. Cha, R. Chung, W. J. Park y C. H. Cho. (2013). Salinomycin induces apoptosis via death receptor-5 up-regulation in cisplatin-resistant ovarian cancer cells. *Anticancer research* 33, 4, 1457-1462.
- Passari, A. K., V. K. Mishra, R. Saikia, V. K. Gupta y V. P. Singh. (2015). Isolation, abundance and phylogenetic affiliation of endophytic actinomycetes associated with medicinal plants and screening for their *in vitro* antimicrobial biosynthetic potential. *Frontiers in Microbiology* 6, 273.
- Pei, L., Z. Xin, Q. Qingmin, Q. Wenting, L. Mingqian, O. Kunxi, L. Juncheng, D. Xiaomei, Z. Junjie, L. Boyong, P. Ruiqi y C. Xiaoyang. (2015). Genetic diversity and population structure of *Toona Ciliata* Roem. Based on sequence-related amplified polymorphism (SRAP) markers. *Forests* 6, 1094-1106.

- Pemán, J. y G. Quindós. (2016). Aspectos actuales de las enfermedades invasoras causadas por *Candida* y otros hongos levaduriformes. *Revista Iberoamericana de Micología* 33, 3, 133-139.
- Pérez-Brito, D., A. Cortes-Velázquez, T. Valencia-Yah, A. Magaña-Álvarez, C. Navarro, B. Moreno y R. Tapia-Tussell. (2018). Genetic variation of *Colletotrichum magnum* isolated from *Carica papaya* as revealed by DNA fingerprinting. *Journal of Microbiology* 56, 11, 813-821.
- Pérez-Brito, D., R. Tapia-Tussell, A. Quijano-Ramayo, A. Larqué-Saavedra, P. Lappe. (2007). Molecular characterization of *Kluyveromyces marxianus* strains isolated from *Agave fourcroydes* (Lem.) in Yucatan, Mexico. *Molecular Biotechnology* 3, 181-186.
- Pérez-Victoria, I., J. Martín y F. Reyes. (2016). Combined LC/UV/MS and NMR strategies for the dereplication of marine natural products. *Planta Médica* 82, 9, 857-871.
- Peteira, B., M. G. Rodríguez, C. Rosales, A. Maselli, R. Casado, L. Castro, E. Salazar, R. Enrique y I. Miranda. (2014). Variabilidad molecular de aislamientos venezolanos de nematodos entomopatógenos y sus bacterias simbiotes. *Revista de Protección Vegetal* 29, 2, 112-121.
- Pithakkit, S., V. Petcharat, S. Chuenchit, C. Pornsuriya y A. Sunpapao. (2015). Isolation of antagonistic actinomycetes species from rhizosphere as effective biocontrol against oil palm fungal diseases. *Walailak Journal Science and Technology* 12, 481-490.
- Poomthongdee, N., K. Duangmal y W. Pathom-aree. (2014). Acidophilic actinomycetes from rhizosphere soil: diversity and properties beneficial to plants. *The Journal of Antibiotics* 68,2, 106-114.
- Prasad, T., S. Sethumadhavan y Z. Fatima (2011). Altered ergosterol biosynthetic pathway—an alternate multidrug resistance mechanism independent of drug efflux pump in human pathogenic fungi *C. albicans*. In *Science against Microbial Pathogens: Communicating Current Research and Technological Advances Microbiology Series*; Mendez-Vilas, A., Ed.; Formatex Research Center: Badajoz, Spain 757-768.

- Quadri, S., R., X-P Tian, J. Zhang, J. A. Ruwaili, W. N. Hozzein, D. Agsar, W-J. Li y S. G. Dastager. (2016). *Actinorectispora indica* gen. nov., sp. nov. isolated from soil, a member of the family *Pseudonocardiaceae*. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 66, 939-945.
- Rao, M., L. Feng, L. Ruan, M. Ge y X. Sheng. (2013). UPLC-MS-BASED metabolomic study of *Streptomyces* strain hccb10043 under different ph conditions reveals important pathways affecting the biosynthesis of A21978C compounds. Analytical Letters 46, 2305-2318.
- Rasouli-Nasab, M., M. Fatahi-Bafghi, S. Habibnia, P. Heidarieh y S. S. Eshraghi. (2017). Comparison of various methods for isolation of *Nocardia* from soil. Zahedan Journal of Research in Medical Sciences 19, 2, e6107.
- Rebets, Y., E. Brötz, B. Tokovenko y A. Luzhetskyy. (2014). Actinomycetes biosynthetic potential: How to bridge in silico and *in vivo*? Journal of Industrial Microbiology 41, 2, 387-402.
- Richard, H. (2008). Renaissance in antibacterial discovery from actinomycetes. Current Opinion in Pharmacology 8, 557-563.
- Risdian, C., C., T. Mozef y J. Wink. (2019). Biosynthesis of polyketides in *Streptomyces*. Microorganisms 7, 124.
- Romano, S., S. A. Jackson, S. Patry y A. D. W. Dobson. (2018). Extending the “one strain many compounds” (OSMAC) principle to marine microorganisms. Marine Drugs 16, 244.
- Romero-Rodríguez, A, B. Ruiz-Villafán, V Tierrafría, R. Rodríguez-Sanoja y S. Sánchez. (2016b). Carbon catabolite regulation of secondary metabolite formation and morphological differentiation in *Streptomyces coelicolor*. Applied Biochemistry and Biotechnology 180, 6, 1152-1166.
- Rosselló-Mora, R. y R. Amann. (2001). The species concept for prokaryotes. FEMS Microbiology Reviews 25, 39-67.
- Ruiz, B., A. Chávez, A. Forero, Y. García-Huante, A. Romero, M. Sánchez, D. Rocha, B.

- Sánchez, R. Rodríguez-Sanoja, S. Sánchez y E. Langley. (2010). Production of microbial secondary metabolites: Regulation by the carbon source. *Critical Reviews in Microbiology* 36, 2, 146-167.
- Sabutskii, Y. E., V. A. Denisenko, P. S. Dmitrenok y S. G. Polonik. (2016). Development of approaches to fibrostatin F, N-acetyl-L-cysteinyl-containing 1,4-naphthoquinone metabolite of *Streptomyces catenulae*. *Russian Chemical Bulletin* 65, 3, 774-778.
- Sadeghi, A., B. M. Soltania G. S. Jouzani, E. Karimi, M. K. Nekouei y M. Sadeghizadeh. (2015). Taxonomic study of a salt tolerant *Streptomyces* sp. strain C-2012 and the effect of salt and ectoine on Ion expression level. *Microbiological Research* 169, 232-238.
- Saini, P., M. Gangwar, A. Kalia, N. Singh y D. Narang. (2016). Isolation of endophytic actinomycetes from *Syzygium cumini* and their antimicrobial activity against human pathogens. *Journal of Applied and Natural Science* 8, 1, 416-422.
- Sakano, K., K. Ishimaru y S. Nakamura. (1980). New antibiotics, carbazomycins A and B. I. Fermentation, extraction, purification and physico-chemical and biological properties. *The Journal Antibiotics* 33, 683-689.
- Saker, R., A. Meklat, N. Bouras, A. Zitouni, F. Mathieu, C. Spröer, H. Klenk y N. Sabaou (2015). Diversity and antagonistic properties of culturable halophilic actinobacteria in soils of two arid regions of septentrional Sahara: M'zab and Zibans. *Annals of Microbiology* 65, 2241-2253.
- Salam, N., T. Khieu, M. Liu, T. Vu, S. Chu-Ky, N. Quach, Q. Phi, M. Rao, A. Fontana y S. Sarter. (2017). Endophytic actinobacteria associated with *Dracaena cochinchinensis* Lour. Isolation, diversity, and their cytotoxic activities. *BioMed Research International* 10, 1-11.
- Sánchez, M. B., P. Barrado, A. Jiménez, y M. F. Lobato. (2006). The pur3 gene from the pur cluster encodes a monophosphatase essential for puromycin biosynthesis in *Streptomyces*. *FEBS Letters* 580, 7, 1807-1811.
- Sánchez, S., A. Chávez, A. Forero, Y. García-Huante, A. Romero, M. Sánchez, D. Rocha, B. Sánchez, M. Ávalos, S. Guzmán-Trampe, R. Rodríguez-Sanoja, L. Langley y B.

- Ruiz. (2010). Carbon source regulation of antibiotic production. *The Journal of Antibiotics* 63, 8, 442-459.
- Sánchez-Vargas, O., P. Pérez-Ríos, J. Romo-García, F. P. Corona-Izquierdo, H. Hidalgo-Loperena y F. FrancoMartínez. (2002). Determinación de pH salival y cultivo en pacientes con candidosis bucal VIH positivos y VIH negativos. *Revista Iberoamericana de Micología* 19, 155-160.
- Sardi, J. C. O., L. Scorzoni, T. Bernardi, A. M. Fusco-Almeida y M. J. S. Mendes Giannini. (2013). *Candida* species: Current epidemiology, pathogenicity, biofilm formation, natural antifungal products and new therapeutic options. *Journal of Medical Microbiology* 62, 10-24.
- Scorzoni, L., De Paula e Silva A.C.A., C. M. Marcos, P. A. Assato, W. C. M. A. De Melo, H. C. De Oliveira, C. B. Costa-Orlandi, M. J. S. Mendes-Giannini y A. M. Fusco-Almeida. (2017). Antifungal therapy: New advances in the understanding and treatment of mycosis. *Frontiers in Microbiology* 8, 36.
- Selvin, J., S. Shanmughapriya, R. Gandhimathi, G. Seghal Kiran, T. Rajeetha Ravji, K. Natarajaseenivasan y T. A. Hema. (2009). Optimization and production of novel antimicrobial agents from sponge associated marine actinomycetes *Nocardioopsis dassonvillei* MAD08. *Applied Microbiology and Biotechnology* 83, 3, 435-445.
- Shao, ZH, S. X. Ren, X. Q. Liu, J. Xu, H. Yan, G. P. Zhao y J. Wang. (2015). A preliminary study of the mechanism of nitrate-stimulated remarkable increase of rifamycin production in *Amycolatopsis mediterranei* U32 by RNA-seq. *Microbial Cell Factories* 14, 75.
- Sharma, M. (2014). Actinomycetes: Source, identification, and their applications. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences* 3, 2, 801-832.
- Shi, S., Y. Ma, Y. Zhang, L. Liu, Q. Liu, M. Peng y X. Xiong. (2012). Systematic separation and purification of 18 antioxidants from *Pueraria lobata* flower using HSCCC target-guided by DPPH-HPLC experiment. *Separation and Purification Technology* 89, 225-233.

- Shelest, E., N. Heimerl, M. Fichtner y S. Sasso. (2015). Multimodular type I polyketide synthases in algae evolve by module duplications and displacement of AT domains in trans. *BMC Genomics* 16, 1-15.
- Shukla, G. y A. Varma. (2011). *Soil enzymologi*. Editorial Springer Science y Business Media. Pp. 45.
- Solecka, J., J. Zajko, M., Postek y A. Rajnisz. (2012). Biologically active secondary metabolites from actinomycetes. *Central European Journal of Biology* 7, 3, 373-390.
- Stately, E. S., M. A. Fischbach, T. Christopher y C. T. Walsh (2008). Total biosynthesis: *In vitro* reconstitution of polyketide and nonribosomal peptide pathways. *Natural Product Reports* 25, 4, 757-793.
- Singh, V, S. Haque, H. Singh, J. Verma, K. Vibha, R. Singh, A. Jawed y C. K. M. Tripathi. (2016). Isolation, screening, and identification of novel isolates of actinomycetes from India for antimicrobial applications. *Frontiers in Microbiology* 7, 1921.
- Smaoui, S., F. Mathieu, L. Elleuch, Y. Coppel, G. Merlina, I. Karray-Rebai y L. Mellouli. (2012). Taxonomy, purification and chemical characterization of four bioactive compounds from new *Streptomyces* sp. TN256 strain. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 28, 793-804.
- Sree, S. J., P.A.M. Helen, I.H.B.J. Edith y R.J.S. Jose. (2014). RAPD analysis of microbial population from coir retting area, Colachel, Kanyakumari District, India. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences* 3, 11, 46-53.
- Stepankova, V., S. Bidmanova, T. Koudelakova, Z. Prokop, R. Chaloupkova, R. y J. Damborsky. (2013). Strategies for stabilization of enzymes in organic solvents. *ACS Catalysis* 3, 2823-2836.
- Taechowisan, T., S. Chanaphat, W. Ruensamran y W. S. Phutdhawong. (2014). Antibacterial activity of new flavonoids from *Streptomyces* sp. BT01; an endophyte in *Boesenbergia rotunda* (L.) Mansf. *Journal of Applied Pharmaceutical Science* 4, 4, 008-013.

- Thakur, N.L. y A. C. Anil. (2000). Antibacterial activity of the sponge *Ircinia ramosa*. Importance of its surface-associated bacteria. *Journal of Chemical Ecology* 26, 1, 57-71.
- Tamreihao, K., S. Nimaichand, S. Babeeta Chanu, K. Aruna Devi, R. Lynda R, N. Jeeniita y D. S. Ningthoujam. (2016). Acidotolerant *Streptomyces* sp. MBRL 10 from limestone quarry site showing antagonism against fungal pathogens and growth promotion in rice plants. *Journal of King Saud University - Science* 30, 2, 143-152.
- Tamura, K., D. Peterson, N. Peterson, G. Stecher, M. Nei y S. Kumar. (2011). MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular Biology and Evolution* 28, 10, 2731-2739.
- Tapia-Tussell, R., P. Lappe, M. Ulloa, A. Quijano-Ramayo, M. Cáceres-Farfán y A. Larque-Saavedra. (2006). A rapid and simple method for DNA extraction from yeast and fungi isolated from *Agave fourcroydes*. *Molecular Biotechnology* 33, 67-70.
- Tiwari, K., y R. K. Gupta. (2011). Rare actinomycetes: a potential storehouse for novel antibiotics. *Critical Reviews in Biotechnology* 32, 2, 108-132.
- Traxler, M. F., y R. Kolter. (2015). Natural products in soil microbe interactions and evolution. *Natural Product Reports* 32, 7, 956-970.
- Tyc, O., C. Song, J. S. Dickschat, M. Vos y P Garbeva. (2017). The ecological role of volatile and soluble secondary metabolites produced by soil bacteria. *Trends in Microbiology* 25, 4, 280-292.
- Undabarrena, A., F. Beltrametti, F. P. Claverías, M. González, E. R. Moore y M. Seeger. (2016). Exploring the diversity and antimicrobial potential of marine actinobacteria from the Comau Fjord in northern Patagonia, Chile. *Frontiers in Microbiology* 7, 1135.
- Unjan, R., A. Nissapa y R. Chiarawipa. (2017). Climatic considerations which support the choice between natural rubber and oil palm in Nakhon Si Thammarat, southern Thailand. *Kasetsart Journal of Social Sciences* 38, 3, 273-281.

- Urbina-Cardona, N. y O. Flores-Villela. (2010). Ecological-niche modeling and prioritization of conservation-area networks for Mexican herpeto fauna. *Conservation Biology* 4, 1031-1041.
- Vaden, R. M., N. W. Oswald, M. B. Potts, J. B. MacMillan y M. A. White. (2017). FUSION-guided hypothesis development leads to the Identification of N6,N6-dimethyladenosine, a marine-derived AKT pathway Inhibitor. *Marine Drugs*, 15, 75
- Van der Meij, A., S. F. Worsley, M. I. Hutchings y G. P. Van Wezel. (2017). Chemical ecology of antibiotic production by actinomycetes. *FEMS Microbiology Reviews*. 41, 3, 392-416.
- Van Wezel, G.P. y K.J. McDowall. (2011). The regulation of the secondary metabolism of *Streptomyces*: New links and experimental advances. *Natural Product Reports* 28, 7, 1311-1333.
- Vance, S., O. Tkachenko,, B. Thomas, M. Bassuni, H. Hong, D. Nietlispach y W. Broadhurst. (2016). Sticky swinging arm dynamics: Studies of an acyl carrier protein domain from the mycolactone polyketide synthase. *Biochemical Journal* 473, 8, 1097-1110.
- Vastrad, B. M. y S. E. Neelagund. (2011). Production and optimization of tetracycline by various strains of *Streptomyces* under solid state fermentation using pineapple peel as a novel substrate. *Recent Research in Science and Technology* 3, 1-8.
- Vigliotta, G., S. M. Tredici, F. Damiano, M. R. Montinaro, R. Pulimeno, R. Summa, D. R. Massardo y G. V. Alifano. (2005). Natural merodiploidy involving duplicated *rpoB* alleles affects secondary metabolism in a producer actinomycete *Molecular Microbiology*. 55, 2, 396-412.
- Vijayakumar, R., K. Panneerselvam, C. Muthukumar, N. Thajuddin, A. Panneerselvam y R. Saravanamuthu. (2012). Optimization of antimicrobial production by a marine actinomycete *Streptomyces afghaniensis* VPTS3-1 isolated from Palk Strait, east coast of India. *Indian Journal of Microbiology* 52, 2, 230-239.
- Vickery, M. C., A. L. Smith, A. DePaola, D. D. R. J. Jones, Steffan y A. K. Bej. (1998). Optimization of the arbitrarily-primed polymerase chain reaction (AP-PCR) for intra-



- species differentiation of *Vibrio vulnificus*. *Journal of Microbiological Methods* 33, 2, 181-189.
- Vil, V., T. A. Glorizova, V. V. Poroikov, A. O. Terent'ev, N. Savidov y V. M. Dembitsky (2019). Naturally occurring of  $\alpha,\beta$ -diepoxy-containing compounds: Origin, structures, and biological activities. *Applied Microbiology and Biotechnology* 103, 8, 3249-3264.
- Waksman, S., A. Schatz y D. Reynolds. (2010). Production of antibiotic substances by actinomycetes. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1213, 1, 112-124.
- Whaley, S. G., E. L Berkow, J. M Rybak, A. T Nishimoto, K. S Barker y P. D Rogers. (2017). Azole antifungal resistance in *Candida albicans* and emerging non-albicans *Candida* species. *Frontiers in Microbiology* 7, 10, 2173.
- Walsh, C. T., y M. A. Fischbach. (2010). Natural products version 2.0: Connecting genes to molecules. *Journal of the American Chemical Society* 132, 8, 2469-2493.
- Weij, Z. H., L. Bai, Z. Deng y J. J. Zhong. (2012). Impact of nitrogen concentration on validamycin A production and related gene transcription in fermentation of *Streptomyces hygroscopicus* 5008. *Bioprocess and Biosystems Engineering* 35, 7, 1201-1208.
- Wezela, G. P. y K. J. McDowall (2011). The regulation of the secondary metabolism of *Streptomyces*: New links and experimental advances. *Natural Product Reports* 28, 7, 1311-1333.
- Whaley, S. G., E. L. Berkow, J. M Rybak, A. T. Nishimoto, K. S. Barker y P. D. Rogers. (2017). Azole antifungal resistance in *Candida albicans* and emerging non *albicans* *Candida* Species. *Frontiers in Microbiology* 7, 2173.
- Wohlleben, W., A. Bera, Y. Mast y E. Stegmann (2017). Regulation of secondary metabolites of actinobacteria. *Biology and Biotechnology of Actinobacteria* 181-232.

- Xia, M., D. Huang, S. Li, J. Wen, X. Jia y Y. Chen. (2013). Enhanced FK506 production in *Streptomyces tsukubaensis* by rational feeding strategies based on comparative metabolic profiling analysis. *Biotechnology and Bioengineering* 110, 10, 2717-2730.
- Yague, P., A. Rodriguez-Garcia, M.T. Lopez-Garcia, J. F. Martin, B. Rioseras, J. Sanchez y A. Manteca. (2013). Transcriptomic analysis of *Streptomyces coelicolor* differentiation in solid sporulating cultures: First compartmentalized and second multinucleated mycelia have different and distinctive transcriptomes. *PLoS ONE* 8, e60665.
- Yague, P., J. Willemsse, R. I. Koning, B. Rioseras, M. T. Lopez-Garcia, N. Gonzalez-Quinonez, C. Lopez-Iglesias, P.V. Shliha, A. Rogowska-Wrzesinska y A.J. Koster (2016). Subcompartmentalization by cross-membranes during early growth of *Streptomyces hyphae*. *Nature Communications* 7, 12467
- Yang, D., M. E. Rateb, N. Wang y B. Shen. (2017). Competition and co-regulation of spirotoamide and tautomycin biosynthesis in *Streptomyces griseochromogenes*, and isolation and structural elucidation of spirotoamide C and D. *The Journal of Antibiotics* 70, 5, 710-714.
- Yang, CL., YS. Yi-Shuang Wang, CL. Liu, YJ. Zeng, P. Cheng, RH. Jiao, SX Bao, HQ. Huang, RX Tan y HM. Ge. (2017). Strepchazolins A and B: Two new alkaloids from a marine *Streptomyces chartreusis* NA02069. *Marine Drugs* 15, 244.
- Yang, X., Y. Peng, Y. Yanga, W. Lia, J. Xiong, L. Zhaob y Z. Dinga. (2014). Antimicrobial and antioxidant activities of a new benzamide from endophytic *Streptomyces* sp. YIM 67086. *Natural Product Research* 29, 4, 331-335.
- Yarza, P., P. Yilmaz, E. Pruesse, F. O. Glockner, W. Ludwig, K.H. Schleifer, W.B. Whitman, J. Euzéby, R. Amann y R. Rossello-Mora. (2014). Uniting the classification of cultured and uncultured bacteria and archaea using 16S rRNA gene sequences. *Nat. Rev. Microbiol.* 12, 635-645.
- Yu, G., L. Li, X. Liu, G. Liu, Z. Deng, M.T. Zabriskie, M., Jiang y X. He. (2015). The standalone aminopeptidase PepN catalyzes the maturation of blasticidin S from leucylblasticidin S. *Scientific Reports* 5, 17641.

- Yuan, M., Y. Yu, H. R. Li, N. Dong, y X. H. Zhang. (2014). Phylogenetic diversity and biological activity of actinobacteria isolated from the chukchi shelf marine sediments in the Arctic ocean. *Marine Drugs* 12, 1281-1297.
- Zakalyukina, Y.V., G.M. Zenova y D.G. Zvyagintsev. (2002). Acidophilic Soil Actinomycetes. *Microbiology* 71, 342-345
- Zapata-González, F. y N. Cardona-Castro. (2012). Lo que debemos saber sobre los métodos de sensibilidad a los antifúngicos. *Revista CES Medicina* 26, 1, 71-83.
- Zarins-Tutt, J. S., T. T. Barberi, H. Gao, A. Mearns-Spragg, L. Zhang, D. J. Newman, y R. J. M. Goss. (2016). Prospecting for new bacterial metabolites: A glossary of approaches for inducing, activating and upregulating the biosynthesis of bacterial cryptic or silent natural products. *Natural Product Reports* 33, 1, 54-72.
- Zenova, G. M., N. A. Manucharova y D. G. Zvyagintsev. (2011). Extremophilic and extremotolerant actinomycetes in different soil types. *Eurasian Soil Science* 44, 4, 457-478.
- Zhang, Z., F. de Barsey, M. Liem, A. Liakopoulos, G. P. van Wezel, Y.H. Choi, D. Claessen, D. E. Rozen. (2020). Antibiotic production is organized by a division of labour in *Streptomyces*. *Science Advances* 6, 3.
- Zhang, Z., H.X. Pan, y G.L. Tang. (2017). New insights into bacterial type II polyketide biosynthesis [version 1; referees: 2 approved]. *F1000 Research* 6, 172.
- Zhao, W., Y. Zhong, , H. Yuan, J. Wang, H. Zheng, Y. Wang y G. Lu. (2010). Complete genome sequence of the rifamycin SV-producing *Amycolatopsis mediterranei* U32 revealed its genetic characteristics in phylogeny and metabolism. *Cell research* 20, 10, 1096-1108.
- Zhi, X-Y., W-J. Li y E. Stackebrandt. (2009). An update of the structure and 16S rRNA gene sequence-based definition of higher ranks of the class Actinobacteria, with the proposal of two new suborders and four new families and emended descriptions of the existing higher taxa. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 59, 3, 589-608.

- Zhu, W., Q. T. Phan, P. Boontheung, N. V. Solis, J. A Loo y S. G. Filler. (2012). EGFR and HER2 receptor kinase signaling mediate epithelial cell invasion by *Candida albicans* during oropharyngeal infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 109, 35, 14194-14199.
- Zhu, H., S.K. Sandiford y GP. Van Wezel. (2014). Triggers and cues that activate antibiotic production by actinomycetes. *Journal of Industrial Microbiology* 41, 2, 371-386.
- Zhou. T.C., B. G. Kim y J. J. Zhong. (2014). Enhanced production of validamycin A in *Streptomyces hygroscopicus* 5008 by engineering validamycin biosynthetic gene cluster. *Applied Microbiology and Biotechnology* 98, 18, 7911-7922.

## ANEXOS

## 1. Actividad antifúngica de los medios de cultivo sin inocular (blancos).

Medios	Actividad
AI	–
GI	–
PC	–
HS	–
AIPC	–
AIHS	–
GIPC	–
GIHS	–
ISP2	–

No activo –

## 2. Rendimiento de los sobrenadantes liofilizados

Medios	Rendimiento de los SN liofilizados % (p/v)		
	S.04	S.05	S.09
AI	0.4	0.4	0.6
GI	0.3	0.4	0.4
PC	0.1	0.7	1.0
HS	0.7	0.65	1.0
AIPC	0.3	0.4	0.5
AIHS	0.3	1.0	0.4
GIPC	0.3	0.7	1.0
GIHS	0.1	0.5	0.4
ISP2	0.7	0.7	1.0

S.04: *S. parvisporogenes* S2A-04. S.05: *S. manipurensis* S3A-05. S.09: *S. manipurensis* S3A-09

**3. Actividad y rendimiento de residuos sólidos del cultivo de cepas de *Streptomyces* sp. en los diferentes medios medios de inducción y el medio de referencia (ISP2).**

Medio	Sólidos Residuales			Rendimiento del Extracto		
	CMI mg/mL			% (p/v)		
	S.04	S.05	S.09	S.04	S.05	S.09
AI	>1.0	>1.0	>1.0	0.07	0.03	0.17
GI	>1.0	>1.0	>1.0	0.07	0.18	0.24
PC	>1.0	>1.0	>1.0	0.05	0.2	0.15
HS	>1.0	>1.0	>1.0	0.1	0.18	0.22
AIPC	>1.0	>1.0	>1.0	0.09	0.14	0.12
HS	>1.0	>1.0	>1.0	0.08	0.27	0.06
GIPC	>1.0	>1.0	>1.0	0.13	0.62	0.77
GIHS	>1.0	>1.0	>1.0	0.26	0.26	0.17
ISP2	>1.0	>1.0	>1.0	0.13	0.03	0.12

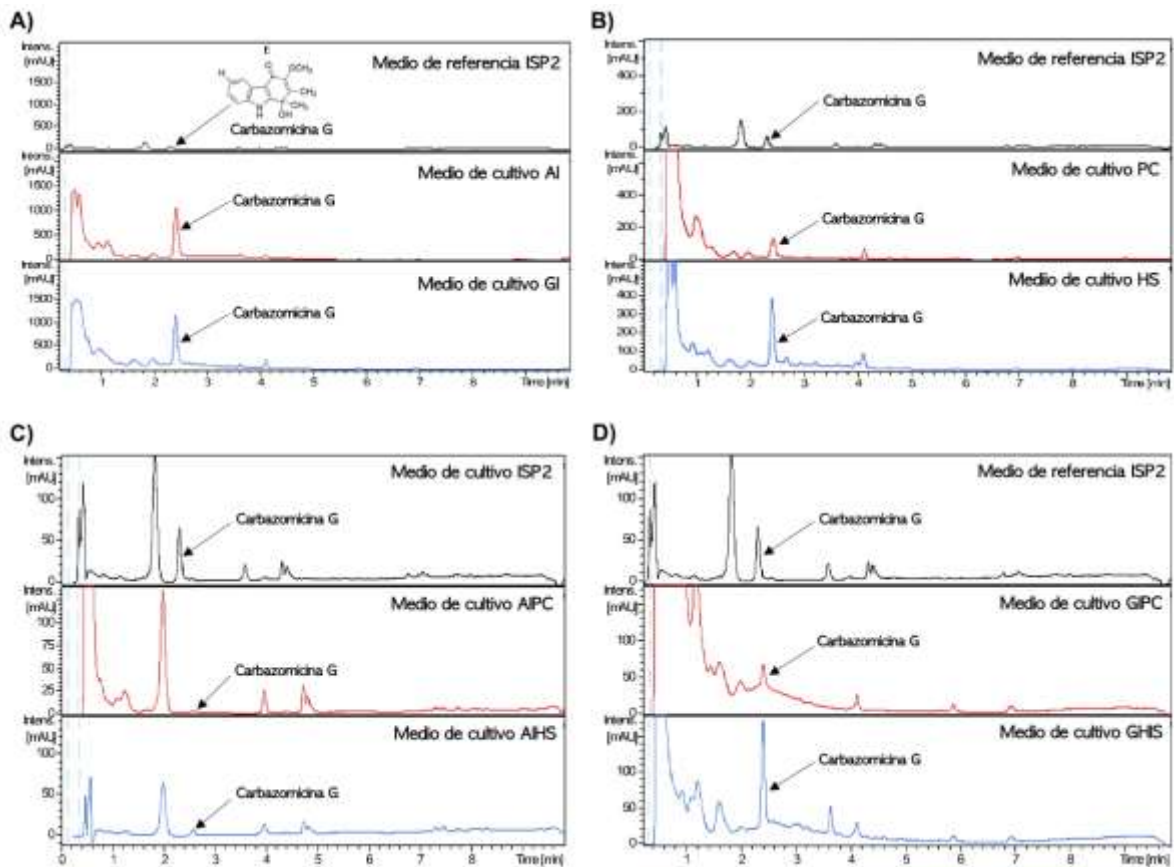
S.04: *S. parvisporogenes* S2A-04. S.05: *S. manipurensis* S3A-05. S.09: *S. manipurensis* S3A-09

**4. Rendimiento de los extractos etanólicos de *Streptomyces* sp. cultivado en los diferentes medios de inducción y en el medio basal (ISP2).**

Medio de cultivo	Rendimiento de extractos		
	% (p/v)		
	S.04	S.05	S.09
AI	0.07	0.03	0.17
GI	0.07	0.18	0.24
PC	0.05	0.2	0.15
HS	0.1	0.18	0.22
AIPC	0.09	0.14	0.12
HS	0.08	0.27	0.06
GIPC	0.13	0.62	0.77
GIHS	0.26	0.26	0.17
ISP2	0.13	0.03	0.12

S.04: *S. parvisporogenes* S2A-04. S.05: *S. manipurensis* S3A-05. S.09: *S. manipurensis* S3A-09

5 Cromatograma del espectro de ultravioleta (210 nm) de los extractos etanólicos de *S. parvisporogenes* (S2A-04) en los diferentes medios de inducción vs. el extracto del cultivo en el medio basa (ISP2) y la presencia de carbazomicina G (pico a 2.30 min).



(A) medios AI y GI media vs. medio de cultivo basal. (B) Medios PC y HS vs. medio de cultivo basalba. (C) Mediso AIPC y AIHS vs. medio basal. (D) Medios de cultivo GIPC and GIHS vs. medio basal.

6. Abundancia de Carbazomicina G en los extractos etanólicos de los sobrenadantes de los cultivos de *S. parvisporogenes* (S2A-04) en diferentes medios de inducción y en el medio basal. Área del pico de carbazomycin G en espectro de ultravioleta UV 210 nm (pico a 2.30 min RT).

<b>Medio de cultivo</b>	<b>Abundancia de Carabazomycin G Area del pico</b>
Basal (ISP2)	297
AI	5479
GI	4880
PC	639
HS	1528
AIPC	17
AIHF	31
GIPC	112
GIHS	628