







TRABAJO DE DIPLOMA

Título: ``Aislamiento, caracterización y minería genómica de una cepa de Streptomyces'

Autor: Ricardo Medina García

Tutores: Dr C. Ricardo Polinars Medina Marrero Dra C. Milagro García Bernal

> Santa Clara Copyright©UCLV





UCLV

Universidad Central

"Marta Abreu" de Las Villas





DIPLOMA THESIS

<u>**Title:</u>** ``Isolation, characterization and genome mining of a *Streptomyces* strain''</u>

<u>Author</u>: Ricardo Medina García <u>Thesis Directors</u>: Dr C. Ricardo Polinars Medina Marrero

Dra C. Milagro García Bernal



Santa Clara Copyright©UCLV



Este documento es Propiedad Patrimonial de la Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas, y se encuentra depositado en los fondos de la Biblioteca Universitaria "Chiqui Gómez Lubian" subordinada a la Dirección de Información Científico Técnica de la mencionada casa de altos estudios.

Se autoriza su utilización bajo la licencia siguiente:

Atribución- No Comercial- Compartir Igual



Para cualquier información contacte con:

Dirección de Información Científico Técnica. Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas. Carretera a Camajuaní. Km 5½. Santa Clara. Villa Clara. Cuba. CP. 54 830

Teléfonos.: +53 01 42281503-1419

Exergo

All things are meaningless accidents, works of chance unless your marveling gaze, as it probes, connects and orders, makes them divine...

Dedicatoria

A mis padres

Agradecimientos

Mi mayor agradecimiento va dirigido a mis padres por apoyarme, guiarme y permitirme seguir sus pasos en este difícil pero divertido quehacer llamado: ciencia. Los quiero mucho.

A mis abuelos, quienes siempre pusieron ímpetu en sus labores para así esparcir amor y paciencia.

A toda mi familia por acompañarme y apoyarme. A mi hermana, primos y tíos: gracias.

A Marle por enseñarme con su "mataburro" durante mis primeros pasos en el laboratorio de microbiología y haberse convertido en una amiga especial de la familia.

A Rolo, el profesor y amigo que cultivó mi amor por la química, la ciencia y el saber. Mi mayor gratitud va dirigida a usted. A nuestra amistad, porque después de 10 años todavía sigue inspirando y enseñando química. Todavía conservo hermosos recuerdos de las noches frente a una pizarra, el Wade junto a Keren y Ale con música de La oreja de Van Gogh de fondo.

A todos los profesores del Departamento de Farmacia por saber mantener en alto la enseñanza de las Ciencias Farmacéuticas, a pesar de todas las adversidades y carencias. Especialmente a Mirtica, Dulce, Elisa, Mirta, Lily, Leisy, Miguel A., Miguel C., Mirleida, Arelis, Pedro, Nenena, Yanelis, Naiví, Montenegro, Daimí, Yannarys, Yudith y muchos otros.

A Migue y Maga por acogerme como uno más de la familia.

A David y Jose juntos hemos mantenido una amistad que ha sabido perdurar el paso de los años.

A mi Debbie por su paciencia, cariño, amor y ternura.

Resumen

RESUMEN

Los productos naturales, en especial los derivados de microorganismos, representan un baluarte único e indispensable por su amplia utilidad y beneficios en la medicina humana, veterinaria y en el cuidado de cultivos. Los actinomicetos son los microorganismos con mayor potencial para producir nuevos metabolitos secundarios con propiedades farmacológicas. El surgimiento de nuevos agentes infecciosos y la resistencia a los antimicrobianos convencionales por patógenos multirresistentes ponen en peligro nuestra capacidad para enfrentarlos. Es por ello que, el hallazgo de nuevas moléculas con actividad antimicrobiana representa una urgencia para la medicina moderna. El objetivo de este estudio fue el aislamiento de actinomicetos con la capacidad de producir compuestos con actividad antimicrobiana. Los actinomicetos se aislaron en agar-caseína-almidón y se caracterizaron fenotípicamente. Además, se determinó la actividad antibacteriana frente a Escherichia coli AbamBAtolC y se identificó mediante la Plataforma de Resistencia a los Antibióticos la cepa de actinomiceto Jnb1 con actividad antibiótica y antifúngica. Los extractos activos de este microorganismo obtenidos mediante cromatografía analizaron utilizando se técnicas espectrofotométricas; además, se extrajo y analizó su genoma. Como resultado se demostró que este microorganismo posee similitud del 99,7% con Streptomyces racemochromogenes y codifica para el antibiótico congocidina y un nuevo compuesto poliénico. El estudio de minería genómica permitió elucidar parcialmente la estructura del compuesto poliénico. Por otro lado, el análisis genómico de Jnb1 mostró la posible producción de otros compuestos, algunos de ellos novedosos; así como un BGC híbrido y uno críptico con características singulares. Estos resultados sugieren que la cepa Jnb1 es una fuente promisoria para la obtención de nuevos metabolitos secundarios.

Palabras claves:

Abstract

Natural products, especially those derived from microorganisms, are unique pillars that have extensive use and benefits to human and veterinary medicine as well as to crop protection. Actinomycetes are microorganisms with the highest potential to discover novel secondary metabolites with pharmacological properties. The emergency of new infectious agents along with multidrug resistant pathogens, that withstand conventional antibiotics, put in danger our capacity to face them. Consequently, novel antimicrobial agents are urgently needed to fill this gap. The aim of this work was to isolate actinomycetes strains with the ability to produce metabolites with antimicrobial activity. The strains were isolated on casein-starch agar and characterized phenotypically. Assessment of the antimicrobial activity with Escherichia coli AbamBAtolC and the Antibiotic Resistance Platform revealed a strain, denoted as Streptomyces Jnb1, having antibacterial and antifungal activity. Active extracts from this microorganism were purified and characterized through chromatographic and spectrometric techniques, respectively. The genome of this organism was also extracted, sequenced and analyzed using different bioinformatic software. It was shown that the strain shares 97,7 % of similarity with Streptomyces racemochromogenes and encodes for congocidine, a known antibiotic, along with a new polyene compound whose structure was partially elucidated through genome mining. This analysis also revealed that this strain encodes other compounds, some of them novel, one having a hybrid BGC and another cryptic with singular characteristics. Therefore, the strain Jnb1 seems to be a promising source of novel secondary metabolites.

Índice

RESUMEN i		
INTRODUCCIÓN1		
CAPÍTULO I: MARCO TEÓRICO3		
1.1 Características generales de los actinomicetos3		
1.2 Estudio molecular y estructural de los PKS-NRPS5		
1.2.1 Características generales de los PKS-NRPS5		
1.2.2 Análisis molecular de los dominios enzimáticos en PKS8		
1.2.3 Análisis molecular de los dominios enzimáticos en NRPS10		
1.3 Herramientas de Minería Genómica para el Descubrimiento de Productos Naturales11		
1.3.1 Antibiotics & Secondary Metabolite Analysis Shell11		
1.3.2 ClusterFinder13		
1.3.3 SBSPKS14		
1.3.4 CLUSEAN15		
1.3.5 PRISM16		
1.4 Caracterización del Clúster de Genes Biosintéticos		
CAPÍTULO II: MATERIALES Y MÉTODOS19		
2.1 Recolección de las muestras19		
2.2 Procesamiento de las muestras y aislamiento de actinomicetos19		
2.3 Actividad antimicrobiana. Tamizaje primario y secundario		
2.4 Determinación de la actividad antifúngica21		
2.5 Caracterización de los aislados21		
2.6 Obtención y caracterización de los antibióticos producidos por la cepa de Streptomyces Jnb122		
2.6.1 Fermentación, extracción y aislamiento22		
2.7 Secuenciación genómica y ensamblaje23		
2.8 Análisis del gen del ARNr 16S24		
2.9 Análisis del clúster de genes del compuesto antifúngico24		
2.10 Minería genómica y análisis de los metabolitos secundarios25		
CAPÍTULO III: RESULTADOS Y DISCUSIÓN26		
3.1 Aislamiento de actinomicetos a partir de muestras de suelo		

	3.2 Actividad antimicrobiana. Tamizaje primario y secundario	26
	3.3 Determinación de la actividad antifúngica	28
	3.4 Caracterización de los aislados	29
	3.5 Determinación del antibiótico producido por la cepa Jnb1. Análisis del BGC pa la congocidina	ra 31
	3.6 Análisis estructural del compuesto antifúngico. Minería genómica del BGC del compuesto antifúngico	34
	3.7 Capacidad codificante de metabolitos secundarios de la cepa Jnb1	39
С	ONCLUSIONES	43
R	ECOMENDACIONES	44
R	EFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	45
A	NEXOS	51

Introducción

INTRODUCCIÓN

Los métodos tradicionales empleados en el descubrimiento de productos naturales se basaban principalmente en los ensayos bioactivos y en las tecnologías de aislamiento y purificación (1), en su momento permitieron el descubrimiento de una infinidad de compuestos químicos, en su mayoría metabolitos secundarios (SM, por sus siglas en inglés), con una amplia diversidad estructural y propiedades medicinales de valiosa importancia en el tratamiento de diversas patologías humanas, como es el caso de los antibióticos (β -lactámicos, macrólidos, tetraciclinas, aminoglucósidos), anticancerígenos (vinblastina, taxol, doxorubicina), inmunosupresores (ciclosporina), hipolipemiantes (lovastatina). Sin embargo, estas estrategias han fracasado en cubrir la demanda constante de nuevas entidades químicas (2). Esto se debe, principalmente a la interferencia de compuestos ya caracterizados durante los procesos de purificación guiada por bioactividad (3) y, en segundo lugar, solo una parte de la capacidad biosintética de los organismos productores de SMs es detectable en el laboratorio utilizando estos medios convencionales (4).

El advenimiento de las nuevas tecnologías de la secuenciación (5) (NTS) ha permitido la secuenciación del genoma de bacterias, hongos y plantas a una escala sin precedente. El análisis genómico de estos organismos valiéndose de herramientas bioinformáticas ha demostrado que su genoma presenta genes especializados en la síntesis de novedosos SMs (1, 6). Muchos de los genes encargados de sintetizar un metabolito en particular se encuentran agrupados en clústeres, lo cual permite elucidar la secuencia lógica de reacciones químicas que componen su síntesis (7).

La medicina moderna enfrenta arduos retos marcados por la dinámica evolutiva de las enfermedades. Entre los ejemplos más evidentes del surgimiento de nuevos agentes infecciosos están el virus SARS-CoV-2 (8) y el hongo *Candida auris* (9). Además, la existencia de patógenos multirresistentes capaces de hacer ineficaces a un gran número de antibióticos pone en riesgo sus beneficios. Por

tanto, los desafíos expuestos anteriormente no van acompañados con la creación de nuevas moléculas farmacológicas.

Entre los organismos productores de moléculas con actividad biológica, los actinomicetos representan uno de los grupos de microorganismos que producen gran diversidad de metabolitos. Dentro del filo Actinobacteria, el género *Streptomyces* es un grupo de gran interés debido a su capacidad para producir antibióticos y otros metabolitos secundarios bioactivos.

Problema científico:

El empleo de los métodos tradicionales en el descubrimiento de productos naturales no constituye un mecanismo efectivo en el descubrimiento de nuevas moléculas, por lo que es necesario nuevas tecnologías para determinar moléculas naturales novedosas.

Como vía para solucionar el problema científico se formula la siguiente hipótesis:

Los actinomicetos producen aproximadamente cerca de las tres cuartas partes de los antibióticos de uso terapéutico; y son una de las fuentes más atractivas de nuevos metabolitos bioactivos; por lo que la minería genómica de clústeres de genes biosintéticos de actinomicetos líderes podría detectar y caracterizar novedosas moléculas pequeñas con actividad farmacológica.

Objetivo general

Caracterizar los clústeres de genes biosintéticos de actinomicetos líderes utilizando herramientas bioinformáticas para la minería de genes.

Objetivos específicos

- > Caracterizar actinomicetos líderes aislados a partir de suelo.
- Determinar los metabolitos con actividad farmacológica producidos por los microorganismos líderes.
- > Realizar minería genómica a los actinomicetos líderes.

Capítulo I

Marco Teórico

CAPÍTULO I: MARCO TEÓRICO

1.1 Características generales de los actinomicetos

Los actinomicetos son microorganismos abundantes en el suelo, sin embargo se encuentran también en ambientes acuáticos, tanto dulces como marinos (10). Entre sus características particulares se encuentra la de producir un olor típico a suelo húmedo, debido a la producción de un metabolito denominado geosmina (11, 12). Además, se caracterizan por presentar una actividad metabólica alta, y producir terpenoides, pigmentos y enzimas extracelulares que les confieren una gran capacidad para degradar la materia orgánica de origen vegetal y animal (13). Los actinomicetos constituyen un grupo heterogéneo de microorganismos; son bacterias Gram positivas que se caracterizan por su capacidad de formar filamentos ramificados.

El orden de los Actinomycetales comprende 63 géneros, constituyendo aproximadamente del 20 al 60 % de la población microbiana total del suelo (14). Actualmente, la clasificación del filo Actinobacteria sugerida en el Manuel de Bergey's de Sistemática Bacteriológica ha limitado los rangos taxonómicos de subclases y subórdenes, reconociendo únicamente los rangos de clases y órdenes. Por lo tanto este filo está dividido en seis clases: Actinobacteria, Acidimicrobiia, Coriobacteriia, Nitriliruptoria, Rubrobacteria y Thermoleophilia (15).

Filo: Actinobacteria

Clase: Actinobacteria

Orden: Actinomycetales

El Orden Actinomycetales es uno de los 15 órdenes clasificados en la Clase Actinobacteria. La mayoría de los integrantes de este orden son Gram positivos, bacilos no móviles rectos o ligeramente curvados, algunos de los cuales tienden a formar filamentos ramificados de hasta 1 mm de diámetro. La facilidad de la fragmentación de los filamentos produce formas bacilares o cocoides. Las colonias pueden ser filamentosas dando una apariencia micelial, pero no se da la formación de un verdadero micelio aéreo. La mayoría de especies producen colonias blancas o grises predominantemente, mientras que ciertos grupos pueden desarrollar colonias pigmentadas de color rojo oscuro, rojizo, marrón, rosa o amarillento (16). La mayoría de sus miembros son anaerobios facultativos, con algunas excepciones. Por otro lado, el dióxido de carbono estimula el crecimiento de muchas especies, la reducción del nitrato varía entre géneros y especies, además todos los miembros de este grupo son quimiorganótrofos. Los productos finales de la fermentación de la glucosa incluyen ácido acético, láctico y succínico, con alguna variación en las cantidades de estos ácidos producidos por miembros de diferentes géneros.

Se caracterizan además, por presentar un alto contenido de guanina y citosina en su ADN, encontrándose en el rango de 51 a 78 % G+C. Estas bacterias son generalmente aerobias pero algunas son anaerobias, pudiéndose encontrar en animales o en el hombre; son heterótrofas, por lo cual pueden utilizar fuentes de carbono simples o complejas, y compuestos moleculares orgánicos tales como ácidos, azúcares, polisacáridos, lípidos, proteínas e hidrocarburos alifáticos. Los actinomicetos utilizan como fuentes de nitrógeno amonio, nitratos, aminoácidos, peptonas y un gran número de proteínas (17).

Los actinomicetos son los microorganismos con mayor potencial para producir nuevos antibióticos como metabolitos secundarios de importancia industrial. Alrededor del 45 % de todos los compuestos bioactivos obtenidos a partir de microorganismos son producidos por actinomicetos (18). Los antibióticos utilizados en la práctica clínica tales como la fosfomicina, lincomicina, neomicina, estreptomicina, daptomicina, la eritromicina y la tetraciclina son producidos por el género Streptomyces perteneciente al Orden Actinomycetales (19). Streptomyces es un género de bacterias Gram positivas, que crece en diferentes entornos y su forma se asemeja a los hongos filamentosos. La diferencia morfológica de Streptomyces implica la formación de una capa de hifas que pueden diferenciarse en una cadena de esporas (Figura 1.1).



Figura 1.1. Ciclo de vida de los actinomicetos formadores de esporas. Foto tomada de (20).

La propiedad más interesante de *Streptomyces* es la capacidad de producir metabolitos secundarios bioactivos, tales como antifúngicos, antivirales, antitumorales, antihipertensivos, inmunosupresores y especialmente antibióticos (21, 22). La producción de la mayoría de los antibióticos es específica de la especie, y estos metabolitos secundarios son importantes para las especies del género *Streptomyces*, ya que les confieren una capacidad especial para competir con otros microorganismos con los que entran en contacto, incluso con especies del mismo género (23).

1.2 Estudio molecular y estructural de los PKS-NRPS

1.2.1 Características generales de los PKS-NRPS

Del prominente reservorio de fármacos utilizados en la medicina veterinaria y humana cerca de una cuarta parte son moléculas de productos naturales o análogos modificados químicamente de productos naturales; además otra cuarta parte son fármacos sintéticos diseñados para actuar en las mismas dianas de productos naturales (24). Estas moléculas pequeñas (<2.500 Da) se sintetizan por megaenzimas; por ejemplo, en la síntesis el compuesto 6-deoxieritronolide B (estructura base de la eritromicina) intervienen tres sintetasas DEBS 1 (3545 aa y 371 kDa), DEBS 2 (3567 aa y 374 kDa) y DEBS 3 (3171 aa y 332 kDa), capaces de incorporar pequeños monómeros (<250 Da), provenientes principalmente del

metabolismo celular primario (25). Entre las principales moléculas se encuentran los policétidos (pk), los péptidos no-ribosomales (nrp) y los péptidos sintetizados ribosomalmente y modificados postraduccionalmente (ripp). En el caso de los primeros están formados por la incorporación en su mayoría de malonil-CoA y metilmalonil-CoA, así como por 2-metilbuteril-CoA, benzoil-CoA, isobuteril-CoA, propionil-CoA, etilmalonil-CoA, metoximalonil-CoA, entre otros. La incorporación de los monómeros se realiza en los dominios aciltransferasa (AT) de los policétidos sintetasas (PKS, por sus siglas en inglés), donde se transfiere el grupo acilo (los monómeros incorporados son de estequiometría "S" en el grupo α), mediante la hidrólisis de acil-CoA al grupo sulfidrilo del grupo panteteinilo presente en el dominio tiolación (T), también nombrado proteína portadora de acilo (ACP, por sus siglas en inglés) (Figura 1.2A). En los péptidos noribosomales las entidades incorporadas pueden ser α-aminoácidos proteogénicos, no-proteogénicos, modificaciones de α-amino ácidos como Nacilación y C-aminación, carboxilatos como salicilatos y otros sustratos considerados no-canónicos (monómeros no α -amino ácido). La incorporación de los sustratos anteriores se efectúa en los dominios adenilación (A), donde son activados mediante la hidrólisis de ATP y la formación del aminoacilo-AMP y la posterior reacción de tioesterificación del sulfidrilo presente en el grupo panteteinilo del dominio tiolación (T), también nombrado proteína portadora de peptidilo (PCP, por sus siglas en inglés) (Figura 1.2B).



Figura 1.2. Activación de los monómeros en PKS y NRPS. **A**. Incorporación del grupo funcional acilo en el dominio T de los PKS. **B**. Formación del enlace tioester a partir del aminoacil-AMP en NRPS.

La diversidad estructural en los policétidos y los péptidos no-ribosomales se debe a la combinación de estos monómeros y su elongación mediante una reacción de condensación tipo Claisen efectuada en los dominios cetosintetasa (KS, por sus siglas en inglés) y la formación del enlace amida en los dominios condensación (dominio C), respectivamente (**Figura 1.3A y B**). Además de los dominios mencionados anteriormente existen otros que permiten la modificación de los monómeros. Para PKS entre estos dominios se encuentran: cetorreductasa (KR, por sus siglas en inglés), dehidratasa (DH, por sus siglas en inglés), enoilreductasa (ER, por sus siglas en inglés), metiltransferasa, tioesterasa, entre otros; mientras para NRPS: epimerasa (E, por sus siglas en inglés), ciclasa (Cy, por sus siglas en inglés).





Figura 1.3. Reacciones de condensación y línea de ensamblaje. A. Condensación tipo Claisen y elongación de la cadena en PKS. B. Formación de la amida y elongación de la cadena en NRPS.
C. Línea de ensamblaje en PKS y síntesis de 6-deoxieritronolide B (estructura base de la eritromicina).

También existen moléculas pequeñas híbridas formadas por la combinación de PKS y NRPS, por ejemplo, la epotilona. El orden e identidad de cada dominio proteico en las líneas de ensamblaje especifica (i) la secuencia de unidades monoméricas activadas e incorporadas, (ii) las modificaciones químicas que ocurren en cada dominio, y (iii) la longitud y funcionalidad del producto liberado del extremo final en la línea de ensamblaje (26) (**Figura 1.3C**).

1.2.2 Análisis molecular de los dominios enzimáticos en PKS 1.2.2.1 Dominio Aciltransferasa

En las PKSs el dominio aciltransferasa es el encargado del reconocimiento e incorporación de los sustratos monoméricos en la síntesis de los policétidos. El dominio AT cataliza la transferencia del grupo acilo de los diferentes monómeros acilCoA al dominio proteína cargadora de acilo (ACP, por sus siglas en inlgés), también conocido como dominio tiolación. Un residuo serina presente en el dominio AT actúa como nucleófilo y ataca el enlace tioester del acilo, formando el intermediario acil-*O*-ester con enlace covalente. Luego el grupo acilo se transfiere al grupo sulfidrilo del brazo panteteinilo en el dominio ACP (**Figura 1.4**).





Los dominios AT se clasifican en *cis*- o *trans*-AT dependiendo de su posición en el clúster. Los dominios *cis*-ATs están integrados en la cadena polipeptídica de las PKSs, mientras que los *trans*-ATs no están integrados en la cadena polipeptídica de las PKSs y, por tanto, forman una proteína fuera de las sintetasas (27).

Los dominios AT presentes en PKSs son el principal centro de atención en la predicción de policétidos en la mayoría de los algoritmos bioinformáticos, ya que al ser la aciltransferasa el dominio involucrado en el reconocimiento e incorporación de los monómeros, conocer su especificidad indica predecir correctamente la estructura base del producto natural sintetizado.

1.2.2.2 Dominio Cetorreductasa

El dominio cetorreductasa (KR) interviene en la reducción del grupo β -ceto formado en el dominio KS. El dominio KR utiliza NADPH para transferir un hidruro al carbonilo y el protón de un residuo tirosina conservado para protonar al oxianión. Las cetorreductasas se clasifican en A1, A2, B1, B2, C1 y C2, según su capacidad para 1) tener actividad reductora (A1, A2, B1, B2), 2) epimerizar el grupo en α (A2, B2 y C2), 3) formar el hidroxilo en R o S (R: B1, B2 y S: A1, A2) (28).

1.2.2.3 Dominio Dehidratasa y Enoilreductasa

El dominio dehidratasa (DH) interviene en la reducción del hidroxilo generado en el dominio KR utilizando NADPH como agente reductor y formando la α - β olefina. El dominio enoilreductasa (ER) cataliza la reducción del doble enlace producido en el módulo DH y forma el grupo no reactivo metileno. Los residuos Y241, K422 y D444 en el dominio ER parecen dominar la estereoquímica del carbono C3, aunque más evidencias son necesarias para clasificar los dominios ER según la estereoquímica del sustituyente en la posición C3 (29).

1.2.3 Análisis molecular de los dominios enzimáticos en NRPS

1.2.3.1 Dominio Adenilación

El dominio adenilación (A) interviene en la selección y activación del sustrato amino (hidroxi) acídico incorporado a la cadena peptídica mediante la hidrólisis de ATP y la formación del adenilato de aminoacilo (30). El dominio A está compuesto de *ca*. 550 aminoácidos y muchos de estos residuos son altamente conservados tanto para la coordinación de ATP como para la especificidad del sustrato. Los estudios estructurales del dominio A GrsA unido a su sustrato (Phe) revelan la localización de 10 motivos principales altamente conservados (A1 a A10); así como la localización de 10 residuos en el compartimento de unión de la fenilalanina que posee una baja similitud entre diferentes dominios A (31). La predicción de la especificidad del sustrato de los dominios A se basa en la mayoría de los programas bioinformáticos en 34 residuos correspondientes a una distrancia de 8Å alrededor del compartimento central de del dominio A de GrsA o en base a residuos con alta similitud en alineamientos múltiples de dominios A con especificidad para sustrato detectados mediante HMMs (32).

1.3 Herramientas de Minería Genómica para el Descubrimiento de Productos Naturales

El análisis de las secuencias genómicas de bacterias, hongos y organismos superiores muestra que su potencial biosintético es mucho mayor que el presente en los extractos obtenidos de su fermentación, lo cual indica que existe un reservorio novedoso de moléculas bioactivas por descubrir. El desarrollo de una amplia variedad de programas bioinformáticos ha facilitado el análisis de los genes encargados de codificar la síntesis de dichos metabolitos, los cuales basan sus algoritmos en nuestro conocimiento sobre la lógica biosintética de las líneas proteicas de ensamblaje (2, 33). Estos en su mayoría se basan en *maching learning* y *deep learning* (término en inglés). La siguiente revisión cubrirá algunos de los programas más utilizados en la predicción de los clústeres de genes biosintéticos (BGC, por sus siglas en inglés).

1.3.1 Antibiotics & Secondary Metabolite Analysis Shell

El programa bioinformático antiSMASH (<u>anti</u>biotics & <u>Secondary Metabolite</u> <u>Analysis Shell</u>) fue el primero capaz de identificar loci biosintéticos cubriendo una amplia variedad de productos naturales (policétidos, péptidos no-ribosomales, terpenos, aminoglucósidos, lantibióticos, beta-lactámicos, sideróforos y otros). antiSMASH permite la identificación, anotación y análisis de los clústeres de genes de metabolitos secundarios con una visualización final interactiva en HTML (34).

En el primer paso de su algoritmo antiSMASH utiliza la herramienta HMMer3, el cual realiza una búsqueda de todos los genes codificadores de proteínas

utilizando perfiles de Modelos Ocultos de Markov (pHMM), basándose en alineamientos múltiples de secuencias de patrones de proteínas o dominios de proteínas caracterizadas experimentalmente, los cuales solo se encuentran en los BGCs. Para esto el programa utiliza una librería de modelos pHMM específicos para PKS I, II y III, NRPS, terpenos, lantibióticos, beta-lactámicos, aminocumarinas, indol, ectoína, sideróforos, fosfoglicolípidos, melaninas y aminoglucósidos; así como pHMMs para falsos positivos. Los modelos deberán superar un umbral calculado por los autores, además de cumplir con parámetros de disposición entre los genes principales y accesorios en cada clúster para considerarlos como un clúster de genes. Es importante resaltar que los BGCs muy cercanos en un mismo contig son clasificados como uno solo y se denominan "superclústeres" (34, 35).

El siguiente paso en el algoritmo consiste en la detección de la arquitectura de los principales dominios proteicos encargados de la síntesis del esqueleto molecular de los metabolitos secundarios. El software analiza estos dominios usando otra librería de pHMM específica para dominios de NRPS/PKS y para subgrupos funcionales/filogenéticos de estos dominios. Además, utiliza el algoritmo empleado en CLUSEAN (CLUster SEquence Analyzyer) para motivos conservados dentro de los dominios claves de PKS y NRPS (36)). La correcta ejecución de los pHMMs en este paso permitirá establecer un nexo entre la funcionalidad en estos dominios (AT, ACP, KS, A, PCP, C, etc.) y los monómeros presentes en el metabolito biosintetizado. Por lo que el paso descrito anteriormente es fundamental para la correcta anotación de los monómeros incorporados y las modificaciones químicas subsiguientes. Luego, antiSMASH predice la especificidad de los módulos de las PKS y las NRPS por sus sustratos, para ello se basa en diferentes patrones en las secuencias de aminoácidos para cada dominio. Para el caso de los dominios aciltransferasa (AT) en PKS, Yadav G. et al. determinaron 11 residuos conservados (Q11, G90, H91, L93, G94, R117, S200, N231, Q250, V255, Q63 Y H201) fuera del sitio activo adicionales a otros 13 (T15, K58, T59, W60, Q61, T62, S70, A72, S197, V198, P199) en el sitio activo descritos con anterioridad que diferencian malonato, metilmalonato y otros. Por

ejemplo, estudios realizados mediante mutagénesis específica en el sitio de acción indican que el residuo Phe200 en los dominios AT bloquea la incorporación de metilmalonato y no de malonato, posibilitando la correcta anotación de ambos sustratos (36, 37). Además, utiliza los pHMMs descritos por Minowa Y., et al. generados a partir de residuos trazados con el método de trazo evolutivo cuantitativo (38). Para la predicción de los sustratos incorporados por los dominios A utiliza el método basado en vectores de apoyo transductivo de aprendizaje autónomo descrito en el programa NRPSPredictor, el cual fue entrenado basado en 12 descriptores de las propiedades físico-químicas (número de enlaces de hidrógenos, índice de polaridad, volumen, preferencia para hojas- β , hélices- α , entre otros) de 34 residuos presentes en los dominios A a una distancia máxima de 8 Å del sustrato fenilalanina en GrsA y fue capaz de identificar correctamente el sustrato del 88% de los 1230 dominios A evaluados con >70% de identidad (32). Basado en la secuencia aminoacídica de los dominios KR, antiSMASH predice la estereoquímica de cada intermediario biosintetizado y el orden biosintético de los módulos de los PKS/NPRS generando como resultado la estructura química central del metabolito. Para la anotación de los genes accesorios dentro de los BGCs, antiSMASH utiliza pHMMs partiendo de alineamientos de clústeres de grupos ortólogos de metabolitos secundarios (smCOG, por sus siglas en inglés) creados a partir de HMM de genes accesorios previamente agrupados en clústeres con OrthoMCL.

antiSMASH facilita la detección de una extensa variedad de BGCs en el genoma de bacterias y hongos en base a los pHMM evaluados en el primer paso de su algoritmo, lo cual permite identificar una amplia variedad de metabolitos. Aunque su desempeño es formidable en la identificación de los BGCs con pHMM conocidos, como es de esperar antiSMASH no posee un desempeño efectivo en la detección de BGCs de clases nuevas cuyos pHMMs no hayan sido generados.

1.3.2 ClusterFinder

La herramienta bioinformática ClusterFinder utiliza un algoritmo probabilístico basado en HMM empleando un mecanismo general para la identificación de BGCs. Su algoritmo consiste en un modelo probabilístico con dos estados (BGC y no-BGC), usando para el estado BGC un conjunto de adiestramiento de 677 BGCs caracterizados experimentalmente que codifican moléculas pequeñas conocidas, y para el estado no-BGC un conjunto de adiestramiento de regiones no BGC de 100 genomas seleccionados aleatoriamente (39) (**Figura 1.5**). ClusterFinder facilita la identificación de una amplia variedad de BGCs omitidos por otros programas, aunque permite descubrir novedosos BGCs para moléculas pequeñas no necesariamente estos son clústeres de genes para moléculas pequeñas con propiedades farmacológicas (40). antiSMASH tiene incorporado la opción ClusterFinder.



Figura 1.5. Diagrama del algoritmo utilizado en ClusterFinder.

1.3.3 SBSPKS

El estudio de las megasintetasas PKS y NRPS basado en datos estructurales, así como de las regiones de unión interpolipeptídicas puede efectuarse con la herramienta informática SBSPKS. Su esquema se compone de tres funciones para el estudio de las PKS/NRPS: NRPS-PKS, MODEL_3D_PKS y DOCK_DOM_ANAL (41).

El software NRPS-PKS es la primera función presente en SBSPKS. La identificación de los dominios de las PKSs de consulta se realiza mediante alineamiento por pares con secuencias patrones para los dominios KS, AT, DH, ER, KR, TE y ACP; mientras que para la identificación de los dominios A y C de las NRPSs se basa en la anotación mediante alineamiento por pares en la Base de Datos de Dominios Conservados. La especificidad por los sustratos de los

dominios AT y A se efectúa mediante los estudios de Yadav G. *et al.* y Stachelhaus T. *et al.*, respectivamente (31, 37).

Su segunda función se diseñó para modelar la estructura 3D de los módulos de las proteínas PKS tipo-I en su conformación dimérica activa, dicha modelación se realiza superponiendo las estructuras de los dominios de PKS tipo-I, elucidadas mediante cristalografía de rayos X, sobre los dominios estructuralmente homólogos en la estructura cristalina de la FAS de mamíferos. El protocolo de modelaje consiste en la alineación de la secuencia del módulo de consulta a las secuencias de determinados templados usando BLAST y utilizando estos alineamientos, las coordenadas de las cadenas laterales de cada residuo aminoacídico se predice usando SCWRL (41). Esta función también predice la especificidad de los dominios AT y KR según lo descrito por otros autores (28, 37, 42). El análisis de la lógica biosintética de las PKSs modulares ha permitido conocer que el orden de los marcos de lecturas abiertos (ORF, por sus siglas en inglés) en el genoma no determina la secuencia de los monómeros en la síntesis de los policétidos; sino que existen interacciones moleculares entre las proteínas generadas por estos ORFs, las cuales pueden ser predichas y por tanto puede ser elucidado el orden biosintético (43). La función DOCK_DOM_ANAL, también incorporada a antiSMASH, permite la evaluación de los dominios de acoplamiento (unión interpolipeptídicas) entre ORFs, basado en interacciones moleculares entre las secciones de aminoácidos N-terminal del primer dominio KS y las secciones de aminoácidos C-terminal del último dominio ACP (41).

1.3.4 CLUSEAN

EL programa CLUSEAN (<u>CLU</u>ster <u>SE</u>quence <u>A</u>nalyzyer) permite la detección de los dominios de PKS y NRPS; así como la predicción de la especificidad de los dominios AT en PKS y A en NRPS. Para la anotación CLUSEAN incluye BLAST; para la identificación de los dominios AT y su especificidad utiliza HMMer frente a bases de datos de perfiles tales como Pfam; mientras que para la especificidad de los dominios A en NRPS utiliza el procedimiento basado en vectores de apoyo transductivo de aprendizaje autónomo (36). CLUSEAN está insertado en el programa antiSMASH.

1.3.5 PRISM

PRISM (PRediction Informatics for Secondary Metabolomes) es una aplicación web para la predicción genómica de péptidos no-ribosomales, policétidos tipo I y Il y péptidos modificados postraduccionales: así como para la derreplicación de dichas entidades químicas (Figura Suplementaria 1). PRISM en su primera versión implementó un total de 479 HMMs y en su cuarta versión un total de 1772 HMMs (44), incluyendo 24 HMMs para dominios tiotemplados, 68 HMMs para sustratos de dominio adenilación, 15 HMMs para sustratos de dominio aciltransferasa, 26 HMMs para sustratos de dominio aciltransferasa, además de HMMs para dominios beta-lactámicos, accesorios, policétidos tipo II, sustratos inusuales, de resistencia, metiltransferasa, entre otros. Peculiarmente, dentro de estos HMMs de entrenamiento se incorporaron también HMMs para dominios de citocromos P450; de transacilasas fúngicas de inicio específicas para acetil y hexanoil. Otra característica de PRISM es que, a diferencia de antiSMASH, utiliza HMMs para la detección de dominios adenilación para una diversa variedad de sustratos, tanto proteogénicos como no proteogénicos. PRISM es capaz de identificar clústeres iterativos de policétidos tipo I, pero no predice sus productos químicos (45).

Para la predicción de la estructura química *de novo* el software implementa permutaciones de los ORFs, exceptuando los ORFs de inicio y finalización, en caso de no cumplirse el principio de colinearidad; así como la implementación de una lógica combinatorial para la incorporación de subestructuras químicas y reacciones accesorias (cloraciones, glicosilaciones, oxidaciones de unión cruzada, etc.) en los sitios permitidos en la estructura base del metabolito (**Figura 1.6**). Además, el programa es capaz de detectar los sitios de inserción de *trans*-aciltransferasas y de dominios adenilación *trans*-actuante basado en la ausencia de dominios aciltransferasas en los módulos de los ORFs y la presencia de un didominio condensación-tiolación (**Figura Suplementaria 2**).



Figura 1.6. Lógica combinatoria utilizada en PRISM (45).

PRISM implementa un algoritmo para la derreplicación genética de BGCs, basado en la hipótesis de que la información presente en los dominios formadores de enlaces es más conservada que en los no formadores. También, incorpora un método de derreplicación química fundamentado en el tamizaje virtual basado en similitud usando huellas 2D, lo que permite detectar analogías entre los metabolitos secundarios interrogados y una base de datos gráficos con 49 860 productos naturales usando el coeficiente de Tanimoto como medidor de semejanza (46).

1.4 Caracterización del Clúster de Genes Biosintéticos

Un Clúster de Genes Biosintéticos (BGC) está definido como un grupo de dos o más genes físicamente agrupados en un genoma particular, que juntos codifican una ruta biosintética para la producción de metabolitos especializados (incluyendo sus variantes químicas). Existen ciertos parámetros que deben cumplirse para otorgarle la condición de BGC a una secuencia genómica. Estas especificaciones se conocen como la Información Mínima del clúster de Genes Biosintéticos (MIBiG, por sus siglas en inglés), las cuales son una extensión coherente de la Información Mínima sobre cualquier marco de Secuencia

desarrollado por el Genome Standard Consortium (GSC's MIxS, por sus siglas en inglés). La MIBiG se compone de parámetros generales aplicables a cada uno y a todo clúster de genes, así como a parámetros específicos para cada tipo de compuesto que aplican solo a clases específicas de rutas biosintéticas (47). Entre estos parámetros generales obligatorios se encuentran: clase(s) biosintética(s). publicaciones claves, número de loci, clúster completo/parcial, enzimas/reacciones decorativas, así como el nombre, la estructura y actividad del compuesto. Los parámetros específicos para cada clase de compuesto (policétido, péptidos no ribosomales (NRP), terpenoides, péptidos sintetizados ribosomalmente y modificados postraduccionalmente (RiPPs), alcaloides y azúcares) son subclase de policétido sintetasas, unidad de inicio, genes PKS, especificidades del dominio de sustrato AT/CAL, ciclasa/aromatasa, número de iteraciones, entre otros; subclase de NPR: genes NRPS, tipo de tioesterasa, tipo de liberación/ciclación; etc. Existen también BGCs híbridos que forman múltiples clases bioquímicas de SMs. Es importante resaltar que estos estándares son aplicables en cualquier ruta biosintética de cualquier origen taxonómico.
Capítulo II

Materiales y Métodos

CAPÍTULO II: MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Recolección de las muestras

En el periodo comprendido entre 2016 y 2019 se realizaron seis expediciones a lo largo de la isla de Cuba, dichas expediciones fueron: Pico Turguino en Santiago de Cuba, Rancho Querete en Sancti Spíritus, Jardín Botánico de la UCLV en Santa Clara, Llanura Cárdenas-Varadero en Matanzas, Las Terrazas en Artemisa y Valle de Viñales en Pinar del Río; para conformar así un total de 12 muestras de suelo (Figura 2.1). Las muestras fueron recolectadas en frascos estériles plásticos o de cristal y transportadas de inmediato al laboratorio de Microbiología del Centro de Bioactivos Químicos de la Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas, en donde fueron almacenadas a temperatura de 4 °C y procesadas las 72 dentro de horas posteriores а la recogida.



Figura 2.1. Lugares de muestreo.

2.2 Procesamiento de las muestras y aislamiento de actinomicetos

De cada muestra se tomó 1 g de suelo y se suspendió en 9 mL de agua destilada estéril mediante agitación con vórtex. Seguidamente, se realizaron diluciones decimales en agua estéril hasta obtener una dilución final equivalente a 10^{-5} de la concentración inicial. A partir de las diluciones 10^{-3} , 10^{-4} y 10^{-5} se sembraron 100 µL en placas de Agar Caseína Almidón (ACA) (almidón 10 g, K₂HPO₄ 2 g,

KNO₃ 2 g, caseína 0,3 g, MgSO₄·7H₂O 0,05 g, CaCO₃ 0,02 g, FeSO₄·7H₂O 0,01 g, agar 15 g, agua destilada 1 L), Agar Ácido Húmico (AAH) (ácido húmico 1 g, K₂HPO₄ 0,5 g, FeSO₄·7H₂O 0,001 g, agar 20 g, solución de vitamina B 1 mL (tiamina-HCI (50 mg), riboflavina (50 mg), niacina (50 mg), pyridoxina-HCI (50 mg), inositol (50 mg), Ca-pantotenato (50 mg), ácido p-aminobenzóico (50 mg), biotina (25 mg) y agua destilada 1 L, suplementados con cicloheximida (100 µg mL⁻¹) y ácido nalidíxico (30 µg mL⁻¹). Las placas se incubaron a 28°C entre 10-14 días. Las colonias aisladas con morfología típica a actinomicetos (cultivos puros) se conservaron en 20 % de glicerol a -20 °C para estudios posteriores, paralelamente las colonias aisladas fueron co-cultivadas (entre 6 y 10 actinomicetos por placa).

2.3 Actividad antimicrobiana. Tamizaje primario y secundario

En el tamizaje primario se determinó la actividad antimicrobiana de las cocultivadas frente a *Escherichia coli* $\Delta bam B\Delta tolC$, una mutante hiperpermeable y deficiente de eflujo con incrementada sensibilidad a los antibióticos (48); aplicando el método de difusión en agar. Luego, se realizó el tamizaje secundario de los actinomicetos con actividad en el tamizaje primario, donde se determinó la actividad antimicrobiana frente a la Plataforma de Resistencia a los Antibióticos (ARP), la cual permite la derreplicación de cepas productoras de antibióticos conocidos con elevada frecuencia de producción. La ARP consiste en un arreglo celular de genes resistentes individuales con mecanismo de acción diferentes (49). Las cepas *E. coli* $\Delta bam B\Delta tolC$ y *E. coli* $\Delta bam B\Delta tolC$ ARP fueron cultivadas en placas de AMH (Agar Mueller Hinton) e incubadas a 37°C por 24 horas. Luego se realizó una suspensión y se comparó con el tubo 0.5 de la escala de MacFarland correspondiendo a una concentración de 1x10⁸ UFC mL⁻¹.

Cada uno de los actinomicetos aislados se sembró en placas de ACA y se incubaron a 28°C durante 7 días. Las cepas de *E. coli* $\Delta bamB\Delta tolC$ y *E. coli* $\Delta bamB\Delta tolC$ ARP se sembraron en toda la superficie de las placas petri con AMH. Seguidamente, se extrajeron muestras circulares en forma de disco (plugs) de 6 mm de las placas con actinomicetos y se colocaron en la superficie de las placas sembradas con *E. coli* $\Delta bamB\Delta tolC$ y *E. coli* $\Delta bamB\Delta tolC$ ARP. La actividad antibacteriana se evaluó y se expresó tomando como referencia el diámetro del halo de inhibición (mm), alrededor de cada plug, el cual se midió a las 18-24 horas de incubación a 37ºC.

2.4 Determinación de la actividad antifúngica

Todos los compuestos se compraron a Sigma-Aldrich. Dimetilsulfóxido (DMSO) fue el disolvente para todos los compuestos. Las determinación de la Concentración Inhibitoria Mínima se realizaró en placas de microtitulación de 96 pocillos en forma de U usando el protocolo de microdilución en caldo (50). Los ensayos se acondicionaron en un volumen total de 0.2 mL/pocillo con diluciones seriadas dobles en medio RPMI 1640, siguiendo las normas de microdilución según las directrices de la CLSI (51). Las placas se incubaron en la oscuridad durante 48-72 horas y la absorbancia se determinó a 600 nm usando un espectrofotómetro (Molecular Devices). Los ensayos se realizaron por duplicado para cada cepa y los datos se mostraron cuantitativamente con color. La concentración inhibitoria mínima (CIM) se definió como la concentración más baja capaz de inhibir el crecimiento visible de los microorganismos de ensayo.

2.5 Caracterización de los aislados

Según las recomendaciones del Proyecto Internacional de *Streptomyces* (ISP) (52), los microorganismos aislados se caracterizaron teniendo en cuenta las características morfológicas, bioquímicas, culturales y fisiológicas. La caracterización morfológica fue realizada mediante la técnica del cultivo en cubreobjeto inclinado (53), la formación del micelio aéreo y de sustrato y la disposición de las esporas sobre el micelio fueron observados mediante la utilización de un microscopio de campo claro. Las características culturales (crecimiento, coloración del micelio aéreo y de sustrato, formación de pigmento difusible en el medio) fueron evaluadas en diferentes medios de cultivos ACA, agar Nutriente (peptona 5 g, extracto de levadura 3 g, NaCl 5 g, agar 15 g, agua destilada 1 L), agar Czapek (sacarosa 30 g, NaNO₃ 3 g, NaCl 0,5 g, MgSO₄ 0,5 g, FeSO₄·7H₂O 0,01 g, K₂PO₄ 1 g, agar 15 g, agua destilada 1

L, pH 7,3), ISP1 (extracto de levadura 3 g, Triptona 6 g, agar 15 g, agua destilada 1 L), ISP2 (extracto de malta 10 g, extracto de levadura 4 g, dextrosa 4 g, agar 15 g, agua destilada 1 L), ISP3 (hojuelas de avena 20 g, solución de trazas de sales 1mL (solución de trazas de sales: FeSO₄·7H₂O 0,1 g, MnCl₂·7H₂O 0,1 g, ZnSO₄·7H₂O, agua destilada 100mL), agar 18 g, agua destilada 1 L, pH 7,2) e ISP5 (L-asparagina anhidra 1 g, glicerol 10 g, K₂HPO₄ 1 g, solución de trazas de sales 1 mL, agar 20 g, agua destilada 1 L, pH 7). Las pruebas bioquímicas incluyeron catalasa, oxidasa, urea, citrato, Voges Proshauer, rojo de metilo, motilidad, indol, hidrólisis de la gelatina, caseína, almidón, producción de H₂S, producción de glucosa y reducción de nitrato (54). Los caracteres fisiológicos de los aislados fueron estudiados sobre la base de la resistencia a diferentes concentraciones de NaCl y la utilización de fuentes de carbono y nitrógeno (55).

2.6 Obtención y caracterización de los antibióticos producidos por la cepa de *Streptomyces* Jnb1

2.6.1 Fermentación, extracción y aislamiento

La cepa de *Streptomyces* Jnb1, seleccionada con la plataforma ARP, se inoculó en 100 mL de Caldo Triptona Soya (TSB, por sus siglas en inglés) e incubó con agitación durante 3 días a 30 °C. Seis matraces de 2.8 L con muelles en su interior y 1 L de medio SAM se inocularon con 10 mL de una suspensión de la cepa Jnb1 en TSB, y se incubaron a 30 °C en un agitador orbital a 200 rpm durante 4 días. El cultivo se extrajo con acetato de etilo (6 L por duplicado), el cual se evaporó bajo presión reducida. El cultivo celular se filtró y el filtrado crudo se inoculó con resina HP-20 (Diaion) 2 % (w/v). La resina se cargó en columnas de 1L y las moléculas se eluyeron por gravedad usando un gradiente de elución escalonado de agua-metanol para obtener 6 fracciones. La bioactividad de las fracciones se evaluaron y las fracciones activas (60 % y 100 % metanol) se separaron por cromatografía CombiFlash de fase reversa con columna C18 (RediSep, 43 g), utilizando un gradiente acetonitrilo/agua desde 0-100 %, seguido de evaporación de las fracciones activas y procesamiento en una columna de Sephadex LH-20 eluída con metanol. La purificación final se realizó a través de HPLC de fase reversa (con un gradiente acetonitrilo/agua (conteniendo 0,1 % de ácido fórmico) hasta obtener un compuesto antibacteriano (3.2 mg) y otro antifúngico (0.8 mg). Los espectros de masa se obtuvieron a través de un equipo LC-ESI-MS Agilent 1100 Series (Agilent Technologies) y de un sistema LC/MS/MS QTRAP (Applied Biosystems). La determinación estructural del agente antibacteriano se realizó a través de Resonancia Magnética Nuclear protónica en un instrumento Bruker AVIII a 700 MHz (Billerica, MA, EUA.), equipado con una criosonda y dimetilsulfóxido deuterado. Los corrimientos químicos se reportaron en ppm en relación con el tetrametilsilano, usando la señal residual del solvente como señal interna.

2.7 Secuenciación genómica y ensamblaje

Para la extracción del ADN genómico, un cultivo de Jnb1 se inoculó en caldo líquido de Bennett, se incubó a 30 °C por 4 días y las células se cosecharon mediante centrifugación. Las células se lavaron con 10.3% de sacarosa, resuspendieron en una solución de lisozima (3 mg mL⁻¹ de lisozima en 0.3 M de sacarosa, 25 mM Tris pH 8, 25 mM EDTA pH 8), e incubaron a 37°C por 30 min. Antes de la incubación por 15 min a 42 °C se añadió proteinasa K (20 mg mL⁻¹). Luego, las células se lisaron al añadir SDS al 2 % y agitando por 5 min hasta completar la lisis. Después de añadir fenol neutral y cloroformo, los tubos se agitaron gentilmente hasta obtener una coloración blanca uniforme. Luego de centrifugar, la capa superior se transfirió a una disolución de acetato de sodio 3M a pH=6 e isopropanol. Los tubos se mezclaron hasta observar la aparición del ADN. El pellet de ADN se extrajo, el supernadante se removió y el pellet se resuspendió en TE con RNasaA (0.2 mg mL⁻¹). Los tubos se incubaron por 10 min a 28 °C antes de añadir una solución de CTAB/NaCI 5M. A continuación, los tubos se incubaron por 10 min a 55 °C y enfriaron a 28 °C. Seguidamente se añadió triclorometano, se agitaron los tubos gentilmente y se incubaron por 10 min a 28 °C. La capa superior se transfirió a un nuevo tubo y se extrajo nuevamente con fenol y cloroformo, seguido se extrajo con cloroformo y se precipitó con acetato de sodio 3 M a pH=6 e isopropanol. Luego, el pellet se lavó en etanol al 70% y se resuspendió en agua. La calidad del ADN se comprobó a través de electroforesis y espectrofotometría. La biblioteca de ADN se preparó siguiendo el XL+ *Rapid Library Preparation Method Manual* (Roche 454 Life Sciences), seguido de secuenciación en un secuenciador genómico Roche 454 Life Sciences GS FLX+ en el *Farncombe Metagenomics Facility, McMaster University*. El ensamblaje "*denovo*" del genoma se realizó con el software Spades v3.11.0 (56).

2.8 Análisis del gen del ARNr 16S

El análisis del gen del ARNr 16S se realizó a partir del ADN genómico de la cepa Jnb1, para su identificación se efectuó una búsqueda utilizando los primers F27 y R1492 (57). La secuencia del gen del ARNr 16S se sometió a análisis con BLASTn frente a la base de datos existente en el NCBI y el algoritmo RDP para identificar las secuencias cercanas relacionadas y el máximo puntaje de similitud resultó para *Streptomyces racemochromogenes* strain NRRL B-5430 con identidad de secuencia de 99.7 % (58, 59).

2.9 Análisis del clúster de genes del compuesto antifúngico

Para identificar el clúster de genes biosintéticos del polieno en Streptomyces racemochromogenes Jnb1, se realizó una búsqueda para PKSs modulares en la secuencia genómica. Se identificó un clúster de 117 828 pb, compuesto de ocho marcos de lectura de PKS completos y uno incompleto debido al ensamblaje truncado del contig 27 N-terminal. La predicción de los dominios se realizó con antiSMASH (60) y HMMer frente a la base de datos Pfam (61, 62). Los dominios aciltransferasa, cetorreductasa y dehidratasa identificados se alinearon con Clustal Omega, ClustalW y MAFTT, y se anotaron con Jalview (63). La funcionalidad de los dominios se basó en las predicciones de antiSMASH y lo reportado en la literatura. El sustrato cargado por cada dominio aciltransferasa se determinó basándose en la presencia de los motivos HAFH o YASH para malonil-CoA o metilmalonil-CoA, respectivamente, en el sitio de acción. Los dominios KR se clasificaron basándose en el alineamiento múltiple de los residuos de las regiones LDD, catalítica y "lid" y su funcionalidad en una mutación del residuo catalítico conservado tirosina por uno glutamina. Para el análisis de los dominios dehidratasa se evaluaron los motivos activos GYXYGPXF,

DXXXQ/H, y LPFXW. Para el análisis del dominio tioesterasa, la secuencia de la tioesterasa se alineó con tioesterasas conocidas para eritromicina, nistatina y ECO-02301. La similitud de la secuencia se visualizó mediante la construcción de un árbol filogenético usando Seaview (64). La búsqueda de la región faltante identificó una región en el contig 54, con alguno de los módulos no presentes en el contig 27. Todo el análisis bioinformático permite conocer la estructura parcial del polieno antifúngico detectado en los ensayos de bioactividad y espectrometría de masa.

2.10 Minería genómica y análisis de los metabolitos secundarios

El análisis de los metabolitos secundarios codificados a nivel genómico para *Streptomyces racemochromogenes* Jnb1 se realizó con el software antiSMASH 5 (60). Los archivos FASTA del "draft" genoma se analizaron con la versión online con la severidad de detección `*relaxed*' y `*loose*' con los cambios `-KnownClusterBlast', `-ClusterBlast' y `-SubClusterBlast'. El "draft" genoma de *Streptomyces racemochromogenes* Jnb1 también se analizó con PRISM (con todos los ajustes avanzados activados; límite de estructura 50; ventana 10 000pb). A las secuencias traducidas inferidas por el software antiSMASH se les realizó BLASTp y se tomó la mejor similitud con el menor E-*value* y el mayor porcentaje de similitud para los genes estudiados.

Capítulo III

Resultados y Discusión

CAPÍTULO III: RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Aislamiento de actinomicetos a partir de muestras de suelo

A partir de las 12 muestras se aislaron y purificaron más de 450 microorganismos con características morfológicas de microorganismos de la clase Actinobacteria: Gram positivos, esporulados y presencia de micelios aéreos y de sustrato, rasgos que presentan los actinomicetos (65). Las colonias aisladas en un inicio pudieron tener una apariencia suave, pero más tarde desarrollaron micelios aéreos con apariencia polvorosa, granulosa o aterciopelada. El color del micelio aéreo y de sustrato varió desde blanco, amarillo y gris a violeta, rosado y negro. Además, se observó la formación de pigmentos difusibles alrededor de varias colonias.

3.2 Actividad antimicrobiana. Tamizaje primario y secundario

Un total de 35 actinomicetos de los 450 aislados mostraron actividad antibacteriana frente a *E. coli* $\Delta bamB\Delta tolC$, mutante doble de proteínas de bomba de eflujo con una mayor penetrabilidad de moléculas pequeñas a través de la membrana (**Tabla 3.1**).

Tabla 3.1. Actividad antibacteriana de los actinomicetos frente a *Escherichia Coli* Δ*bamB*Δ*tolC*. Jnb: Jardín Botánico, Trq: Pico Turquino, Pvñ: Pinar Viñales, Ptr: Pinar Terrazas, Vrd: Varadero, Rqe: Rancho Querete.

Сера	E. coli	Сера	E. coli	Сера	E. coli		
	∆bamB∆tolC		∆bamB∆tolC		∆bamB∆tolC		
	(mm)		(mm)		(mm)		
Jnb1	13	Jnb10	12	Pvñ298	15		
Jnb2	16	Jnb11	12	Pvñ307	13		
Jnb3	9	Jnb12	13	Ptr148	13		
Jnb4	9	Trq23rfp	17	Vrd5M	11		
Jnb5	17	Trq27rfp	17	Vrd11	10		
Jnb6	15	Trq198	14	Rqe152	10		
Jnb7	21	Trq230	16	Rqe15M	10		

Jnb8	12	Pvñ240	20	Rqe1Dch	14
Jnb9	21	Pvñ253	19		

La capacidad de síntesis de nuevas entidades químicas por los actinomicetos develadas mediante el uso de herramientas bioinformáticas se ha visto obstaculizada por la presencia de clúster de genes biosintéticos ampliamente distribuidos en estos microorganismos, los cuales interfieren en los ensavos de purificación guiada por actividad. Por lo que el uso de nuevas técnicas y herramientas de alta eficacia permite la derreplicación de los compuestos interferentes (66); mientras conducen a la detección de compuestos con baja frecuencia de producción. En este estudio se utilizó la ARP para la derreplicación de los actinomicetos aislados. La derreplicación de los actinomicetos utilizando la ARP determinó que 35 cepas (7.8 %) del total de los microorganismos aislados presentó actividad antibacteriana y 4 cepas (11 % con respectos a los 35 actinomicetos con actividad) presentaron actividad frente a la batería de E. coli resistentes (Tabla 3.2). Mientras que 31 cepas al ser enfrentadas a la ARP produjeron antibióticos conocidos, tales como streptotricina, polimixina y streptomicina; lo cual ratifica que estos antibióticos son moléculas antibacterianas producidas comúnmente por los actinomicetos (67), y corrobora la capacidad derreplicativa de la ARP (49).

Tabla 3.2. Tamizaje secundario. **A**. Actividad antibacteriana de los actinomicetos con actividad biológica en el tamizaje primario frente a la Plataforma de Resistencia a los Antibióticos. **B**. Ensayo de derreplicación de los actinomicetos candidatos.

	E. coli (halo de inhibición en mm)																	
Cepa actino	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
	uvrA	uph	fosA	blaNDM	mcr- 1	STAT	Tet(A)	CAT	apmA	aph- (3´´)	rmtB	aph(9)	vatD	ermC	arr	WT	ΔΤΔΒ	fhuB
Jnb1	13	13	13	13	10	13	13	13	13	13	13	13	13	17	15	9	13	13
Trq27	15	16	17	15	19	19	19	15	14	21	14	14	19	21	23	17	22	16
Ptr148	13	13	13	14	13	14	14	13	14	14	14	14	14	20	17	12	13	14
Trq298	14	13	14	14	14	13	18	15	14	14	14	14	16	14	14	14	13	14

В



3.3 Determinación de la actividad antifúngica

Las pruebas de sensibilidad de los cuatro actinomicetos líderes frente a levaduras determinaron que uno de los actinomicetos, la cepa Jnb1 presentó actividad frente a *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida albicans* y *Cryptococcus neoformans*. La CIM presentada por el compuesto antifúngico frente a *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida albicans* y *Cryptococcus neoformans* fue de 16 µg mL⁻¹, 32 µg mL⁻¹ y 8 µg mL⁻¹ respectivamente (**Figura 3.1**).



Α

Figura 3.1. Ensayo de la Concentración Inhibitoria Mínima para el compuesto antifúngico producido por la cepa Jnb1 realizado en el medio RPMI 1640 con diluciones dobles seriadas frente a diversas especies fúngicas. El crecimiento se midió mediante densidad óptica a 600 nm (OD₆₀₀). *S. cerev. = Saccharomyces cerevisiae, C. albic. = Candida albicans, C. neof. = Cryptococcus neoformans.*

3.4 Caracterización de los aislados

Los detalles de las características morfológicas, bioquímicas y fenotípicas de la cepa seleccionada son mostrados en las tablas 3.3 y 3.4. La cepa Jnb1 creció en todos los medios de cultivo utilizados. Se observó un crecimiento abundante en PDA, Agar Czapek e ISP5; buen crecimiento en agar nutriente, ISP1 e ISP2 y crecimiento moderado en ISP3 (Tabla 3.3). El color de las colonias de la cepa Jnb1 varió desde rosado, blanco-rosado, blanco amarillo y rojo ladrillo en dependencia del tipo de medio usado (Figura Suplementaria 3 y Tabla 3.3). Esta cepa no produjo pigmento difusible en el medio de cultivo, además la tinción de Gram mostró ser una bacteria Gram positiva. La cepa Jnb1 tuvo un crecimiento abundante en fuentes de nitrógeno, característico de bacterias con alto metabolismo de nitrógeno, sin embargo, no creció a las concentraciones de NaCl suplementadas (5, 7 y 10%), resultado esperado ya que fue aislada del suelo (Tabla 3.3). Sivakumar (68) reportó que estas características pueden ser usadas como marcadores mediante los cuales una cepa individual puede ser reconocida. Estos resultados revelan que este microorganismo está relacionado con el género Streptomyces (69, 70).

Medio de cultivo	Color micelio aéreo	Crecimiento
PDA	Rosado	+++
Agar Czapek	Rosado	+++
Agar Nutriente	Rosado	++
ISP1	blanco-rosado	++
ISP2	blanco-rosado	++
ISP3	blanco-amarillo	+
ISP5	rojo ladrillo	+++

Tabla 3.3. Características culturales del crecimiento de la cepa de actinomiceto Jnb1 en diferentes medios de cultivo y tolerancia a NaCI.

-, No crecimiento; +, crecimiento moderado; ++, buen crecimiento; +++, abundante crecimiento.

La **Tabla 3.4** muestra que la cepa Jnb1 puede utilizar diferentes fuentes de carbono y nitrógeno, donde se observa abundante crecimiento en fuentes ricas de nitrógeno como lo son la peptona y el extracto de levadura. Mientras que las pruebas de utilización de fuentes de carbonos, muestra que Jnb1 presenta un crecimiento moderado en azúcares simples y disacáridos como lo son la ribosa, maltosa y sacarosa. Los actinomicetos son considerados microorganismos saprófitos, y en particular el género *Streptomyces*, al especializarse en la degradación de compuestos con mayor complejidad estructural que los azúcares de bajo peso molecular (71).

Características Bioquímicas							
Tinción de Gram	Gram(+)						
Catalasa	+						
Oxidasa	+						
Urea	+						
Citrato	+						
Voges Proshauer	-						
Rojo metilo	-						
Motilidad	-						
Indol	-						
Prod. de H₅S	-						
Prod. de glucosa	-						
Red. de nitrato	+						
Hidrólisis gelatina	-						
Hidrólisis caseína	-						
Hidrólisis almidón	-						
Utilización de fuentes de nitrógeno							
Extracto de levadura	+++						
Peptona	+++						
(NH4)2SO4	+++						

Utilización de fuentes de ca	rbono
Xylosa	+
Manosa	+
Fucosa	+
D-ribosa	+
Galactosa	+
Arabinosa	+
Manitol	+
Sacarosa	+
Maltosa	+
Concentración de NaCI (%)
Sin NaCl	+
5	-
7	-
10	-

-, No crecimiento; +, buen crecimiento; ++, crecimiento moderado; +++, abundante crecimiento.

La secuencia del gen del ARNr 16S de la cepa Jnb1 presentó gran similitud con *Streptomyces racemochromogenes* strain NRRL B-5430 con identidad de secuencia del 99.7% (**Figura 3.2**).

NR_C	IR_043499.1:01497 Streptomyces racemochromogenes strain NRRL B-5430 16S ribosomal RNA, partial sequence															
1		100	200	300	400	500	600	700	800	900	1 K	1,100	1,200	1,300	1,400	1,497
Sequ	ence															
Cons			_		_	_		_						_	-	
Gene	5															
«	>		>	\rightarrow		>	rRNA	-16S ribosoma	I RNA	>		\rightarrow	\rightarrow			×
(U) B	LASTI	Results for:	Actinomyces	s Jnb1 16S r	RNA											
								Query_18579								
				_				>	_							

Figura 3.2. Alineamiento por pares del ARNr 16S de la cepa Jnb1 versus al gen del ARNr 16S de *Streptomyces racemochromogenes* strain NRRL B5430 utilizando BLASTn. Las líneas rojas representan falta de coincidencia; mientras que las líneas azules representan vacío en una posición específica.

3.5 Determinación del antibiótico producido por la cepa Jnb1.

Análisis del BGC para la congocidina

La fermentación de *Streptomyces racemochromogenes* Jnb1 seguido de purificación guiada por actividad biológica reveló la producción de un compuesto con m/z de 431.16 ppm y UV máximos a 240 y 298 nm. El análisis del espectro de alta resolución (HR-MS) mostró los picos de fragmentación 216.30, 361.2 y 431.16, los cuales presentan similitud con la fragmentación característica del antibiótico congocidina (**Figura 3.3**). Con la finalidad de corroborar la identidad estructural del compuesto se realizó el análisis del espectro de ¹H-RMN, el cual confirmó que el antibiótico producido es congocidina (también conocido como netropsina) (**Figura Suplementaria 4**).



Figura 3.3. Análisis mediante HPLC-EMS del antibiótico congocidina. Fragmentación de congocidina en sus principales iones (parte superior) y espectro ultravioleta-visible (parte inferior).

Congocidina es una molécula pequeña con actividad antiviral, antibacteriana y antitumoral perteneciente a la familia de las oligo-pirrolamidas, las cuales contienen uno o varios pirrol-2-carboxamidas. Este grupo de compuesto posee actividad antiviral (72), antibacteriana (73), antihelmíntica (74) y antitumoral (75, 76), dicha actividad se debe a su mecanismo de acción, ya que posee la habilidad de unirse no covalentemente en el ADN en regiones ricas en las bases A-T, específicamente en la curvatura menor de estas regiones. Además, la combinación en la misma formulación de congocidina y polimixina B presentó actividad sinérgica frente a patógenos multirresistentes aislados de la clínica como Acinetobacter Baumanni (77). La síntesis de pirrolamidas en Streptomyces ha sido estudiada sobre todo en las especies Streptomyces netropsis y Streptomyces ambofaciens. pero su producción en Streptomyces racemochromogenes no ha sido reportada incluso cuando los BGCs se encuentran ampliamente distribuidos en Streptomyces debido a la elevada transferencia horizontal de estos clústeres en este género (78).

La detección del BGC para congocidina se realizó mediante el software antiSMASH. En el contig 33 se encontró una región con 27 928 pb de extensión

con 100% de similitud con el BGC para congocidina de *Streptomyces ambofaciens* ATCC 23877 (**Figura 3.4**). Para la anotación de los genes dentro del BGC en el contig 33 se concatenó la traducción de cada gen en una sola secuencia y se comparó con los genes anotados por Juguet M. *et al.* (79) utilizando BLASTp. El análisis mostró que todas las proteínas tienen un homólogo codificado con los genes SAMR0900 a SAMR09021 de *Streptomyces ambofaciens* ATCC 23877 (**Tabla Suplementaria 1**); así como una alta sintenía dentro del clúster con respecto a *Streptomyces ambofaciens* ATCC 23877.



Figura 3.4. Comparación entre el BGC para congocidina en *Streptomyces racemochromogenes* cepa Jnb1 y el clúster de referencia MIBiG BGC0000327 (*Streptomyces ambofaciens* ATCC 23877) usando ClusterBLAST generado por antiSMASH.

Es importante destacar que el clúster de congocidina presenta algunas características peculiares. Primeramente, la síntesis del pirrol en la familia de las pirrolamidas transcurre por un mecanismo diferente a otros pirroles en otras moléculas de productos naturales; el precursor 4-acetamidopirrol-2-carboxilato se obtiene a partir de NTP-N-acetil glucosamina en un mecanismo en el cual intervienen 7 enzimas que participan en una descarboxilación, una ciclación mediante la formación de la 2,3 dihidropirrolidina y su posterior deshidroxilación (80, 81). En segundo lugar, la reacción de condensación la realiza una proteína autónoma y ocurre iterativamente, en donde para activar el grupo amino es necesario que ocurra su desacetilación por la enzima amidohidrolasa (82).

3.6 Análisis estructural del compuesto antifúngico. Minería genómica del BGC del compuesto antifúngico

El extracto obtenido de la fermentación de *Streptomyces racemochromogenes* Jnb1 mostró actividad antifúngica frente a *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida albicans* y *Cryptococcus neoformans*. El espectrofotograma obtenido durante el proceso de purificación por HPLC-UV del compuesto antifúngico reveló un pico con tiempo de retención igual a 5.53 min con patrón característico, UV máximos a 318, 332 y 350 nm, similar al presentado por compuestos del tipo polieno, con un grupo cromóforo de cuatro o más dobles enlaces deslocalizados (**Figura 3.5A**).





Figura 3.5. Análisis mediante HPLC-UV e ESI-MS del antifúngico tipo polieno. **A**. Cromatograma y espectro ultravioleta visible obtenido durante el proceso de purificación. **B**. Espectro de alta resolución obtenido mediante ionización por electrospray (ESI-HR-MS) del antifúngico tipo polieno.

El patrón de absorbancia entre 250-450 nm para antifúngicos polienos muestra que el compuesto con picos en 318, 332 y 350 nm presenta un corrimiento hacia la derecha comparado con el patrón para polienos tetraenos (ej. nistatina) y un corrimiento hacia la izquierda comparado con el patrón para polienos heptaenos (ej. anfotericina B), lo cual indica que el compuesto producido por la cepa Jnb1 presenta cinco o seis doble enlaces conjugados. El espectro de alta resolución del compuesto presentó picos base de m/z 1125.36 y 1123.44 (**Figura 3.5B**). Una búsqueda realizada en bases de datos, como el Diccionario de Productos Naturales, con las masas detectadas en el espectro anterior y los máximos del espectro-UV como consulta, no identificó ningún compuesto con dichas especificaciones; lo que indica que el compuesto antifúngico producido por la cepa Jnb1 es un compuesto nuevo.

Los polienos son sintetizados por PKS tipo-I modulares o en combinación con PKS iterativas, en su mayoría los clústeres de genes presentan un gran número de ORFs y genes accesorios encargados de decorar la estructura policétida principal. Con el objetivo de identificar el BGC productor del compuesto antifúngico se realizó una búsqueda para PKSs modulares en la secuencia genómica de la cepa Jnb1. El estudio de minería genómica identificó un clúster de 117 828 pb en el contig 27, compuesto de ocho marcos de lectura de PKS completos y uno incompleto debido al ensamblaje truncado en el extremo N-terminal (**Figura 3.6**); además no se detectó otro BGC con la capacidad de ensamblaje necesaria para sintetizar el polieno.



Figura 3.6. Clúster de nueve secuencias codificantes (CDS) en el contig 27 identificadas con antiSMASH, PRISM y analizadas con HMMer y BLASTp que presentan similitud con PKSs tipo-I.

Las nueve secuencias codificantes presentan igual direccionalidad dentro del contig, por lo que se aplicó el principio de colinearidad en la predicción del metabolito sintetizado. Se identificaron un total de 103 dominios comprendidos en 22 módulos. Para la predicción del sustrato cargado por cada aciltransferasa se alinearon las secuencias de los dominios AT usando el algoritmo CLUSTALW y determinaron basándose en la presencia de los motivos HAFH o YASH para malonil-CoA o metilmalonil-CoA, respectivamente, en el sitio de acción (83). El análisis de dominios aciltransferasa mostró que los dominios 20, 21 y 22 cargan metilmalonil-CoA, mientras que los restantes lo hacen para malonil-CoA (Figura **3.7A).** La clasificación de los dominios cetorreductasa basada en los patrones de las regiones LDD, catalítica y "lid" (28) identificó un dominio KR inactivo tipo C1 en la CDS 27_6 debido a una mutación del residuo catalítico conservado tirosina por uno glutamina. El resto de los dominios cetorreductasas activos se clasificaron en su mayoría como tipo-B por variaciones en el motivo conservado LDD en el sitio activo acompañado del residuo triptófano en la región catalítica, además se identificaron dos dominios tipo-A (Figura 3.7B). Todos los dominios DH presentaron los residuos catalíticos tirosina e histidina (Figura **Suplementaria 5**), por lo que se consideraron activos (84).







También se identificó un dominio enoilreductasa activa en la CDS 27_7. El MSA de los dominios TE mostró que el dominio tioesterasa en el ctg27_1 cataliza la hidrólisis del acilo unido al ACP para formar el producto lineal (**Figura 3.8A y B**). La estereoquímica propuesta se basó en el estudio estructural *in silico* de cada dominio (**Figura 3.8B**).





Figura 3.8. Esquema del ensamblaje del compuesto antifúngico. **A**. La PKS presente en el ctg27 del polieno está compuesto de 22 módulos y 103 dominios. **B**. Estructura de la región del polieno sintetizada en los módulos presentes en el ctg27.

Una región en el contig54 se identificó como la posible secuencia faltante en uno de los extremos de la PKS descrita anteriormente. Esta secuencia mostró similitud frente otros BGCs que sintetizan polienos (**Figura Suplementaria 6**); así como una secuencia codificante truncada para PKS (**Figura 3.9**), pero es necesario más datos que corroboren la coordinación entre la PKS del ctg27 y la del ctg54.



Figura 3.9. Región del contig 54 con similitud a BGC de polienos (ej. nistatina, ibomicina, ECO-02301).

3.7 Capacidad codificante de metabolitos secundarios de la cepa Jnb1

Un total de 142 contigs representativos del genoma de la cepa Jnb1 se obtuvieron después de la secuenciación y ensamblaje de este. La especie *Streptomyces racemochromogenes*, se encuentra entre los productores de antibióticos más ricos del orden Actinomicetales (85). El análisis con el software antiSMASH reveló que esta cepa codifica para 14 metabolitos secundarios localizados en diferentes

contigs y con diferente porciento de similitud con metabolitos conocidos (**Tabla 3.5**). Estos incluyen sideróforos, péptidos antimicrobianos, terpenos, antibacterianos y antifúngicos.

El análisis genómico confirmó además que la cepa Jnb1 no codifica para ninguno de los grupos farmacológicos representados en la plataforma ARP, lo cual avala su utilidad en la derreplicación inicial de los actinomicetos aislados.

Además del antibiótico congocidina, el cual se conoce interactúa con la curvatura menor del ADN (86), y del nuevo agente poliénico, el genoma de la cepa de *Streptomyces racemochromogenes* codifica para otros potenciales nuevos antibióticos. El contig 12 codifica un metabolito que solo comparte similitud con el 72 % de los genes de Mayamycin B, compuesto con actividad antimicrobiana contra varios microorganismos patógenos (87). Los compuestos fenacínicos codificados en los contigs 23 y 56 con porcientos de similitud de 22 % y 68 % son igualmente potenciales candidatos, ya que su actividad antimicrobiana ha sido previamente demostrada (88).

Número	Contig	Compuesto con mayor similitud	Tipo o actividad
		(%)	biológica
1	9	Hopeno B (61%)	Terpeno
2	12	Mayamicina B (72%)	Antibiótico
3	19	Feganomicina (57%)	Péptido
4	20	Isorenierateno (87%)	Terpeno
5	23	Fenazina (22%)	Fenazina
6	24	Lactazole (55%)	Tiopéptido
7	24	Siderophore (72%)	Sideróforo
8	25	Desferrioxamine B (100%)	Sideróforo
9	27	Halstoctacosanolide (77%)	Macrolactona
10	33	Congocidina (100%)	Antibiótico
11	49	Lipstatin (64%)	B-lactona
12	52	Venezuelin (100%)	Lantibiótico
13	54	ECO-02301 (32%)	Antifúngico
14	56	Esmeraldina (68%)	Fenazina

 Tabla 3.5.
 Clúster de genes biosintéticos identificados en la cepa Jnb1.

Las proteínas del BGC identificado en el contig 56 se analizaron individualmente con BLAST y se encontró que todas las proteínas esenciales del BGC para la síntesis del antibiótico esmeraldina (compuesto que pertenece a la familia de las fenacinas), esmA1-esmH2, presentan una proteína homóloga en el clúster presente en el contig 56. Además, se encontró que el BGC para el compuesto fenacínico en el genoma de la cepa Jnb1 se encuentra interrumpido por tres secuencias codificantes consecutivas no descritos en los BGCs para las fenacinas (Figura 3.10). Con el objetivo de identificar los tres genes insertados en el clúster se realizó el alineamiento de las secuencias con BLAST. Las secuencias insertadas mostraron un alto porcentaje de identidad (<60 % y Evalue >10⁻⁶⁵) con los genes albA, albB y albC. Los tres genes codifican para proteínas encargados de la síntesis de compuestos pertenecientes al grupo de los ciclodipéptidos (89, 90). Los ciclodipéptidos son compuestos sintetizados por ciclodipeptasas dependientes de ARNt (91), por lo que la inserción de estos genes en el PKS tipo-II de la fenazina podría indicar la síntesis de un metabolito híbrido; aunque son necesarios otros estudios para confirmar esta hipótesis.



Figura 3.10. Inserción de los genes albA, albB y albC en el BGC para la esmeraldina.

Durante el análisis de minería genómica también se encontró el BGC para un clúster de sintetasas no ribosomales críptico (**Figura 3.11**).



Figura 3.11. Descripción del BGC críptico en el ctg28.

El alineamiento de los genes para las cuatro NRPSs que conforman el BGC en el contig 28 presentó analogía con un BGC en *Streptomyces sp.* Mg1, pero su caracterización no ha sido descrita (92). Estos resultados muestran el potencial biosintético de *Streptomyces racemochromogenes* Jnb1.

Conclusiones

CONCLUSIONES

- Se aisló una cepa líder de actinomiceto con similitud a Streptomyces racemochromogenes con actividad antibacteriana frente a nuestra plataforma derreplicativa y con actividad antifúngica frente a varias especies de levaduras.
- Streptomyces racemochromogenes cepa Jnb1 produce el antibiótico congocidina y un compuesto antifúngico del tipo polieno cuya estructura química no se ha descrito.
- Los estudios de minería genómica revelaron que Streptomyces racemochromogenes cepa Jnb1 posee BGCs para una amplia variedad de compuestos farmacológicos; además se halló un BGC híbrido entre una PKS tipo-II y una ciclodipeptasa dependientes de ARNt. También, se identificó un BGC críptico que sintetiza para un péptido no-ribosomal.

Recomendaciones

RECOMENDACIONES

- > Determinar la estructura del compuesto antifúngico tipo polieno.
- Caracterizar el BGC híbrido y el críptico mediante técnicas de biología sintética.

Referencias Bibliográficas

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Ren H, Shi C, Zhao H. Computational tools for discovering and engineering natural product biosynthetic pathways. Iscience. 2020;23(1):100795.

2. Scherlach K, Hertweck C. Mining and unearthing hidden biosynthetic potential. Nature Communications. 2021;12(1):1-12.

3. Nielsen KF, Månsson M, Rank C, Frisvad JC, Larsen TO. Dereplication of microbial natural products by LC-DAD-TOFMS. Journal of natural products. 2011;74(11):2338-48.

4. Crits-Christoph A, Diamond S, Butterfield CN, Thomas BC, Banfield JF. Novel soil bacteria possess diverse genes for secondary metabolite biosynthesis. Nature. 2018;558(7710):440-4.

5. Metzker M. Nat Rev Genet. Sequencing technologies-the next generation. 2010;11(1):31-46.

6. Navarro-Muñoz JC, Selem-Mojica N, Mullowney MW, Kautsar SA, Tryon JH, Parkinson EI, et al. A computational framework to explore large-scale biosynthetic diversity. Nature chemical biology. 2020;16(1):60-8.

7. Medema MH, Fischbach MA. Computational approaches to natural product discovery. Nature chemical biology. 2015;11(9):639-48.

8. Andersen KG, Rambaut A, Lipkin WI, Holmes EC, Garry RF. The proximal origin of SARS-CoV-2. Nature medicine. 2020;26(4):450-2.

9. Spivak ES, Hanson KE. Candida auris: an emerging fungal pathogen. Journal of Clinical Microbiology. 2018;56(2):e01588-17.

10. Jensen PR, Gontang E, Mafnas C, Mincer TJ, Fenical W. Culturable marine actinomycete diversity from tropical Pacific Ocean sediments. Environmental microbiology. 2005;7(7):1039-48.

11. Yamada Y, Kuzuyama T, Komatsu M, Shin-Ya K, Omura S, Cane DE, et al. Terpene synthases are widely distributed in bacteria. Proceedings of the National Academy of Sciences. 2015;112(3):857-62.

12. Pivokonsky M, Kopecka I, Cermakova L, Fialova K, Novotna K, Cajthaml T, et al. Current knowledge in the field of algal organic matter adsorption onto activated carbon in drinking water treatment. Science of The Total Environment. 2021:149455.

13. Gurung TD, Sherpa C, Agrawal VP, Lekhak B. Isolation and characterization of antibacterial actinomycetes from soil samples of Kalapatthar, Mount Everest Region. Nepal Journal of science and Technology. 2009;10:173-82.

14. Hakvåg S, Fjærvik E, Josefsen KD, Ian E, Ellingsen TE, Zotchev SB. Characterization of Streptomyces spp. isolated from the sea surface microlayer in the Trondheim Fjord, Norway. Marine Drugs. 2008;6(4):620-35.

15. Gao B, Gupta RS. Phylogenetic framework and molecular signatures for the main clades of the phylum Actinobacteria. Microbiology and molecular biology reviews. 2012;76(1):66-112.

16. Singh LS, Sharma H, Talukdar NC. Production of potent antimicrobial agent by actinomycete, Streptomyces sannanensis strain SU118 isolated from phoomdi in Loktak Lake of Manipur, India. BMC microbiology. 2014;14(1):1-13.

17. Chaudhary AK, Dhakal D, Sohng JK. An insight into the "-omics" based engineering of streptomycetes for secondary metabolite overproduction. BioMed research international. 2013;2013.

 Jakubiec-Krzesniak K, Rajnisz-Mateusiak A, Guspiel A, Ziemska J, Solecka J. Secondary metabolites of actinomycetes and their antibacterial, antifungal and antiviral properties. Polish journal of microbiology. 2018;67(3):259.
 De Simeis D, Serra S. Actinomycetes: A Never-Ending Source of Bioactive Compounds—An Overview on Antibiotics Production. Antibiotics.

2021;10(5):483.

20. Ait Barka E, Vatsa P, Sanchez L, Gaveau-Vaillant N, Jacquard C, Klenk H. The Actinobacteria: taxonomy, physiology and their natural products. Microbiol Mol Biol Rev. 2016;80:1-43.

21. Kurnianto MA, Kusumaningrum HD, Lioe HN. Characterization of Streptomyces isolates associated with estuarine fish Chanos chanos and profiling of their antibacterial metabolites-crude-extract. International Journal of Microbiology. 2020;2020.

22. Wei Y, Zhao Y, Zhou D, Qi D, Li K, Tang W, et al. A newly isolated Streptomyces sp. YYS-7 with a broad-spectrum antifungal activity improves the banana plant resistance to Fusarium oxysporum f. sp. cubense tropical race 4. Frontiers in microbiology. 2020;11:1712.

23. Procópio REdL, Silva IRd, Martins MK, Azevedo JLd, Araújo JMd. Antibiotics produced by Streptomyces. Brazilian Journal of Infectious Diseases. 2012;16(5):466-71.

24. Newman DJ, Cragg GM. Natural products as sources of new drugs over the nearly four decades from 01/1981 to 09/2019. Journal of natural products. 2020;83(3):770-803.

25. Walsh CT, Fischbach MA. Natural products version 2.0: connecting genes to molecules. Journal of the American Chemical Society. 2010;132(8):2469-93.

26. DE C. Walsh CT. Khosla C. Science. 1998;282:63.

27. Nguyen T, Ishida K, Jenke-Kodama H, Dittmann E, Gurgui C, Hochmuth T, et al. Exploiting the mosaic structure of trans-acyltransferase polyketide synthases for natural product discovery and pathway dissection. Nature biotechnology. 2008;26(2):225-33.

28. Keatinge-Clay AT. A tylosin ketoreductase reveals how chirality is determined in polyketides. Chemistry & biology. 2007;14(8):898-908.

29. Zhang L, Ji J, Yuan M, Feng Y, Wang L, Deng Z, et al. Stereospecificity of enoylreductase domains from modular polyketide synthases. ACS chemical biology. 2018;13(4):871-5.

30. Schwarzer D, Finking R, Marahiel MA. Nonribosomal peptides: from genes to products. Natural product reports. 2003;20(3):275-87.

31. Stachelhaus T, Mootz HD, Marahiel MA. The specificity-conferring code of adenylation domains in nonribosomal peptide synthetases. Chemistry & biology. 1999;6(8):493-505.

32. Rausch C, Weber T, Kohlbacher O, Wohlleben W, Huson DH. Specificity prediction of adenylation domains in nonribosomal peptide synthetases (NRPS) using transductive support vector machines (TSVMs). Nucleic acids research. 2005;33(18):5799-808.

33. Wilson MC, Mori T, Rückert C, Uria AR, Helf MJ, Takada K, et al. An environmental bacterial taxon with a large and distinct metabolic repertoire. Nature. 2014;506(7486):58-62.

34. Medema MH, Blin K, Cimermancic P, De Jager V, Zakrzewski P, Fischbach MA, et al. antiSMASH: rapid identification, annotation and analysis of secondary metabolite biosynthesis gene clusters in bacterial and fungal genome sequences. Nucleic acids research. 2011;39(suppl_2):W339-W46.

35. Blin K, Shaw S, Kloosterman AM, Charlop-Powers Z, van Wezel GP, Medema MH, et al. antiSMASH 6.0. Nucleic acids research. 2021.

36. Weber T, Rausch C, Lopez P, Hoof I, Gaykova V, Huson D, et al. CLUSEAN: a computer-based framework for the automated analysis of bacterial secondary metabolite biosynthetic gene clusters. Journal of biotechnology. 2009;140(1-2):13-7.

37. Yadav G, Gokhale RS, Mohanty D. Computational approach for prediction of domain organization and substrate specificity of modular polyketide synthases. Journal of molecular biology. 2003;328(2):335-63.

38. Minowa Y, Araki M, Kanehisa M. Comprehensive analysis of distinctive polyketide and nonribosomal peptide structural motifs encoded in microbial genomes. Journal of molecular biology. 2007;368(5):1500-17.

39. Cimermancic P, Medema MH, Claesen J, Kurita K, Brown LCW, Mavrommatis K, et al. Insights into secondary metabolism from a global analysis of prokaryotic biosynthetic gene clusters. Cell. 2014;158(2):412-21.

40. Baltz RH. Natural product drug discovery in the genomic era: realities, conjectures, misconceptions, and opportunities. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology. 2019;46(3-4):281-99.

41. Anand S, Prasad M, Yadav G, Kumar N, Shehara J, Ansari MZ, et al. SBSPKS: structure based sequence analysis of polyketide synthases. Nucleic acids research. 2010;38(suppl_2):W487-W96.

42. Caffrey P. Conserved amino acid residues correlating with ketoreductase stereospecificity in modular polyketide synthases. ChemBioChem. 2003;4(7):654-7.

43. Yadav G, Gokhale RS, Mohanty D. Towards prediction of metabolic products of polyketide synthases: an in silico analysis. PLoS computational biology. 2009;5(4):e1000351.

44. Skinnider MA, Johnston CW, Gunabalasingam M, Merwin NJ, Kieliszek AM, MacLellan RJ, et al. Comprehensive prediction of secondary metabolite structure and biological activity from microbial genome sequences. Nature Communications. 2020;11(1):1-9.

45. Skinnider MA, Dejong CA, Rees PN, Johnston CW, Li H, Webster AL, et al. Genomes to natural products prediction informatics for secondary metabolomes (PRISM). Nucleic acids research. 2015;43(20):9645-62.

46. Willett P. Similarity-based virtual screening using 2D fingerprints. Drug discovery today. 2006;11(23-24):1046-53.

47. Medema MH, Kottmann R, Yilmaz P, Cummings M, Biggins JB, Blin K, et al. Minimum information about a biosynthetic gene cluster. Nature chemical biology. 2015;11(9):625-31.

48. King AM, Reid-Yu SA, Wang W, King DT, De Pascale G, Strynadka NC, et al. Aspergillomarasmine A overcomes metallo- β -lactamase antibiotic resistance. Nature. 2014;510(7506):503.

49. Cox G, Sieron A, King AM, De Pascale G, Pawlowski AC, Koteva K, et al. A common platform for antibiotic dereplication and adjuvant discovery. Cell chemical biology. 2017;24(1):98-109.

50. Wiegand I, Hilpert K, Hancock RE. Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances. Nature protocols. 2008;3(2):163-75.

51. Humphries R, Bobenchik AM, Hindler JA, Schuetz AN. Overview of Changes to the Clinical and Laboratory Standards Institute Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing, M100. Journal of Clinical Microbiology. 2021:JCM. 00213-21.

52. Shirling ET, Gottlieb D. Methods for characterization of Streptomyces species. International journal of systematic bacteriology. 1966;16(3):313-40.

53. Kawato M, Shinobu R. A simple technique for the microscopical observation, memoirs of the Osaka University Liberal Arts and Education. Nat Sci. 1959;8:114-4.

54. Lakshmipathy DT, Kannabiran K. A morphological, biochemical and biological studies of halophilic Streptomyces sp. isolated from saltpan environment. American Journal of Infectious Diseases. 2009;5(3):200-6.

55. Murugamani V, Bharathi T, Jayaveera K. A New Antibiotic 105-SMp from Soil Screened Streptomyces species 105–SM. The Internet Journal of Microbiology. 2008;5(2).

56. Bankevich A, Nurk S, Antipov D, Gurevich AA, Dvorkin M, Kulikov AS, et al. SPAdes: a new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing. Journal of computational biology. 2012;19(5):455-77.

57. Monciardini P, Sosio M, Cavaletti L, Chiocchini C, Donadio S. New PCR primers for the selective amplification of 16S rDNA from different groups of actinomycetes. FEMS Microbiology Ecology. 2002;42(3):419-29.

58. Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ. Basic local alignment search tool. Journal of molecular biology. 1990;215(3):403-10.

59. Cole JR, Wang Q, Fish JA, Chai B, McGarrell DM, Sun Y, et al. Ribosomal Database Project: data and tools for high throughput rRNA analysis. Nucleic acids research. 2014;42(D1):D633-D42.

60. Blin K, Shaw S, Steinke K, Villebro R, Ziemert N, Lee SY, et al. antiSMASH 5.0: updates to the secondary metabolite genome mining pipeline. Nucleic acids research. 2019;47(W1):W81-W7.

61. Prakash A, Jeffryes M, Bateman A, Finn RD. The HMMER web server for protein sequence similarity search. Current protocols in bioinformatics. 2017;60(1):3.15. 1-3.. 23.

62. Finn RD, Mistry J, Tate J, Coggill P, Heger A, Pollington JE, et al. (2010): The Pfam protein families database. Nucleic Acids Res.38:D211-22.

63. Waterhouse AM, Procter JB, Martin DM, Clamp M, Barton GJ. Jalview Version 2—a multiple sequence alignment editor and analysis workbench. Bioinformatics. 2009;25(9):1189-91.

64. Gouy M, Guindon S, Gascuel O. SeaView version 4: a multiplatform graphical user interface for sequence alignment and phylogenetic tree building. Molecular biology and evolution. 2010;27(2):221-4.

65. Sylvia DM, Fuhrmann JJ, Hartel PG, Zuberer DA. Principles and applications of soil microbiology: Pearson Prentice Hall Upper Saddle River, NJ:; 2005.

66. Gaudêncio SP, Pereira F. Dereplication: racing to speed up the natural products discovery process. Natural product reports. 2015;32(6):779-810.

67. Baltz RH. Antimicrobials from actinomycetes: back to the future. Microbe-American Society For Microbiology. 2007;2(3):125.

68. Sivakumar K. Actinomycetes of an Indian mangrove (Pitchavaram) environment; an inventory Ph. D. D thesis, Annamalai University, India. 2001.

69. Cross T. Growth and examination of actinomycetes-some guidelines. Bergey's manual of systematic bacteriology. 1989;4:2340-3.

70. Lechevalier H. A practival guide to generic identification of actinomycetes. Bergey's manual of systematic bacteriology. 1989;4:2344-7.

71. Barka EA, Vatsa P, Sanchez L, Gaveau-Vaillant N, Jacquard C, Klenk H-P, et al. Taxonomy, physiology, and natural products of Actinobacteria. Microbiology and molecular biology reviews. 2016;80(1):1-43.

72. Lown JW. Lexitropsins in antiviral drug development. Antiviral research. 1992;17(3):179-96.

73. Finlay A, Hochstein F, Sobin B, Murphy F. Netropsin, a new antibiotic produced by a Streptomyces. Journal of the American Chemical Society. 1951;73(1):341-3.

74. Franco J, Scarone L, Comini MA. Novel distamycin analogues that block the cell cycle of African trypanosomes with high selectivity and potency. European journal of medicinal chemistry. 2020;189:112043.

75. Ouchi K, Miyachi M, Yagyu S, Kikuchi K, Kuwahara Y, Tsuchiya K, et al. Oncogenic role of HMGA2 in fusion-negative rhabdomyosarcoma cells. Cancer Cell International. 2020;20:1-10.

76. Kirschning A, Seedorf T, Solga D. Natural and Synthetic Oligoarylamidespriviledged structures for medical applications. Chemistry (Weinheim an der Bergstrasse, Germany). 2021.

77. Chung J-h, Bhat A, Kim C-J, Yong D, Ryu C-M. Combination therapy with polymyxin B and netropsin against clinical isolates of multidrug-resistant Acinetobacter baumannii. Scientific reports. 2016;6(1):1-11.

78. McDonald BR, Currie CR. Lateral gene transfer dynamics in the ancient bacterial genus Streptomyces. MBio. 2017;8(3):e00644-17.

79. Juguet M, Lautru S, Francou F-X, Nezbedová Š, Leblond P, Gondry M, et al. An iterative nonribosomal peptide synthetase assembles the pyrrole-amide antibiotic congocidine in Streptomyces ambofaciens. Chemistry & biology. 2009;16(4):421-31.

80. Walsh CT, Garneau-Tsodikova S, Howard-Jones AR. Biological formation of pyrroles: nature's logic and enzymatic machinery. Natural product reports. 2006;23(4):517-31.
81. Lautru S, Song L, Demange L, Lombès T, Galons H, Challis GL, et al. A Sweet Origin for the Key Congocidine Precursor 4-Acetamidopyrrole-2-carboxylate. Angewandte Chemie International Edition. 2012;51(30):7454-8.

82. Hao C, Huang S, Deng Z, Zhao C, Yu Y. Mining of the pyrrolamide antibiotics analogs in Streptomyces netropsis reveals the amidohydrolase-dependent "iterative strategy" underlying the pyrrole polymerization. PloS one. 2014;9(6):e99077.

83. Petković H, Sandmann A, Challis IR, Hecht H-J, Silakowski B, Low L, et al. Substrate specificity of the acyl transferase domains of EpoC from the epothilone polyketide synthase. Organic & biomolecular chemistry. 2008;6(3):500-6.

84. Gay D, You Y-O, Keatinge-Clay A, Cane DE. Structure and stereospecificity of the dehydratase domain from the terminal module of the rifamycin polyketide synthase. Biochemistry. 2013;52(49):8916-28.

85. Berdy J. Bioactive microbial metabolites. The Journal of Antibiotics. 2005;58(1):1.

86. Al-Mestarihi AH, Garzan A, Kim JM, Garneau-Tsodikova S. Enzymatic Evidence for a Revised Congocidine Biosynthetic Pathway. Chembiochem. 2015;16(9):1307-13. Epub 2015/05/08.

87. Bo ST, Xu ZF, Yang L, Cheng P, Tan RX, Jiao RH, et al. Structure and biosynthesis of mayamycin B, a new polyketide with antibacterial activity from Streptomyces sp. 120454. The Journal of Antibiotics. 2018;71(6):601-5.

88. Rui Z, Ye M, Wang S, Fujikawa K, Akerele B, Aung M, et al. Insights into a divergent phenazine biosynthetic pathway governed by a plasmid-born esmeraldin gene cluster. Chem Biol. 2012;19(9):1116-25.

89. Belin P, Moutiez M, Lautru S, Seguin J, Pernodet J-L, Gondry M. The nonribosomal synthesis of diketopiperazines in tRNA-dependent cyclodipeptide synthase pathways. Natural product reports. 2012;29(9):961-79.

90. Moutiez M, Schmitt E, Seguin J, Thai R, Favry E, Belin P, et al. Unravelling the mechanism of non-ribosomal peptide synthesis by cyclodipeptide synthases. Nature Communications. 2014;5(1):1-7.

91. Gondry M, Sauguet L, Belin P, Thai R, Amouroux R, Tellier C, et al. Cyclodipeptide synthases are a family of tRNA-dependent peptide bond–forming enzymes. Nature chemical biology. 2009;5(6):414-20.

92. Hoefler BC, Konganti K, Straight PD. De novo assembly of the Streptomyces sp. strain Mg1 genome using PacBio single-molecule sequencing. Genome announcements. 2013;1(4):e00535-13.

Anexos

ANEXOS



Figura Suplementaria 1. Diagrama de la metodología de predicción de PRISM.

cis-acyltransferase module	module 1 module 2	module 3	module 4	module 5	module 6	module 7	module 8	module 9
KS AT DHER KR					KST			
		¥		₹	••••••	₹		

Figura Suplementaria 2. Integración del dominio *trans*-aciltransferasa en los sitios de inserción detectados.



Figura Suplementaria 3. Imagen del actinomiceto Jnb1 en un cultivo en medio sólido (medio ACA).



Figura Suplementaria 4. Espectro de ¹H-RMN del antibiótico producido por el actinomiceto Jnb1.

Tabla Suplementaria 1.

S. amb. numeración	cgc número	Rol propuesto en la biosíntesis de congocidina	Función putativa	Homólogo en S. <i>racechromogenes</i> Jnb1
SAMR0900	cgc19	Ensamblaje de congocidina	NRPS, dominio PCP	ctg_5
SAMR0901	cgc18	Ensamblaje de congocidina	NRPS, dominios A- PCP-C	ctg_6

SAMR0902	cgc17	Biosíntesis de	Alcohol	ctg_7
	_	precursor	deshidrogenasa	
SAMR0903	cgc16	Ensamblaje	NRPS, dominio C	ctg_8
		de		
		congocidina		
SAMR0904	cgc15	Metilación del	Metil transferasa	ctg_9
0.000		pirrol		
SAMR0905	cgc14	Biosintesis de	Amidohidrolasa	ctg_10
	40	precursor		
SAMR0906	cgc13	Biosintesis de	Hidrolasa glicosidica	ctg_11
04400007		precursor		-1 10
SAMR0907	cgc12	BIOSINTESIS de	Nucleotido-azucar	ctg_12
	00011	Dissíntesis de	aminotransferasa	ata 10
SAMRU908	cgcTT	Biosintesis de	Azucar	cig_13
SAMPOOO	00010	Piccursor Discúntacia do		ota 14
SAIVIRU9U9	CgCTU		Gilcosiliansierasa	Clg_14
SAMP0010	0000	Biosíntosis do	Nucloósido difestato	cta 15
SAMINUSIU	Cyca	DIUSIIILESIS UE		cig_15
SAMR0911	8000	Biosíntesis de	Nucleótido-azúcar	cta 16
OAMIX0311	cyco	precursor	deshidrogenasa	cig_10
SAMR0912	Cac7	Biosíntesis de	Proteína hipotética	cta 17
0, 111 (0012	eger	precursor		0.9_11
SAMR0913	cgc6	Biosíntesis de	Creatinasa	ctg_18
	· ·	precursor		C C
SAMR0914	cgc5	Biosíntesis de	Dihidroorotato	ctg_19
	-	precursor	deshidrogenasa	
SAMR0915	cgc4	Biosíntesis de	Nucleósido 2-	ctg_20
		precursor	desoxiribosiltransferasa	
SAMR0916	cgc3	Biosíntesis de	Aldehído	ctg_21
		precursor	deshidrogenasa	
SAMR0917	cgc2	Ensamblaje	NRPS, dominio C	ctg_22
		de		
		congocidina		
SAMR0918	cgc1	Regulación	Regulador de	ctg_23
			respuesta de dos-	
	ogo1*	Decistoraio		ota 04
SAMRU919	cgc1	Resistencia	Transportador ABC,	ctg_24
			transmombrana	
SAMR0020	cac2*	Resistencia	Transportador ABC	cta 25
	Uguz	Resistentia	proteína unión ATP	019_20
SAMR0921	*6000	Ensamblaie	Acil-CoA sintetasa	cta 26
	0900	de		0.9_20
		congocidina		
L			1	



Figura Suplementaria 5. MSA con el algoritmo ClustalO de los dominios DH extraídos de las CDS del contig_27.



Figura Suplementaria 6. Comparación a nivel de genes mediante ClusterBLAST de la región del ctg54 y los BGC para polienos en la base de datos MIBiG.