



Universidad de Concepción

Dirección de Postgrado

Facultad de Ciencias Biológicas - Programa de Magister en Cs. con Mención en
Microbiología

**Actividad Antitumoral de pigmentos y metabolitos
secundarios sintetizados por Bacterias Antárticas y
Patagónicas**

TESIS PARA OPTAR AL GRADO DE MAGÍSTER EN
CIENCIAS CON MENCIÓN EN MICROBIOLOGÍA

Cristian Ramón Tapia Herrera

Concepción-Chile

2017

Profesor Guía: Miguel Martínez Poblete

Dpto. de Microbiología, Facultad de Ciencias Biológicas

Universidad de Concepción

Esta tesis ha sido realizada en el Departamento de Microbiología de la Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad de Concepción.

Profesor Guía

Dr. Miguel Martínez Poblete
Facultad de Ciencias Biológicas
Universidad de Concepción

Comisión Evaluadora:

Dra. Allisson Astuya Villalón
Facultad de Ciencias Naturales y
Oceanográficas
Universidad de Concepción

Dr. José Becerra Allende
Facultad de Ciencias Naturales y
Oceanográficas
Universidad de Concepción

Dr. Víctor Campos Araneda
Facultad de Ciencias Biológicas
Universidad de Concepción

Director de Programa

Dr. Carlos Smith Gallardo
Facultad de Ciencias Biológicas
Universidad de Concepción

Agradecimientos

Agradezco a todos quienes me ayudaron para poder realizar estos años de estudio y aprendizaje.

Primero, agradecer a Edelmira González quien ha sido mi pilar y alegría en esta ciudad. Segundo y no menos importante, a mis padres Laura y Ramón que junto con mis hermanos Andrés, María y Manuel me apoyaron día a día y animaron en momentos de duda, frustración, y cansancio. Además, agradecer a todos mis familiares y amigos que apoyaron durante todo este proceso.

A mi tutor Dr. Miguel Martínez Poblete, que siempre atendió mis consultas y que con sus conocimientos ayudó a resolver dudas en el transcurso del desarrollo de mi tesis. A mis compañeros de laboratorio, con quienes estuve a diario por más de dos años e hicieron grata mi estadía en este proceso

Al proyecto Fondecyt 1151028 y al Proyecto Asociativo VRID 214.083.030-1.0 por el apoyo económico prestado.

A Ruth Contreras por el apoyo técnico, a Sergio Triviño por la ayuda en los análisis químicos y a Bárbara López por su ayuda en la realización de ensayos citotóxicos.

Resumen

Los ambientes antárticos y patagónicos chilenos son considerados extremos por sus bajas temperaturas, altos niveles de radiación ultravioleta y características oligotróficas. En la última década la atención en los ambientes extremos se ha incrementado debido a que microorganismos extremófilos son capaces de producir productos como enzimas, metabolitos secundarios y pigmentos con una potencial aplicación industrial y farmacológica. En este contexto, seis bacterias pigmentadas fueron aisladas desde ambientes patagónicos y antárticos, sus pigmentos fueron extraídos desde de la biomasa bacteriana, purificados y analizados por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). La actividad citotóxica de estos fue evaluada mediante ensayos MTT [3- (4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difeniltetrazolio] usando tres líneas celulares de cáncer (Neuro-2a, Saos-2 y MCF-7). Los pigmentos sintetizados por bacterias antárticas y patagónicas corresponden principalmente a Carotenoides y muestran actividad citotóxica a una concentración de 40 µg/ml.

Abstract

Chilean Antarctic and Patagonic environments are considered extreme because their low temperatures, ultraviolet radiation high levels and oligotrophic characteristics. In the last decade attention to extreme environments has increased because extremophiles microorganism are able to produce novel products as enzymes, secondary metabolites and pigments with an industrial and pharmaceutical potential application. In this context, six pigmented psychrotrophic bacteria was isolated from Chilean Patagonic and Antarctic environment, pigments was extracted from bacterial biomass, purified and analyzed by High Performance Liquid Chromatography (HPLC). Cytotoxic activity was evaluated by 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium (MTT) assay using three cancer cell lines (Neuro-2a, Saos-2 and MCF-7). Pigments synthesized by Patagonic an Antarctic bacteria were characterized mainly as carotenoids and shows cytotoxic activity at 40 µg/ml concentration.

Tabla de Contenidos

RESUMEN	iv
ABSTRACT	v
ÍNDICE DE FIGURAS	ix
ÍNDICE DE TABLAS	xi
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Cáncer	1
1.2. Tratamiento del cáncer	1
1.3. Microorganismos como fuente de pigmentos y metabolitos secundarios antitumorales	2
1.3.1. Policétidos	2
1.3.2. Pigmentos.....	7
1.4. Estrategias de supervivencia bacteriana en ambientes extremos fríos .	8
1.4.1. Disminución del tamaño celular.....	8
1.4.2. Dormancia	9
1.4.3. Proteínas Anticongelantes.....	9
1.4.4. Síntesis de Pigmentos.....	9

1.4.5. Cambios en la composición lipídica de la membrana.....	10
1.4.6. Síntesis de metabolitos secundarios	11
2. Hipótesis.....	12
2.1. Objetivo General.....	12
2.2. Objetivos Específicos	12
3. Materiales y Métodos	13
3.1. Microorganismos	13
3.2. Identificación de las cepas bacterianas utilizadas en este estudio	16
3.3. Detección de genes Policétido Sintasa en bacterias Antárticas y Patagónicas.....	17
3.4. Extracción, análisis y caracterización de pigmentos.....	18
3.5. Líneas celulares y condiciones de cultivo	20
3.6. Ensayo de citotoxicidad de extractos de bacterias pigmentadas	21
3.7. Purificación de pigmentos presentes en el extracto con actividad citotóxica	22
3.8. Determinación de citotoxicidad de pigmentos purificados	22
4. Resultados	24
4.1. Identificación de cepas bacterianas usadas en este estudio	24

4.2. Detección de genes PKS en cepas bacterianas Antárticas y Patagónicas.....	25
4.3. Caracterización de pigmentos bacterianos.....	28
4.4. Citotoxicidad de extractos pigmentados bacterianos.....	37
4.5. Purificación de pigmentos de las cepas <i>Deinococcus</i> sp. UDEC-P1, <i>Iodobacter</i> sp. UDEC-P20 y <i>Arthrobacter</i> sp. UDEC-A13.....	39
4.6. Actividad citotóxica de pigmentos purificados	42
5. Discusión.....	45
6. Conclusiones.....	60
7. Proyecciones.....	61
8. Bibliografía	62
9. Anexos	77
9.1 Anexo 1	77
9.2 Anexo 2	81



ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Síntesis de policétidos por el complejo PKS	4
Figura 2. Cultivo en placa de bacterias pigmentadas.....	7
Figura 3. Búsqueda del patrón PKS conservado en las secuencias de las cepas <i>Microbacterium</i> sp. UDEC-A15 y <i>Flavobacterium</i> sp. UDEC-P22.....	27
Figura 4. Cromatograma a 450 nm del extracto de <i>Deinococcus</i> sp. UDEC-P1.....	29
Figura 5. Cromatograma a 450 nm del extracto de <i>Sphingomonas</i> sp. UDEC-P21.....	30
Figura 6. Espectro de absorción del pigmento principal sintetizado por <i>Sphingomonas</i> sp. UDEC-P21	31
Figura 7. Cromatograma a 530 nm del extracto de <i>Iodobacter</i> sp. UDEC-P20.....	32
Figura 8. Cromatograma a 450 nm del extracto de <i>Arthrobacter</i> sp. UDEC-A13.....	33
Figura 9. Cromatograma a 450 nm del extracto de <i>Stenotrophomonas</i> sp. UDEC-A14.....	34
Figura 10. Cromatograma de extracto de <i>Microbacterium</i> sp. UDEC-A15.....	35

Figura 11. Porcentaje de viabilidad de la línea celular Neuro-2A del primer screening	38
Figura 12. Purificación de pigmentos de la cepa <i>Deinococcus</i> sp. UDEC-P1	39
Figura 13. Purificación de pigmentos de la cepa <i>Iodobacter</i> sp. UDEC-P20	40
Figura 14. Purificación de pigmentos de la cepa <i>Arthrobacter</i> sp. UDEC-A13.....	41
Figura 15. Porcentaje de viabilidad de la línea celular Neuro-2A.....	42
Figura 16. Porcentaje de viabilidad de la línea celular MCF-7	43
Figura 17. Porcentaje de viabilidad de la línea celular Saos-2.....	44



ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Cepas pigmentadas aisladas desde la Patagonia y Antártida utilizadas en este estudio	13
Tabla 2. Cepas aisladas desde la Antártida utilizadas para la búsqueda de genes PKS	14
Tabla 3. Cepas aisladas desde la Patagonia utilizadas para la búsqueda de genes PKS	15
Tabla 4. Resultado BlastN y nominación UDEC de las cepas utilizadas en este estudio.....	24
Tabla 5: Resultado de la amplificación con los partidores para detectar genes PKS	25
Tabla 6. BlastX de las secuencias obtenidas de la amplificación con los partidores para detectar PKS	26
Tabla 7. Tiempo de retención y máximos de absorbancia (λ Max) de los pigmentos sintetizados por <i>Deinococcus</i> sp. UDEC-P1	30
Tabla 8. Tiempo de retención y máximos de absorbancia (λ Max) de los pigmentos sintetizados por <i>Sphingomonas</i> sp. UDEC-P21	31
Tabla 9. Tiempo de retención y máximos de absorbancia (λ Max) de los pigmentos sintetizados por <i>Iodobacter</i> sp. UDEC-P20.....	32
Tabla 10. Tiempo de retención y máximos de absorbancia (λ Max) de los pigmentos sintetizados por <i>Arthrobacter</i> sp. UDEC-A13	34

Tabla 11. Tiempo de retención y máximos de absorbanza (λ Max) de los pigmentos sintetizados por *Stenotrophomonas* sp. UDEC-A14..... 35

Tabla 12. Tiempo de retención y máximos de absorbanza (λ Max) de los pigmentos sintetizados por *Microbacterium* sp. UDEC-A15 36



1. Introducción

1.1. Cáncer

El cáncer se define como una enfermedad en la que células anormales se dividen sin control y pueden invadir los tejidos cercanos (National Cancer Institute, 2009). Las células cancerosas son capaces de distribirse a otras partes del cuerpo a través de los sistemas sanguíneo y linfático, lo que se describe como metástasis (National Cancer Institute, 2009). A nivel mundial, del total de muertes bajo los 70 años, el 52 % son causadas por enfermedades no transmisibles y del total de muertes por este tipo de enfermedades, el cáncer ocupa el segundo lugar con un porcentaje de 27 %, solo detrás de las enfermedades cardiovasculares (37 %) (World Health Organization. 2015), porcentaje que se estima, aumente durante los próximos 15 años (Mathers et al., 2006). En Chile, la mayor proporción de muertes por cáncer es debido al de estómago, seguido de vesícula biliar, pulmón y de mama (Itriago et al., 2013). En 1960 las enfermedades cardiovasculares y las defunciones por cáncer en conjunto no superaban el 18 % del total de defunciones, mientras que las enfermedades del sistema respiratorio eran responsables de casi 21 %. En 2009 en cambio, las muertes por enfermedades respiratorias corresponden a menos del 10 % del total de defunciones, mientras que las del sistema circulatorio y cáncer llegan en conjunto al 52 % (Itriago et al., 2013).

1.2. Tratamiento del cáncer

En relación al tratamiento, existen distintos tipos, dentro de ellos están; cirugía, en el caso de que en el tumor no haya ocurrido metástasis; la radioterapia, que consiste

en exponer al paciente a radiaciones ionizantes para destruir las células malignas y hacer desaparecer o disminuir el tamaño del tumor; la quimioterapia corresponde a la administración de drogas que tienen la capacidad de inhibir la evolución de los tumores malignos restringiendo ciertos mecanismos bioquímicos específicos de la multiplicación de sus células dificultando su proceso de división. (National Cancer Institute, 2009). De este último tipo de tratamiento, se ha descrito que aproximadamente el 50 % de las drogas utilizadas en la quimioterapia son de origen natural o derivados de estos, siendo plantas, hongos y bacterias los principales organismos que capaces de sintetizarlos, así, por lo que estos son fuente de nuevos compuestos bioactivos de los cuales algunos puedan tener un potencial uso como droga antitumoral (Mann, 2002).

1.3. Microorganismos como fuente de pigmentos y metabolitos secundarios antitumorales

Las bacterias son un grupo de organismos que pueden sintetizar variados metabolitos secundarios bioactivos. En general, en bacterias, las principales rutas biosintéticas implicadas en metabolismo secundario son los que forman compuestos aromáticos, isoprenos, oligosacáridos, péptidos y policétidos (Ruiz et al., 2010).

1.3.1. Policétidos

Los policétidos son un grupo de metabolitos secundarios sintetizados por el denominado complejo multienzimático Policétido Sintasa (PKS) y aunque estructuralmente los policétidos son muy diversos, todos son ensamblados por

rondas sucesivas de condensaciones de Claisen descarboxilativas entre un derivado de malonato tioesterificado y un acil tioéster (Chan et al., 2009). Posterior a la elongación de la cadena del policétido ocurre una ciclización del mismo, para finalmente modificarlo por reacciones de hidroxilación, epoxidación y glicosidación (Auclair et al., 2000; Kelly. 2008). Este complejo está presente en bacterias, hongos, plantas (Kroken et al., 2003; Beerhuesy et al., 2009) y en algunos casos se ha documentado en animales (Castoe et al., 2006). Hasta la fecha, en bacterias se ha descrito tres tipos de complejos policétido sintasa, estos son el tipo I (Cortes et al., 1990; Donadio et al., 1991), tipo II (Malpartida et al., 1984; Motamedi et al., 1987) y tipo III (Funa et al., 1999). El tipo I se caracteriza por ser enzimas multifuncionales que se organizan en módulos, cada uno de los cuales alberga un conjunto de actividades distintas y no iterativas responsables de la catálisis de un ciclo de la elongación de la cadena del policétido; el tipo II son complejos multienzimáticos que llevan un único conjunto de actividades en forma iterativa; el tipo III son enzimas homodiméricas que esencialmente son enzimas de condensación iterativas (Shen, 2003) (Fig. 1). En determinados casos la síntesis de policétidos está a cargo de un complejo enzimático híbrido formado por el complejo Policétido Sintasa y el complejo Péptido Sintasa No Ribosomal (PKS/NRPS), este último incorpora aminoácidos a la cadena que se está sintetizando (Auclair et al., 2000, Fisch. 2013), ejemplos de compuestos sintetizados por estos híbridos son la coronatina, ciclosporina, rapamicina, epotilonas y rizoxina (Du et al., 2001; Partida-Martínez et al., 2005).

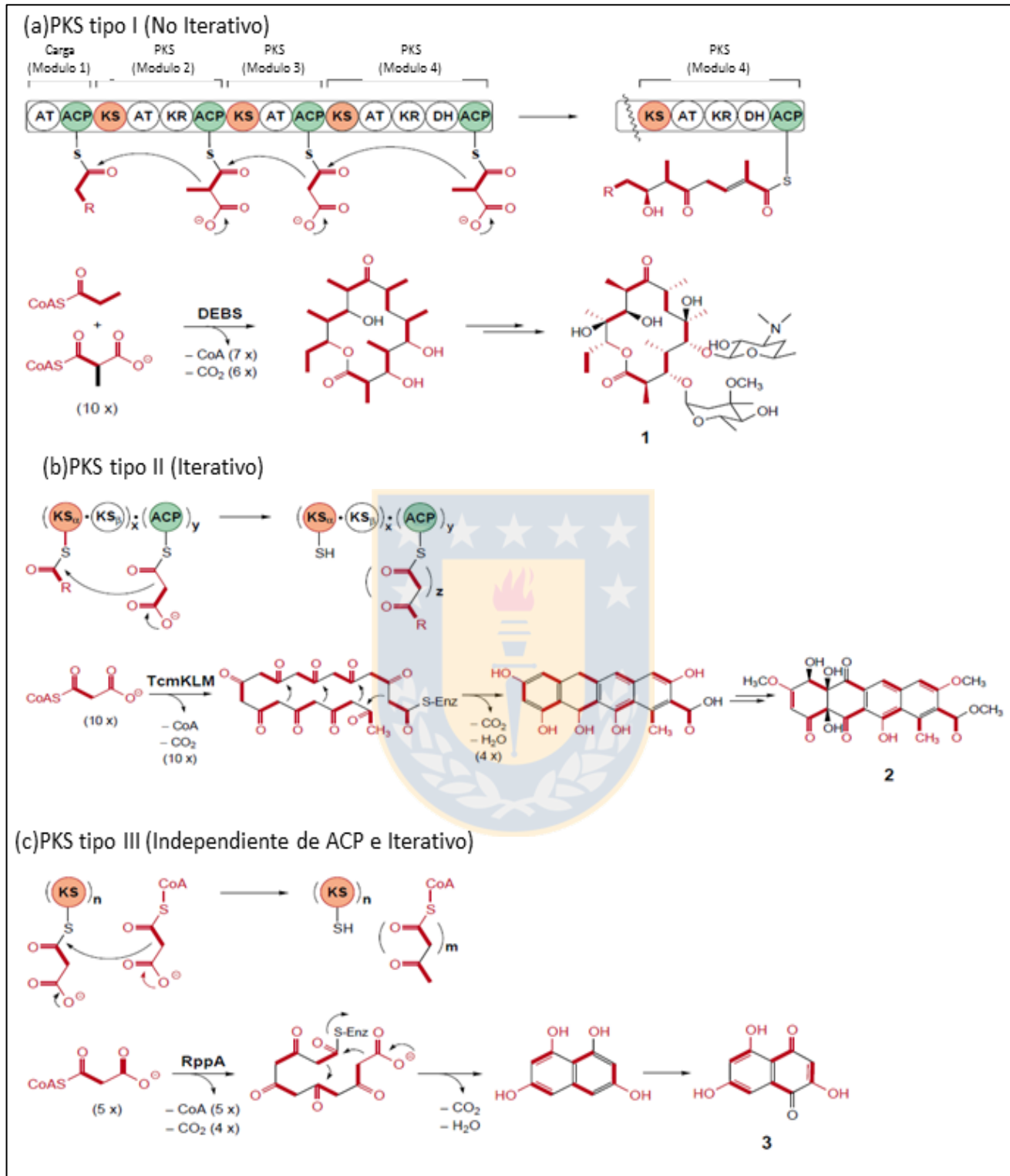


Figura 1. Síntesis de policétidos por el complejo PKS. Se muestra el complejo PKS tipo I, utilizando el modelo para síntesis de eritromicina A; Tipo II, modelo para síntesis de tetracenomicina C y por último el tipo III, representado por el modelo para síntesis de flavolina. (Fuente: Shen. 2003 modificada)

El rol de los policétidos en la naturaleza parece ser dependiente del organismo que los sintetiza, por ejemplo, actinomicetos y cianobacterias son fuente de policétidos, muchos de los cuales poseen actividad antimicrobiana y antitumoral (Gomes et al., 2013). La Eritromicina, tetraciclina, y anfotericina B son ejemplos conocidos de los agentes antimicrobianos usados para el tratamiento de enfermedades infecciosas. También pueden actuar como factores de virulencia, *Mycobacterium ulcerans*, agente causante de la úlcera de Buruli sintetiza un policétido denominado micolactona, es un inmunosupresor que participa en la patogénesis (Sarfo et al., 2016). Otros policétidos permiten establecer relaciones simbióticas, como el caso de la bacteria *Burkholderia rhizoxinica*, que sintetiza un policétido denominado rizoxina, esta bacteria vive en el micelio de *Rhizopus microsporus*, que, por acción de este compuesto, el hongo puede infectar la raíz de las plantas de arroz y descomponerla (Partida-Martínez et al., 2005). Las briostatinas son una familia de policétidos que se encuentran presentes en briozoos marinos, se propone que son producidos por bacterias simbióticas (Sudek et al., 2007). Se ha demostrado que estos compuestos protegen de la depredación a los briozoos de vida libre hasta que se asientan y desarrollan defensas estructurales (Lopanik et al., 2006).

Desde el punto de vista farmacológico, se ha descrito que bacterias pueden sintetizar policétidos con actividad antitumoral, ejemplos de estos son la rizoxina, un macrólido de 16 miembros sintetizado por algunas especies de *Burkholderia* (Partida-Martínez et al., 2005) y *Pseudomonas*, (Loper et al., 2008; Takeuchi et al., 2015), este compuesto tiene la capacidad para inhibir la formación de microtúbulos en células eucariontes, deteniendo la división y posterior muerte celular (Takahashi et

al., 1987). Otro policétido con actividad antitumoral son las epotilonas, las que son sintetizadas por *Sorangium cellulosum* (Hofle et al., 1996), esta se caracteriza por ser un fuerte estabilizador de microtúbulos, deteniendo la división celular e induciendo la apoptosis (Goodin et al., 2004); la salinosporamida A es un compuesto antitumoral producido por algunas especies del genero *Salinispora* (Fenical et al., 2009), su mecanismo de acción está relacionado a la inhibición del complejo proteosoma 20S de células eucariontes, lo que provoca la pérdida de control del metabolismo interno de la célula, incluida la degradación de proteínas proapoptóticas (Gulder et al., 2010).



1.3.2. Pigmentos

Los pigmentos pueden ser producidos por una amplia variedad de organismos, entre los que destacan las bacterias, estos microorganismos tienen un importante potencial como productores de pigmentos bioactivos (Venil et al., 2013). La producción de pigmentos bacterianos ha surgido como un importante campo para la investigación debido a su potencial en aplicaciones industriales y farmacéuticas (Venil et al., 2009).



Figura 2. Cultivo en placa de bacterias pigmentadas. *Serratia mascerens* (a) productora de prodigiosina y *Chromobacterium violaceum* (b) productora de violaceina. (Fuente: elaboración propia)

por ejemplo las prodigiosinas son pigmentos de color rojo que fueron aisladas de *Serratia mascerens* (Figura 2) (Bennett et al., 2000) y posteriormente de otros géneros bacterianos (Pandey et al., 2007). Estos se caracterizan por inducir apoptosis en células eucariontes y posee actividad sobre líneas celulares humanas de cáncer hematopoyético, leucemia de células T, leucemia promielocítica, mieloma

y linfoma de Burkitt (Montaner et al., 2000), también tiene efecto sobre líneas celulares tumorales gástricas, colon y leucemia linfocítica (Diaz-Ruiz et al., 2001, Montaner et al., 2001, Campas et al., 2003), por el contrario, en células no tumorales tienen un bajo efecto citotóxico (Montaner et al., 2000), lo que indica un potencial uso como droga antitumoral. Otros pigmentos son las Chinikomycinas A y B, estas se caracterizan por inhibir solamente el desarrollo de células tumorales como cáncer de mama, melanoma, cáncer renal, cáncer pulmonar y de útero (Li et al., 2005). Otro pigmento bioactivo es la violaceína, es un pigmento purpura aislado de la bacteria *Chromobacterium violaceum* (Duran et al., 2001) y se caracteriza por tener actividad antitumoral al inducir apoptosis en células tumorales de cáncer colorectal (Kodach et al., 2006; De Carvalho et al., 2006).

1.4. Estrategias de sobrevivencia bacteriana en ambientes extremos fríos

Las condiciones ambientes extremas como baja temperatura, altos niveles de radiación, cambios de osmolaridad y oligotrofia entre otras permitido que los microorganismos que habitan estos ambientes hayan desarrollado variadas estrategias de supervivencia, entre las cuales están:

1.4.1. Disminución del tamaño celular

Una fracción de la población microbiana puede presentar un menor tamaño, aunque dicho tamaño no puede ser menor a 0,5 μm de diámetro para así tener un espacio plasmático que les permita llevar a cabo reacciones metabólicas (Velimirov, 2001). Además, una reducción de tamaño produce un aumento en la relación superficie

volumen; así, las bacterias tienen menores requerimientos nutricionales, y a su vez, una mayor eficiencia en la captación de ellos (Velkov, 1999).

1.4.2. Dormancia

Una fracción de la población microbiana puede ingresar a un estado de menor actividad metabólica, lo cual se ha denominado como dormancia. Este estado metabólico es una forma particular que tienen las bacterias para reaccionar a un estrés provocado por el ambiente, dichas bacterias dormantes pueden retomar la capacidad de multiplicarse cuando las condiciones ambientales son favorables. (Dworkin et al., 2010)

1.4.3. Proteínas anticongelantes

Las proteínas anticongelantes son un grupo estructuralmente diverso que inhiben el crecimiento de cristales de hielo mediante la unión a estos, disminuyendo el punto de congelación del agua o inhibiendo la recrystalización de las partículas de hielo (Singh et al., 2014). De esta forma, las membranas de algunas bacterias adaptadas al frío permanecen protegidas de los daños causados por la congelación, lo que aumenta la capacidad de supervivencia de los microorganismos que permanecen atrapadas en el hielo (Garnham et al., 2008; Raymond et al., 2008)

1.4.4. Síntesis de pigmentos

Los pigmentos biológicos o biocromos son definidos como sustancias químicas especiales que contienen una molécula coloreada sintetizada por un organismo (Hari et al., 1994). La alta frecuencia de la producción de pigmentos en bacterias aisladas de muestras de hielo (Zhang et al., 2008), glaciares (Foght et al., 2004), o

aguas superficiales marinas (Agogue et al., 2005) sugiere que los pigmentos tendrían una función en la adaptación a ambientes fríos.

La fluidez de la membrana es esencial para su integridad estructural y, por lo tanto, para el funcionamiento celular (Deming, 2002). Se ha descrito que las bajas temperaturas poseen efectos significativos sobre la fluidez de la membrana y que los organismos han desarrollado una serie de mecanismos para alterar la fluidez de esta (Deming, 2002; Chintalapati et al., 2004). Los pigmentos del tipo carotenoides representan una clase de moduladores de fluidez de la membrana. Se postula que tanto pigmentos carotenoides polares como apolares sintetizados por diferentes bacterias ayudan a mantener la fluidez y homeoviscosidad de la membrana durante las fluctuaciones de temperatura en ambientes antárticos (Chattopadhyay, 2006; Rodrigues et al., 2008). También se ha descrito que los pigmentos permiten a bacterias adaptadas a ambientes fríos soportar diversos factores de estrés como radiación ultravioleta, ciclos de congelamiento y descongelamiento (Dieser et al., 2010), además de cambios de osmolaridad y temperatura en el medio (Fong et al., 2001).

1.4.5. Cambios en la composición lipídica de la membrana

Además de los pigmentos descritos anteriormente, otros factores están estrechamente relacionados con la fluidez de la membrana en ambientes extremos fríos, ejemplos de ellos son la composición de ácidos grasos en las membranas lipídicas, longitud de sus cadenas, estructura, grado de saturación y la tasa de los ácidos grasos *cis* y *trans* (Kim et al., 2015). Entre todos estos factores, el aumento en el contenido de ácidos grasos poliinsaturados reduce el punto de fusión de

membrana y es considerado como un factor crucial para mejorar fluidez de la membrana (Chintalapati et al., 2004; Velly et al., 2015)

1.4.6. Síntesis de metabolitos secundarios

Por las condiciones de oligotrofia, los microorganismos habitan en la Antártida, han desarrollado variadas estrategias para adquirir una ventaja competitiva. En particular, la actividad antagonista puede contribuir a la adaptación de las bacterias antárticas mediante la reducción de la presencia de microorganismos competitivos (Lo Guidice et al., 2007). Se ha descrito ampliamente en la literatura que organismos aislados de ambientes extremos fríos pueden sintetizar diversos metabolitos secundarios que se caracterizan por inhibir el desarrollo otros microorganismos, tanto terrestres, acuáticos y aislados humanos clínicos (Lo Guidice et al., 2007; Barros et al., 2013; Asencio et al., 2014).

Basado en la información descrita anteriormente, se plante la siguiente pregunta: ¿Cepas bacterianas aisladas desde ambientes extremos fríos producen compuestos con actividad antitumoral?

La Patagonia y Antártica son ubicaciones geográficas caracterizadas por poseer condiciones ambientales extremas como oligotrofia, bajas temperaturas y altos niveles de radiación UV, por lo tanto, es posible que estas condiciones hayan permitido a las bacterias que habitan estos ambientes desarrollar estrategias de supervivencia como síntesis de metabolitos secundarios para inhibir el desarrollo de competidores y también la síntesis de pigmentos los que se propone actúan como protectores frente a la radiación UV, por otro lado, se ha documentado que algunos

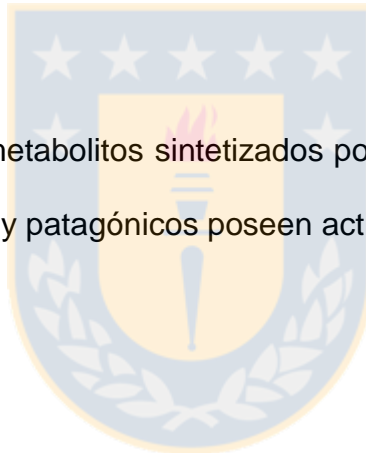
pigmentos y metabolitos secundarios como los policétidos sintetizados por bacterias poseen actividad antitumoral. Basado en estos datos, se plantea la siguiente hipótesis:

2. Hipótesis

Cepas bacterianas aisladas de ambientes considerados extremos como la Patagonia y la Antártica, sintetizan pigmentos o metabolitos secundarios con actividad citotóxica.

2.1. Objetivo general

Establecer si pigmentos y metabolitos sintetizados por cepas bacterianas aisladas desde ambientes antárticos y patagónicos poseen actividad citotóxica.



2.2. Objetivos específicos

2.2.1. Detectar, la presencia de los genes para la síntesis de policétidos (PKS) en cepas bacterianas aisladas desde ambientes antárticos y patagónicos, y determinar si poseen actividad citotóxica.

2.2.2. Determinar la naturaleza química de pigmentos no difusibles sintetizados por cepas bacterianas aisladas desde la Patagonia y Antártica.

2.2.3. Determinar si pigmentos bacterianos de cepas aisladas desde la Patagonia y Antártica tienen actividad citotóxica.

3. Materiales y métodos

3.1. Microorganismos

Las cepas bacterianas fueron obtenidas del cepario del Laboratorio de Microbiología Básica y Bioremediación de la Universidad de Concepción. Para la búsqueda de pigmentos con actividad antitumoral, se seleccionaron 3 cepas bacterianas aisladas desde la Patagonia, estas son *Deinococcus* sp. UDEC-P1, *Iodobacter* sp. UDEC-P20 y PC3. Las cepas aisladas desde la Antártica fueron AAM-7, AAM-10 y ATH-10 cuyas colonias mostraron pigmentación al ser cultivadas en agar R2a. En la Tabla 1 se describe en detalle cada cepa.

Tabla 1. Cepas pigmentadas aisladas desde la Patagonia y Antártida utilizadas en este estudio.

Cepa	Afinidad Gram	Temperatura de Crecimiento usada	Color colonia	Lugar aislamiento
<i>Deinococcus</i> sp. UDEC-P1	Gram positivo	30 °C	Rojo-rosado	Lago Témpanos
<i>Iodobacter</i> sp. UDEC-P20	Gram negativo	10 °C	Violeta	Lago Las Torres
UDEC-P21	Gram negativo	30 °C	Naranja	Puerto Cisnes
UDEC-A13	Gram positivo	10 °C	Amarillo Pálido	Antártica (Rada Covadonga)
UDEC-A14	Gram negativo	30 °C	Amarillo	Antártica (Rada Covadonga)
UDEC-A15	Gram positivo	30 °C	Amarillo	Antártica (Meseta de Infantería)

(Fuente: Elaboración propia)

Para la búsqueda de bacterias con la capacidad de sintetizar policétidos, se seleccionaron 20 cepas bacterianas aisladas desde la Antártica (Tabla 2) y 20 cepas aisladas desde la Patagonia (Tabla 3)

Tabla 2. Cepas aisladas desde la Antártida utilizadas para la búsqueda de genes PKS.

Cepa	Afinidad Gram	Lugar aislamiento
AAA-6	Gram Negativo	Islote Isabel Riquelme
AAA-7	Gram Positivo	Islote Isabel Riquelme
AAA-8	Gram Negativo	Islote Isabel Riquelme
AAM-2	Gram Positivo	Rada Covadonga
AAM-6	Gram Positivo	Rada Covadonga
UDEC-A13	Gram Positivo	Rada Covadonga
UDEC-A14	Gram Positivo	Rada Covadonga
AAM-12	Gram Negativo	Rada Covadonga
AAM-13	Gram Negativo	Rada Covadonga
AAM-15	Gram Negativo	Rada Covadonga
APM-5	Gram Positivo	Islote kopaitic
APM-10	Gram Positivo	Islote kopaitic
UDEC-A3	Gram Negativo	Meseta de la Infanteria
ATH-3	Gram Negativo	Meseta de la Infanteria
ATH-6	Gram Negativo	Meseta de la Infanteria
ATH-8	Gram Negativo	Meseta de la Infanteria
UDEC-A15	Gram Negativo	Meseta de la Infanteria
VC-1	Gram Negativo	Islote Isabel Riquelme
VC-4	Gram Positivo	Islote Isabel Riquelme
VC-5	Gram Positivo	Islote Isabel Riquelme

(Fuente: Elaboración propia)

Tabla 3. Cepas aisladas desde la Patagonia utilizadas para la búsqueda de genes PKS.

Cepa	Afinidad Gram	Lugar aislamiento
UDEC-P1	Gram Positivo	Paine (Lago Tempango)
TEM-1	Gram Positivo	Coyhaique (Témpano)
TEM-2	Gram Negativo	Coyhaique (Témpano)
TEM-3	Gram Positivo	Coyhaique (Témpano)
TEM-5	Gram Positivo	Coyhaique (Témpano)
LG-2	Gram Negativo	Paine (Lago Grey)
LG-3	Gram Negativo	Paine (Lago Grey)
LG-4	Gram Negativo	Paine (Lago Grey)
UDEC-P22	Gram Negativo	Coyhaique (Burgos)
BUR-2	Gram Negativo	Coyhaique (Burgos)
BUR-3	Gram Negativo	Coyhaique (Burgos)
UDEC-P23	Gram Negativo	Coyhaique (Burgos)
UDEC-P24	Gram Negativo	Coyhaique (Burgos)
BUR-F3	Gram Negativo	Coyhaique (Burgos)
QUE-1	Gram Positivo	Coyhaique (Queulat)
QUE-2	Gram Negativo	Coyhaique (Queulat)
QUE-3	Gram Negativo	Coyhaique (Queulat)
QUE 2-2	Gram Negativo	Coyhaique (Queulat)
PC1	Gram Positivo	Puerto Cisnes
UDEC-P21	Gram Negativo	Puerto Cisnes

(Fuente: Elaboración propia)

3.2. Identificación de las cepas bacterianas utilizadas en este estudio

Por último, para determinar la identidad de las cepas se realizó la extracción de ADN de cada cepa utilizando el kit UltraClean Microbial DNA Isolation.

Luego, se amplificó el gen que codifica para el ARN ribosomal 16S mediante la técnica reacción en cadena de la polimerasa (PCR), se utilizó 10 µl de SapphireAmp Fast PCR Master Mix, 1 µl de ADN bacteriano y 1 µl de cada primer: 8f (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') y 1492r (5'-GGCTACCTTGTTACGACTT-3') (Weisburg et al., 1991) y 7 µl de agua PCR hasta alcanzar un volumen total de 20 µl para cada reacción.

Las condiciones de PCR fueron: Predenaturación a 94°C durante 5 minutos, seguido por 33 ciclos de denaturación a 94 °C por 30 segundos, hibridación por 45 segundos a 55,6 °C, y elongación a 72 °C por 1,5 minutos; finalmente la postelongación se llevó a cabo a 72 °C por 10 min. Los productos de PCR se visualizaron en geles al 1 % de agarosa. La región del gel de agarosa que contenía la banda correspondiente al amplicón de aproximadamente 1,5 Kb fue cortada, purificada (E.Z.N.A.® Gel Extraction Kit) y se envió a Corea para su secuenciación en Macrogen. Corea.

Las secuencias fueron editadas usando el programa Sequencher 4.0. El análisis filogenético se realizó usando la herramienta ARB software package (Campos et al., 2009).

3.3. Detección de genes Policétido Sintasa en bacterias Antárticas y Patagónicas

Para detectar la presencia de Genes que codifican para el complejo multienzimático policétido sintasa (PKS) se utilizó la técnica reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

El DNA genómico de las bacterias fue extraído utilizando el kit UltraClean Microbial DNA Isolation. La PCR fue llevada a cabo utilizando 10 µl de SapphireAmp Fast PCR Master Mix, 1 µl de ADN bacteriano y 1 µl de cada primer degenerado: (KSDPQQf: 5'-MGNGARGCANNWNSMNATGGAYCCNCARCANMG-3; KSHGTGr: 5'GGRTCNCNARNNSWNGTNCNGTNC CRTG-3') (Piel et al., 2004; Ibrahim et al., 2008) y 7 µl de agua PCR hasta alcanzar un volumen total de 20 µl para cada reacción.

Las condiciones de PCR fueron: Predenaturación a 94 °C durante 4 minutos, seguido por 33 ciclos de denaturación a 94 °C por 1 minuto, hibridación por 1 minuto a 54 °C, y elongación a 72 °C por 2 minutos; finalmente la postelongación se llevó a cabo a 74 °C por 10 min (Ibrahim et al., 2008). Los productos de PCR se visualizaron en geles al 1 % de agarosa. Como control positivo de PCR se usó el ADN de la cepa bacteriana *Saccharopolyspora erythraea* ATCC 11635 que sintetiza el policétido Eritromicina (Wong et al., 2012), como control negativo se utilizó la cepa *Escherichia coli* K-12 que se ha descrito carencia de vías para la síntesis de policétidos (Gao et al., 2010). La región del gel de agarosa que contenía la banda correspondiente al amplicón de aproximadamente 0,7 Kb fue cortada, purificada

(E.Z.N.A.® Gel Extraction Kit) y fue enviada a Corea para su secuenciación en MacroGen.

Para determinar la identidad de los amplicones secuenciados, las secuencias fueron editadas y posteriormente analizadas con el programa BlastX en la base de datos NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) (Zhao et al., 2008). La búsqueda de un patrón conservado descrito por Moffitt et al. (2003) fue realizada mediante el alineamiento de las secuencias de aminoácidos obtenidos con secuencias de referencia que fueron tomadas de Genbank, estas son: *Xanthobacter autotrophicus* PY2 (número de acceso: ZP_01198575); *Rhodopseudomonas palustris* (número de acceso: NP_948678); *Streptomyces verticillus* (número de acceso: AAG02357); *Myxococcus xanthus* DK 1622 (número de acceso: YP_631807); *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 (número de acceso: CAJ57409); *Pseudomonas fluorescens* PF-5 (número de acceso: YP_260097); Bacteria endosimbionte de *Paederus fuscipes* (número de acceso: AAS47562).

Así, las bacterias que tuvieran PKS serían cultivadas para posterior extracción de metabolitos secundarios y análisis de estos.

3.4. Extracción, análisis y caracterización de pigmentos

Las cepas bacterianas pigmentadas fueron cultivadas en matraces Erlenmeyer conteniendo 6 L de caldo R2A en agitación constante a 120 rpm a 30 °C o 10 °C (ver Tabla 1) hasta alcanzar una densidad celular de $1,0 \times 10^9$ UFC/ml. El contenido fue centrifugado a 9000 g por 5 minutos a 4 °C (Fernandez-Bunster, 2012). El pellet celular fue lavado 3 veces con agua destilada estéril, nuevamente centrifugado y

resuspendido en 25 ml de metanol. El contenido fue centrifugado a 5000 rpm por 20 minutos, se recuperó el sobrenadante el cual fue filtrado a través de filtros de PVDF de 0,22 μm y concentrado por evaporación a presión reducida, el extracto seco fue reextraído con acetona, concentrado en rotavapor y finalmente almacenado a -4°C en oscuridad para luego ser analizados por Cromatografía Líquida de Alta resolución (HPLC) para luego realizar el primer screening mediante ensayos MTT de citotoxicidad.

La presencia o el tipo de pigmento en el extracto fue confirmada por HPLC. Para esto, el extracto fue solubilizado en acetona a una concentración de 5 mg/ml e inyectado al HPLC equipado con una columna Kromasil C18 de 250 x 4,6 mm, para la elución se utilizó un gradiente de Acetona (70-100%): Agua en una tasa de flujo de 1,1 ml/min. Para el análisis del pigmento de la cepa *Iodobacter* UDEC-P20 se utilizó el método usado por Asencio et al., (2014) con modificaciones, el extracto solubilizado en etanol a una concentración de 5 mg/ml fue inyectado al HPLC equipado con una columna Kromasil C18 de 250 x 4,6 mm, para la elución se utilizó un gradiente de Metanol (60-80 %): Agua hasta los 20 minutos, luego el gradiente fue de Metanol (80-60 %): Agua desde los 20 a los 25 minutos con un flujo de 1,1 ml/min.

3.5. Líneas celulares y condiciones de cultivo

Se utilizaron 3 líneas de células de linaje tumoral en este estudio. La línea celular Neuro-2a (ATCC CCL-131) corresponden a células de neuroblastoma de ratón. La línea MCF7 (ATCC HTB-22) corresponden a cáncer de mama humano, por último, la línea celular Saos-2 (ATCC HTB-85) corresponde a osteosarcoma humano. Estas se encuentran disponibles en el Laboratorio de Genómica Marina y Cultivo Celular de la Facultad de Ciencias Naturales y Oceanográficas de la Universidad de Concepción.

La línea celular Neuro-2a fue cultivada en medio Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640, suplementado con 5% de suero bovino fetal (SBF), piruvato de sodio (100 mM), penicilina 50 U/ml, estreptomycin 50 µg/ml y L-glutamina 2 mM. Las líneas celulares MCF7 y Saos-2 fueron cultivadas en medio Dulbecco's Eagle modificado (DMEM) suplementado con 10 % de SBF, penicilina 50 U/ml, estreptomycin 50 µg/ml y L-glutamina 2 mM. Las líneas celulares fueron cultivadas a 37 °C en una atmósfera al 5 % de CO₂ y se mantuvieron en crecimiento exponencial por sucesivos subcultivos cada 48 h o hasta alcanzar un 90% de confluencia. El subcultivo se realizó en una razón de 1:10 por medio de la utilización de tripsina/EDTA (0,25 %-0,2 %). En condiciones de asepsia en gabinete de bioseguridad, la densidad celular fue determinada el método de exclusión de azul de tripán en cámara de Neubauer (Strober, 2001), estimada la concentración celular, estas fueron sembradas a una densidad celular de 1x10⁵ cel/ml en 100 µl de medio de cultivo en placas de 96 pocillos en para realizar ensayos de citotoxicidad.

3.6. Ensayo de citotoxicidad de extractos de bacterias pigmentadas

Los extractos acetónicos obtenidos a partir de la extracción metanólica de bacterias pigmentadas fueron solubilizados en Dimetilsulfóxido (DMSO). A partir de esta solución, 1 μ l fue obtenido y diluido en 1 ml de medio de cultivo celular, así el porcentaje V/V de DMSO en el medio correspondió al 0,1% y la concentración de extracto fue de 250 μ g/ml.

En el screening inicial, se determinó la actividad citotóxica de los extractos sobre la línea celular de neuroblastoma Neuro-2a. Las células fueron cultivadas durante 24 h hasta alcanzar un 90 % de confluencia en un volumen final de 100 μ l en microplacas de 96 pocillos, luego se removió el medio de cultivo y se adiciono 100 μ l de medio de cultivo con el extracto pigmentado hasta obtener una concentración de 250 μ g/ml de extracto en los pocillos (Menezes et al., 2013). Se incubo el cultivo celular con el extracto durante 24 horas, se revelo la citotoxicidad mediante la adición de 100 μ l de solución 3-(4,5-dimetiltiazol-2-Yl)-2,5-difenil-tetrazolio bromuro (MTT) a una concentración de 0,8 mg/ml, esta sal fue metabolizada por las células durante aproximadamente 30 minutos a 37 °C, luego el medio fue removido y 100 μ l de DMSO fueron depositados en cada pocillo para solubilizar los cristales de formazan y finalmente se midió la absorbancia a 570 nm (Torres et al., 2016)

Como control de viabilidad se utilizó las células de la línea tumoral en medio de cultivo sin extracto, su viabilidad fue considerada como 100 % de células viables. Como control se usó el solvente en el cual se solubilizaron los extractos en un porcentaje de 0,1 %V/V, en este caso DMSO. También medio de cultivo sin células

como control abiótico. Todos los ensayos fueron realizados por triplicado en 2 experimentos independientes.

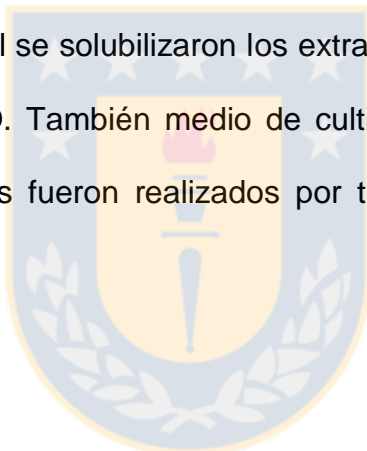
3.7. Purificación de pigmentos presentes en el extracto con actividad citotóxica

Para comprobar la actividad citotóxica de los pigmentos presentes en el extracto sobre la línea de neuroblastoma Neuro-2a, estos fueron purificados por HPLC en modo preparativo, el cual fue equipado con una columna Kromasil C18 de 250 x 10.0 mm, para la elución se utilizó un gradiente de Acetona (70-100 %): Agua en una tasa de 5 ml por minuto. Para el fraccionamiento del pigmento de la cepa *Iodobacter* UDEC-P20 se utilizó el método usado por Asencio et al., (2014) con modificaciones, el extracto solubilizado en etanol a una concentración de 5 mg/ml fue inyectado al HPLC equipado con una columna Kromasil C18 de 250 x 10.0 mm, para la elución se utilizó un gradiente de Metanol (60-80 %): Agua hasta los 20 minutos, luego el gradiente fue de Metanol (80-60 %): Agua desde los 20 a los 25 minutos con un flujo de 5 ml/min. Las fracciones fueron colectadas y la pureza comprobada mediante HPLC en modo analítico. Cada fracción fue concentrada y utilizada para evaluar la actividad citotóxica sobre las líneas celulares Neuro-2a, MCF-7 y Saos-2.

3.8. Determinación de citotoxicidad de pigmentos purificados

Para determinar la citotoxicidad de los pigmentos purificados, se utilizó las líneas celulares Neuro-2a, MCF-7 y Saos-2. Las células fueron incubadas hasta alcanzar un 80 % de confluencia en un volumen final de 100 µl en microplacas de 96 pocillos,

luego, se removió el medio de cultivo y se adiciono a los pocillos 100 μ l de medio de cultivo con el pigmento purificado a una concentración máxima de 40 μ g/ml en los pocillos (Pasquet et al., 2011). Se incubaron las células en presencia del pigmento durante 24 h, luego, se añadieron 100 μ l de solución 3-(4,5-dimetiltiazol-2-YI)-2,5-difenil-tetrazolio bromuro (MTT) y se incubo durante aproximadamente 30 min a 37 °C, luego 100 μ l de DMSO se depositaron a cada pocillo para solubilizar los cristales de formazan y finalmente se midió la absorbancia a 570 nm. Como control de viabilidad se utilizó las células de la línea tumoral en medio de cultivo sin extracto, su viabilidad fue considerada como 100 % de células viables. Como control se usó el solvente en el cual se solubilizaron los extractos en un porcentaje de 0,1 %V/V, en este caso DMSO. También medio de cultivo sin células como control abiótico. Todos los ensayos fueron realizados por triplicado en 2 experimentos independientes.



4. Resultados

4.1. Identificación de cepas bacterianas usadas en este estudio

La identificación de las cepas bacterianas se realizó mediante la secuenciación del gen que codifica para el ARN ribosomal 16S, las secuencias fueron editadas, reconstruidas y posteriormente analizadas con el programa BlastN en la base de datos NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) para comparar la similitud con las secuencias disponibles en Genbank, los resultados se muestran en la Tabla 4.

Tabla 4. Resultado BlastN y nominación UDEC de las cepas utilizadas en este estudio.

Cepa	Pigmento	Amplificación PKS	% similitud	Organismo	ID secuencia	Nominación UDEC de las cepas utilizadas en este estudio
UDEC-P21	Positivo	Negativo	99	<i>Sphingomonas</i> sp. Sph7	KP866799.1	<i>Sphingomonas</i> sp. UDEC-P21
UDEC-A13	Positivo	Negativo	99	<i>Arthrobacter</i> sp. TMN-18	JX949850.2	<i>Arthrobacter</i> sp. UDEC-A13
UDEC-A14	Positivo	Positivo	99	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> SBB17	KP790032.1	<i>Stenotrophomonas</i> sp. UDEC-A14
UDEC-A3	Negativo	Positivo	99	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> 262XG5	KF818624.1	<i>Stenotrophomonas</i> sp. UDEC-A3
UDEC-A15	Positivo	Positivo	99	<i>Microbacterium oxydans</i> W220	MF554625.1	<i>Microbacterium</i> sp. UDEC-A15
UDEC-P22	Negativo	Positivo	98	<i>Flavobacterium</i> sp. WB4.4-97	AM934676.1	<i>Flavobacterium</i> sp. UDEC-P22
UDEC-P23	Negativo	Positivo	99	<i>Pseudomonas</i> sp. A1113(2012)	KC236738.1	<i>Pseudomonas</i> sp. UDEC-P23
UDEC-P24	Negativo	Positivo	99	<i>Pseudomonas frederiksbergensis</i> 38F7	KT695828.1	<i>Pseudomonas</i> sp. UDEC-P24

(Fuente: Elaboración propia)

4.2. Detección de genes PKS en cepas bacterianas Antárticas y Patagónicas

Se utilizó la técnica de Reacción en cadena de la Polimerasa (PCR) para detectar el gen que pertenece al dominio ceto sintasa (KS) del complejo multienzimático policétido sintasa (PKS).

Tabla 5: Resultado de la amplificación con los partidores para detectar genes PKS.

Cepa Antártica	Presencia De Amplicón	Cepa Patagónica	Presencia De Amplicón
AAA-6	-	UDEC-P1	-
AAA-7	-	TEM-1	-
AAA-8	-	TEM-2	-
AAM-2	-	TEM-3	-
AAM-6	-	TEM-5	-
UDEC-A13	-	LG-2	-
UDEC-A14	+	LG-3	-
AAM-12	-	LG-4	-
AAM-13	-	UDEC-P22	+
AAM-15	-	BUR-2	-
APM-5	-	BUR-3	-
APM-10	-	UDEC-P23	+
UDEC-A3	+	UDEC-P24	+
ATH-3	-	BUR-F3	-
ATH-6	-	QUE-1	-
ATH-8	-	QUE-2	-
UDEC-A15	+	QUE-3	-
VC-1	-	QUE 2-2	-
VC-4	-	PC1	-
VC-5	-	UDEC-P21	-

+ indica presencia de amplicón (700 pb), el signo – indica ausencia de este. (Fuente: elaboración propia)

Del total de 40 cepas aisladas desde la Antártida y Patagonia utilizadas en este estudio (Tabla 5), el 15 % mostraron un producto de amplificación visualizándolo en el gel de agarosa al 1 %. Las secuencias de estos amplicones (Anexo 2) fueron analizadas con el programa BlastX en la base de datos NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) (Zhao et al., 2008). La Tabla 6 muestra el resultado del BlastX.

Tabla 6. BlastX de las secuencias obtenidas de la amplificación con los partidores para detectar PKS

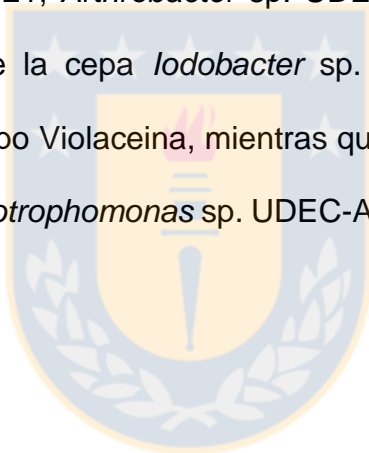
Cepa de la secuencias analizada	Identidad de la Secuencia obtenida en este estudio	% similitud	ID secuencia	Organismo
<i>Stenotrophomonas</i> sp. UDEC-A14	Receptor dependiente de TonB	97	WP_032976385.1	<i>Stenotrophomonas</i> sp. RIT309
<i>Stenotrophomonas</i> sp. UDEC-A3	Receptor dependiente de TonB	96	WP_032976385.1	<i>Stenotrophomonas</i> sp. RIT309
<i>Microbacterium</i> sp. UDEC-A15	Proteína hipotética	81	WP_060921312.1	<i>Microbacterium paraoxydans</i>
<i>Flavobacterium</i> sp. UDEC-P22	Proteína función desconocida	93	WP_029270601.1	<i>Flavobacterium</i> sp. KJJ
<i>Pseudomonas</i> sp. UDEC-P23	Regulador transcripcional YiaG	99	WP_011062198.1	<i>Pseudomonas</i>
<i>Pseudomonas</i> sp. UDEC-P24	Metionina sulfoxido reductasa	91	WP_016489134.1	<i>Pseudomonas putida</i>

(Fuente: Elaboración propia)

En el caso de las cepas *Stenotrophomonas* sp. UDEC-A14, *Stenotrophomonas* sp. UDEC-A3, *Pseudomonas* sp. UDEC-P23 y *Pseudomonas* sp. UDEC-P24 las secuencias indican que los genes amplificados no corresponden al complejo Policétido sintasa (PKS), en el caso de las cepas *Microbacterium* sp. UDEC-A15 y *Flavobacterium* sp. UDEC-P22 las secuencias corresponden a proteínas cuya función es desconocida, por lo mismo, en estas se realizó la búsqueda de un patrón conservado de aminoácidos descrito en el dominio KS (Moffitt et al., 2003). La Figura 3 muestra el resultado del alineamiento de las secuencias de las cepas *Microbacterium* sp. UDEC-A15 y *Flavobacterium* sp. UDEC-P22 con secuencias de referencia tomadas de Genbank.

4.3. Caracterización de pigmentos bacterianos

Se seleccionaron 3 cepas bacterianas pigmentadas aisladas desde la Antártica y 3 cepas pigmentadas aisladas desde ambientes Patagónicos. De las 6 cepas pigmentadas usadas en este estudio, se pudo confirmar la presencia de pigmentos del tipo carotenoide en 4 de estas. Los espectrogramas de las principales señales detectas muestran múltiples espectros de absorción, los cuales son típicos de pigmentos carotenoides con máximos de absorción entre 400 and 550 nm detectados en los extractos analizados las cepas *Deinococcus* sp. UDEC-P1, *Sphingomonas* sp. UDEC-P21, *Arthrobacter* sp. UDEC-A13 y *Microbacterium* sp. UDEC A15. En el caso de la cepa *Iodobacter* sp. UDEC-P20 si determino la presencia de un pigmento tipo Violaceina, mientras que la naturaleza del pigmento sintetizado por la cepa *Stenotrophomonas* sp. UDEC-A14 no pudo ser determinada.



De las cepas aisladas desde ambientes Patagónicos, en la cepa *Deinococcus* sp. UDEC-P1, la señal que muestra una mayor intensidad (Figura 4) corresponde a un compuesto que eluye a los 9,9 minutos (Tabla 7) el espectrograma muestra un espectro de absorción en acetona con 3 máximos de absorbancia a los 458, 482 y 510 nm. Además, el cromatograma muestra otras 4 señales de menor intensidad que pueden corresponder a carotenoides intermediarios en la ruta biosintética del carotenoide principal, cuyos tiempos de retención y máximos de absorbancia se muestran en la Tabla 7.

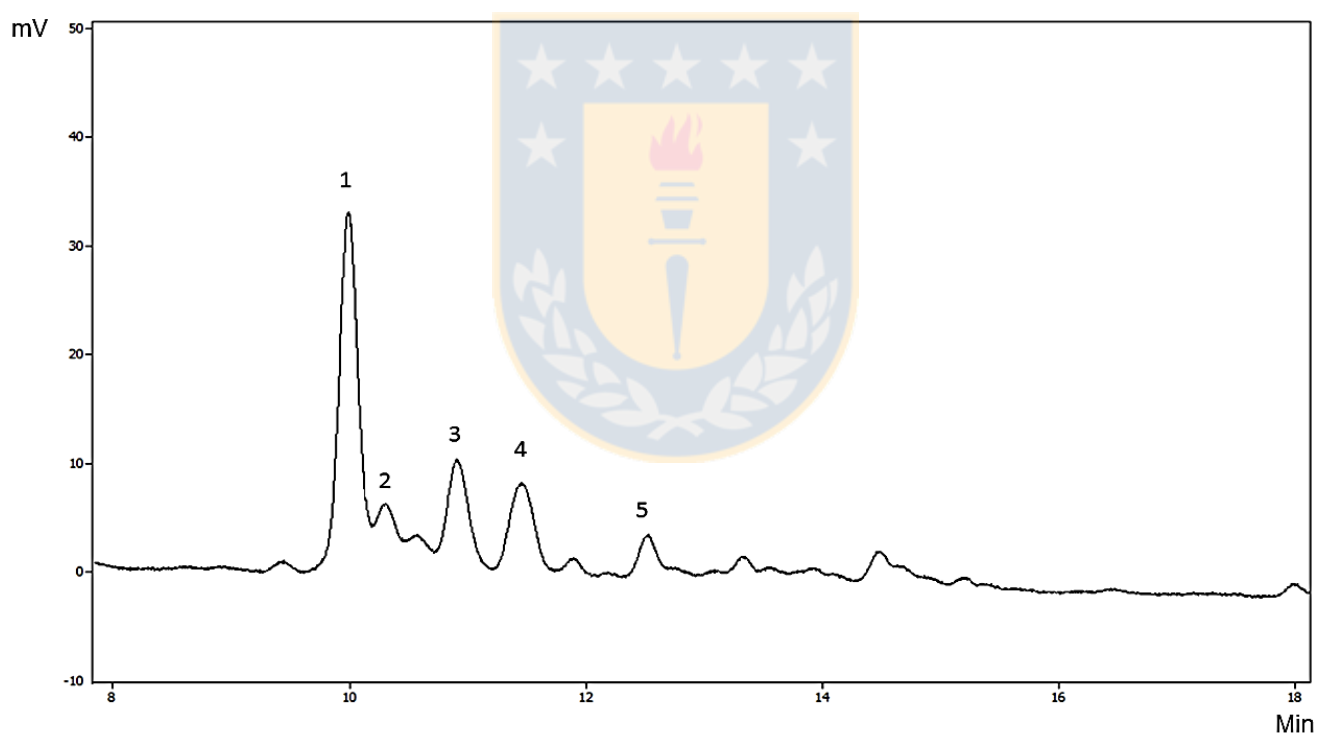


Figura 4. Cromatograma a 450 nm del extracto de *Deinococcus* sp. UDEC-P1. Se muestran enumeradas las señales que corresponden a pigmentos. La Tabla 7 muestra los tiempos de retención y máximos de absorbancia presentes en las señales detectadas. (Fuente: Elaboración propia)

Tabla 7. Tiempo de retención y máximos de absorbancia (λ Max) de los pigmentos sintetizados por *Deinococcus* sp. UDEC-P1

N° de señal detectada	Tiempo de Retención (min)	λ Max (nm)
1	9,9	458, 482, 510
2	10,3	456, 580, 507
3	10,9	554, 578, 504
4	11,47	556, 579, 504
5	12,5	461, 483, 511

(Fuente: Elaboración propia)

El extracto de la cepa *Sphingomonas* sp. UDEC-P21 esta muestro 14 señales (Figura 5) que corresponden a pigmentos del tipo carotenoide con 3 máximos de absorbancia descritos en la Tabla 8. El pigmento más abundante eluyó a los 7,4 minutos, con máximos de absorbancia de 432, 454 y 483 nm.

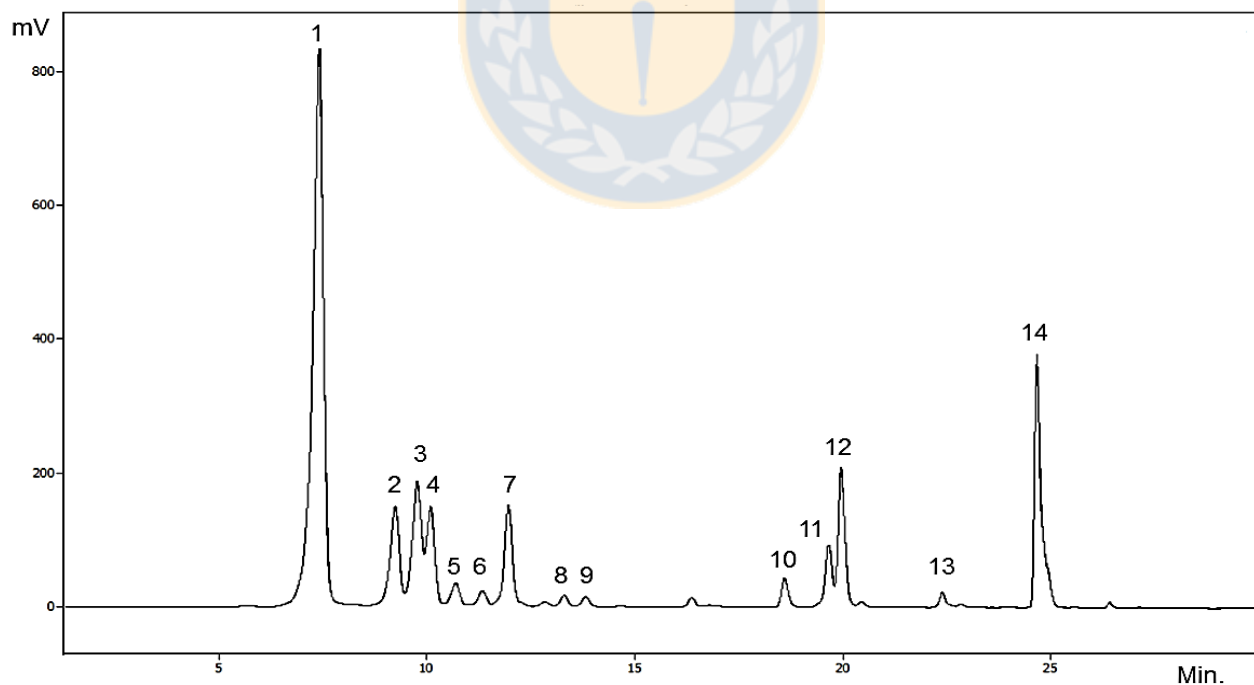


Figura 5. Cromatograma a 450 nm del extracto de *Sphingomonas* sp. UDEC-P21. Se muestran enumeradas las señales que corresponden a pigmentos. La Tabla 8 muestra los tiempos de retención y máximos de absorbancia presentes en las señales detectadas. (Fuente: Elaboración propia)

Tabla 8. Tiempo de retención y máximos de absorbancia (λ Max) de los pigmentos sintetizados por *Sphingomonas* sp. UDEC-P21

N° de señal detectada	Tiempo de Retención (min)	λ Max (nm)
1	7,4	432, 454, 483
2	9,2	427, 450, 476
3	9,7	433, 455, 481
4	10,0	427, 449, 475
5	10,6	430, 455, 482
6	11,3	428, 450, 477
7	11,9	432, 455, 481
8	13,3	427, 450, 475
9	13,8	427, 449, 474
10	18,6	430, 453, 480
11	19,6	469, 497, 530
12	19,9	431, 455, 486
13	22,4	450, 475, 507
14	24,6	432, 455, 481

(Fuente: Elaboración propia)

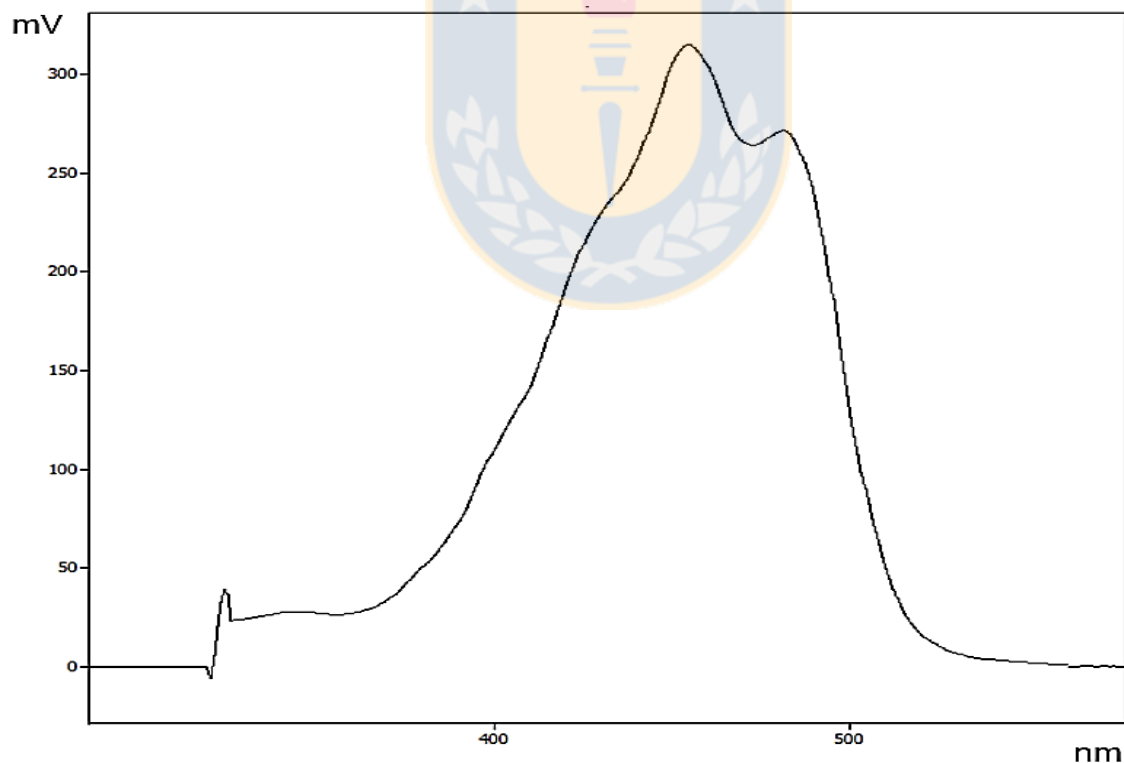


Figura 6. Espectro de absorción del pigmento principal sintetizado por *Sphingomonas* sp. UDEC-P21. (Fuente: Elaboración propia)

El cromatograma de la cepa *Iodobacter* sp. UDEC-P20 muestra 2 señales (Figura 7) que corresponden a pigmentos con máximos de absorbancia a los 264, 375 y 577 nm (Tabla 9).

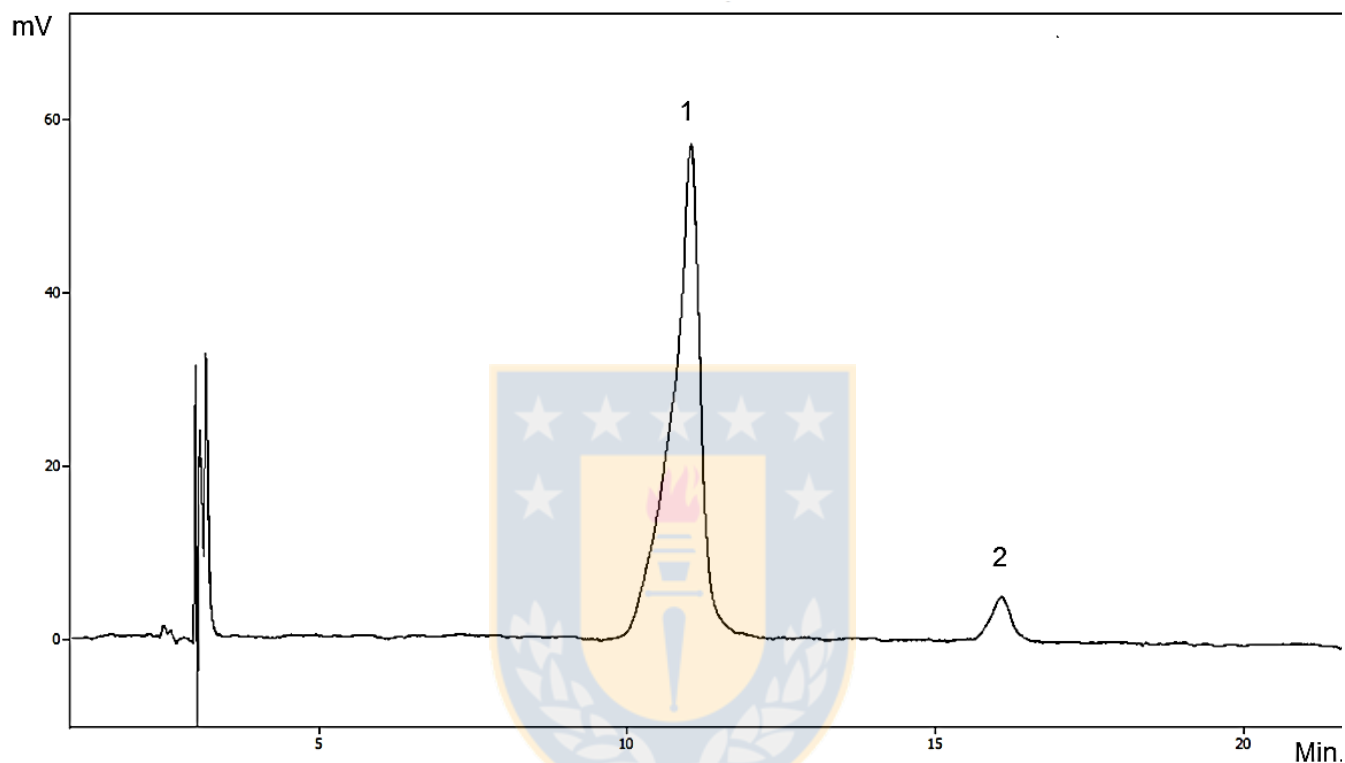


Figura 7. Cromatograma a 530 nm del extracto de *Iodobacter* sp. UDEC-P20. Se muestran enumeradas las señales que corresponden a pigmentos. La tabla 9 muestra los tiempos de retención y máximos de absorbancia presentes en las señales detectadas. (Fuente: Elaboración propia)

Tabla 9. Tiempo de retención y máximos de absorbancia (λ Max) de los pigmentos sintetizados por *Iodobacter* sp. UDEC-P20.

N° de señal detectada	Tiempo de Retención (min)	λ Max (nm)
1	11,0	264, 375, 577
2	16,0	276,370, 566

(Fuente: Elaboración propia)

Las cepas antárticas *Arthrobacter* sp. UDEC-A13, *Stenotrophomonas* sp. UDEC-A14 y *Microbacterium* sp. UDEC-A14 presentaron pigmentos del tipo carotenoides. La cepa *Arthrobacter* sp. UDEC-A13 presento 12 señales que corresponden a pigmentos, de estas, las señales 6 y 7 (Figura 8) fueron mayoritarias con máximos de absorbanza de 417, 441 y 471 nm (Tabla 10).

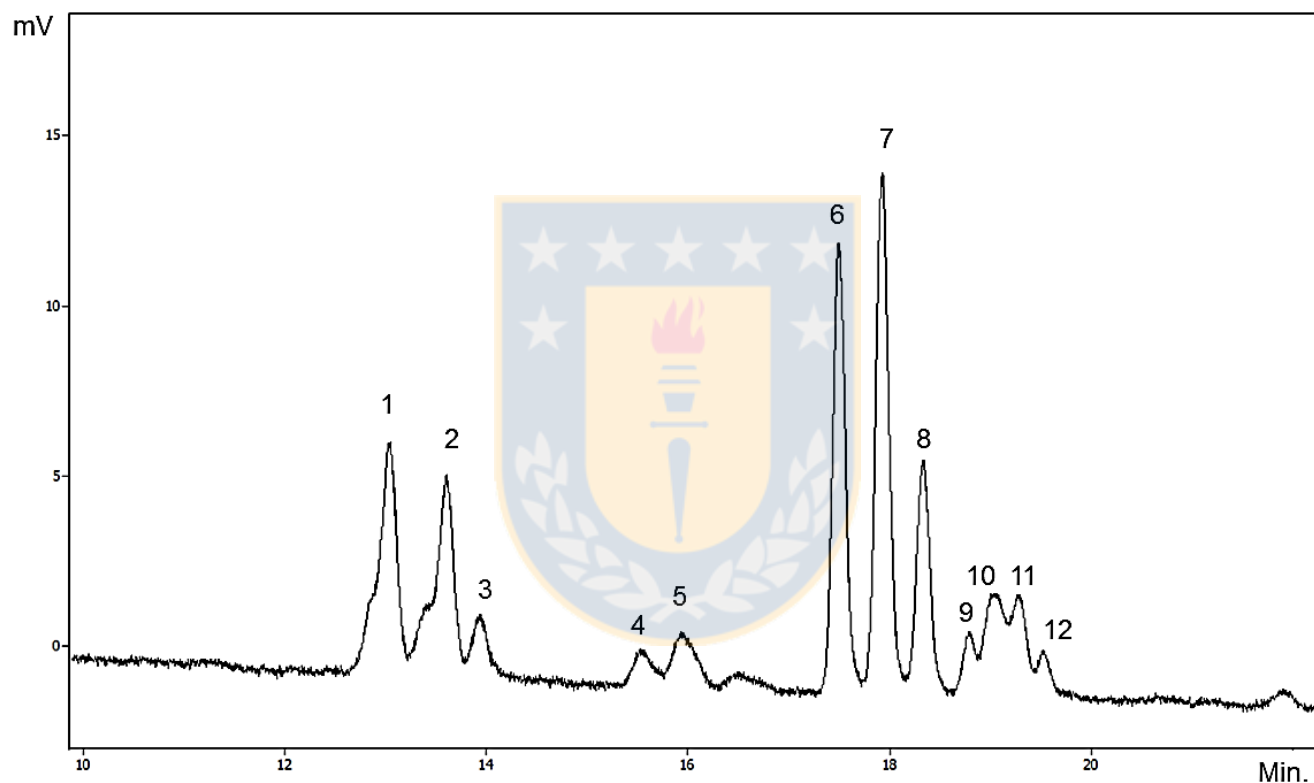


Figura 8. Cromatograma a 450 nm del extracto de *Arthrobacter* sp. UDEC-A13. Se muestran enumeradas las señales que corresponden a pigmentos. La tabla 10 muestra los tiempos de retención y máximos de absorbanza presentes en las señales detectadas. (Fuente: Elaboración propia)

Tabla 10. Tiempo de retención y máximos de absorbanza (λ Max) de los pigmentos sintetizados por *Arthrobacter* sp. UDEC-A13.

N° de señal detectada	Tiempo de Retención (min)	λ Max (nm)
1	13,0	417, 442, 471
2	13,6	417, 442, 471
3	13,9	417, 442, 471
4	15,5	414, 438, 468
5	15,9	412, 436, 464
6	17,5	417, 441, 471
7	17,9	417, 441, 471
8	18,3	418, 442, 472
9	18,8	414, 337, 467
10	19,0	414, 437, 467
11	19,3	413, 436, 466
12	19,5	413, 436, 466

(Fuente: Elaboración propia)

La cepa *Stenotrophomonas* sp. UDEC-A14 presento sólo una señal que correspondió a un pigmento con un tiempo de retención de 17 minutos (Figura 9) y con máximos de absorbanza de 400, 419 y 436 nm (Tabla 11).

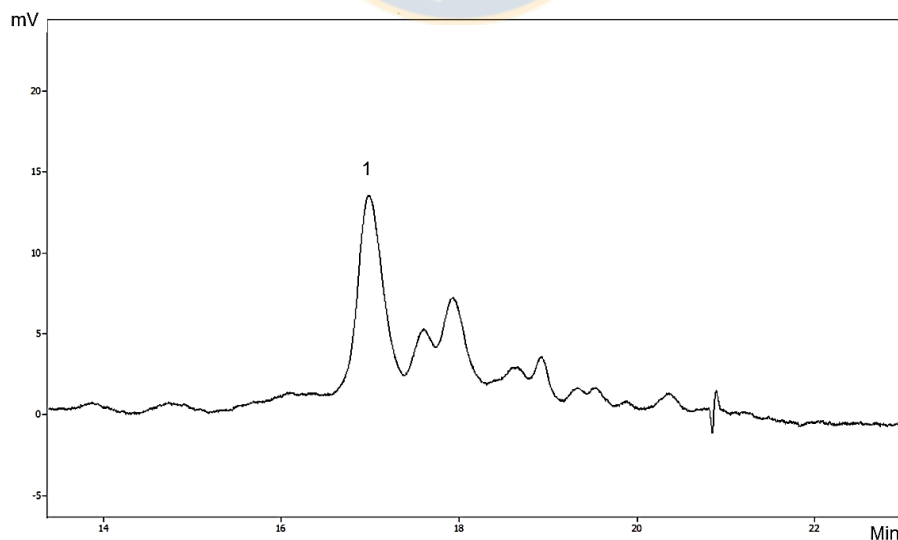


Figura 9. Cromatograma a 450 nm del extracto de *Stenotrophomonas* sp. UDEC-A14. Se muestra enumerada la única señal que corresponde a un pigmento. La Tabla 11 muestra el tiempo de retención y máximos de absorbanza presentes en la señal detectada. (Fuente: Elaboración propia)

Tabla 11. Tiempo de retención y máximos de absorbancia (λ Max) de los pigmentos sintetizados por *Stenotrophomonas* sp. UDEC-A14.

N° de señal detectada	Tiempo de Retención (min)	λ Max (nm)
1	17,0	400, 419, 436

(Fuente: Elaboración propia)

En la cepa *Microbacterium* sp. UDEC-A15 la señal más intensa (Figura 10) detectada corresponde a un carotenoide que eluyó a los 18,6 minutos, el espectrograma mostro máximos de absorbancia a los 418, 443 y 472 nm (Tabla 12)

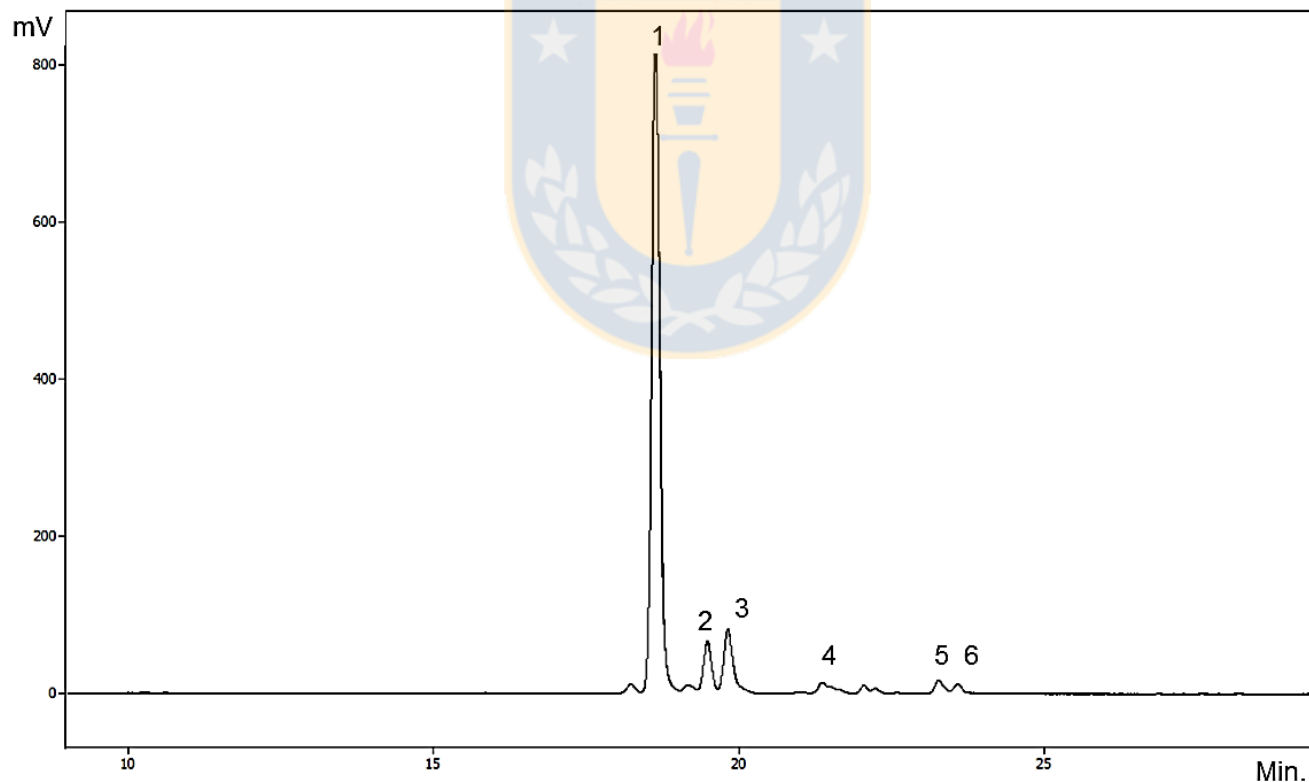


Figura 10. Cromatograma de extracto de *Microbacterium* sp. UDEC-A15. Se muestran enumeradas las señales que corresponden a pigmentos. La Tabla 12 muestra el tiempo de retención y máximos de absorbancia presentes en la señal detectada. (Fuente: Elaboración propia)

Tabla 12. Tiempo de retención y máximos de absorbanza (λ Max) de los pigmentos sintetizados por *Microbacterium* sp. UDEC-A15.

N° de señal detectada	Tiempo de Retención (min)	λ Max (nm)
1	18,6	418, 443, 472
2	19,5	414,438, 467
3	19,8	413, 438, 467
4	21,3	432, 459, 490
5	23,3	449, 473, 505
6	23,6	418, 444, 472

(Fuente: Elaboración propia)



4.4. Citotoxicidad de extractos pigmentados bacterianos

La actividad citotóxica de los extractos con pigmentos fue evaluada sobre la línea de neuroblastoma Neuro-2a, estas fueron expuestas a una concentración de 250 µg/ml de extracto durante 24 h, se midió la viabilidad celular mediante el ensayo de MTT (Figura 11).

El control positivo correspondió a la viabilidad que presentaron las células no expuestas al extracto cuya actividad metabólica se consideró como un 100% de viabilidad. La viabilidad celular disminuyó un 1.87 % en presencia del solvente en el cual se solubilizaron los extractos (DMSO 0.1 %). Por consiguiente, el cambio en la viabilidad o muerte celular es atribuido a los compuestos presentes en el extracto.

La Figura 11 muestra el porcentaje de viabilidad de la línea Neuro-2a expuestas durante 24 h al extracto. El extracto pigmentado de la cepa *Iodobacter* sp. UDEC-P20 ocasionó una disminución del 78.22 % de la viabilidad celular, mientras que el extracto de la cepa *Deinococcus* sp. UDEC-P1 lo hace en un 35.91 %, en el caso del extracto pigmentado de *Arthrobacter* sp. UDEC-A13 la viabilidad disminuye en aproximadamente un 14.13 %. Por otro lado, el extracto pigmentado de las cepas *Sphingomonas* sp. UDEC-P21 y *Microbacterium* sp. UDEC-A15 ocasionan un aumento aproximado de un 15 % de la viabilidad celular comparado con el grupo control. Finalmente, el extracto pigmentado de *Stenotrophomonas* sp. UDEC-A14 no tuvo un efecto sobre la viabilidad celular.

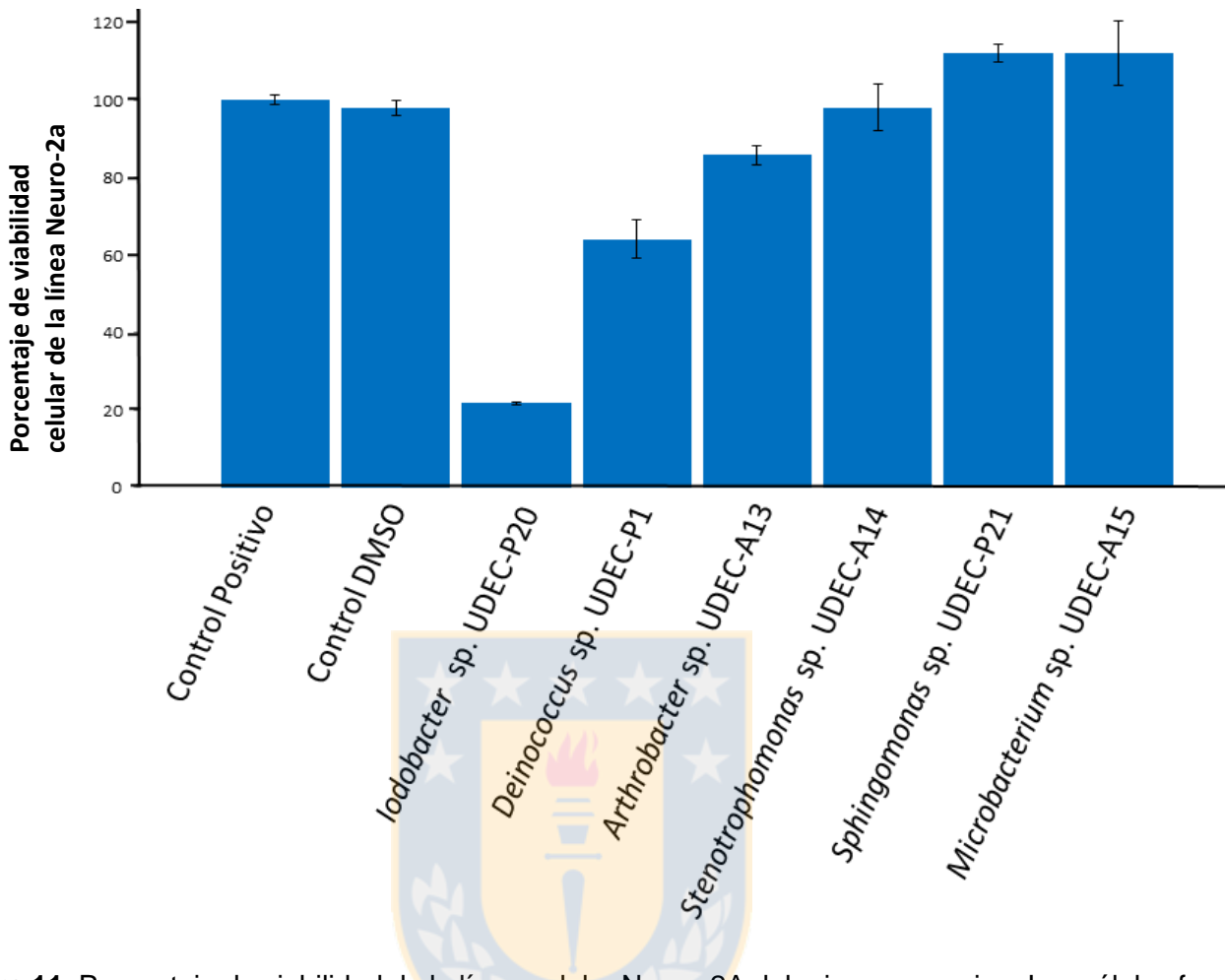


Figura 11. Porcentaje de viabilidad de la línea celular Neuro-2A del primer screening. Las células fueron expuestas durante 24 horas a una concentración de 250 µg/ml de extracto pigmentado obtenido de bacterias antárticas y patagónicas. Control positivo corresponde al cultivo de células sin extracto, la concentración de DMSO corresponde al 0,1 %. (Fuente: Elaboración propia)

De esta forma, se seleccionaron los extractos de las cepas *Deinococcus* sp. UDEC-P1, *Iodobacter* sp. UDEC-P20 y *Arthrobacter* sp. UDEC-A13 para realizar la purificación del pigmento y posteriores ensayos citotóxicos a diferentes concentraciones.

4.5. Purificación de pigmentos de las cepas *Deinococcus* sp. UDEC-P1, *Iodobacter* sp. UDEC-P20 y *Arthrobacter* sp. UDEC-A13

Para comprobar que los responsables de la actividad citotóxica sobre la línea de neuroblastoma Neuro-2a son los pigmentos presentes en el extracto, estos fueron purificados por HPLC en modo preparativo y la pureza comprobada mediante HPLC en modo analítico. Las Figuras 12, 13 y 14 muestran los cromatogramas de los extractos crudos así como de las fracciones del pigmento purificado de las cepas *Deinococcus* sp. UDEC-P1, *Arthrobacter* sp. UDEC-A13 e *Iodobacter* sp. UDEC-P20 respectivamente.

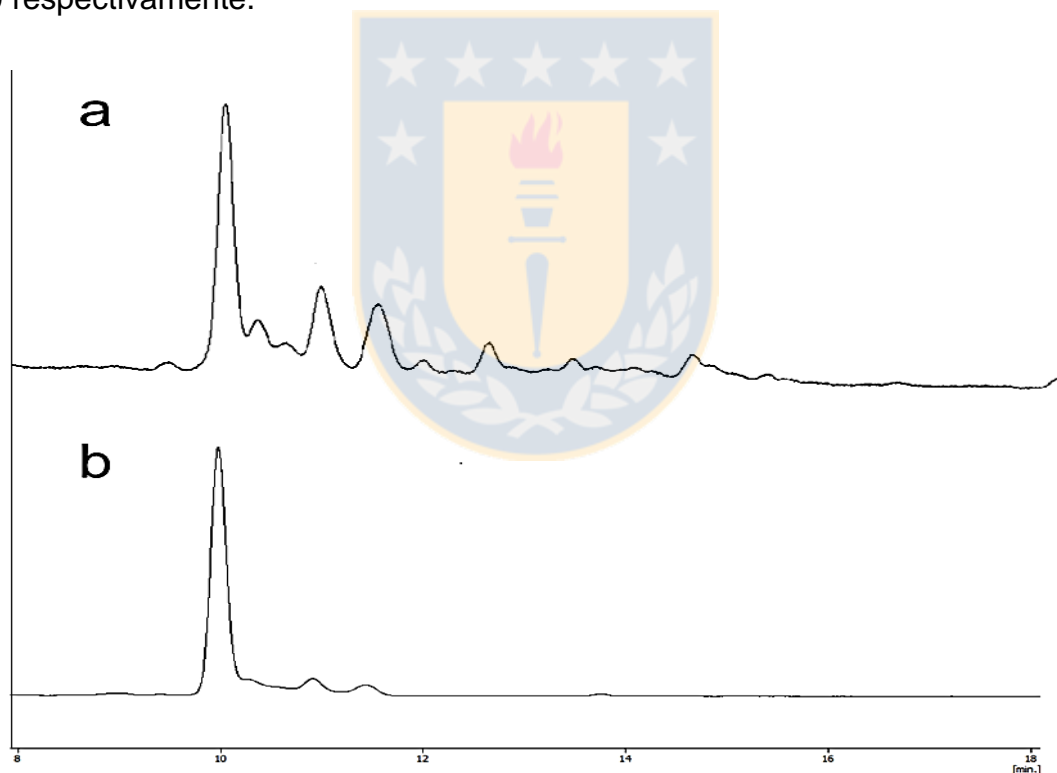


Figura 12. Purificación de pigmentos de la cepa *Deinococcus* sp. UDEC-P1. Se muestra el cromatograma del extracto crudo de *Deinococcus* sp. UDEC-P1(a) y cromatograma del carotenoide purificado (b). Todos a una longitud de onda de 450 nm. (Fuente: Elaboración propia)

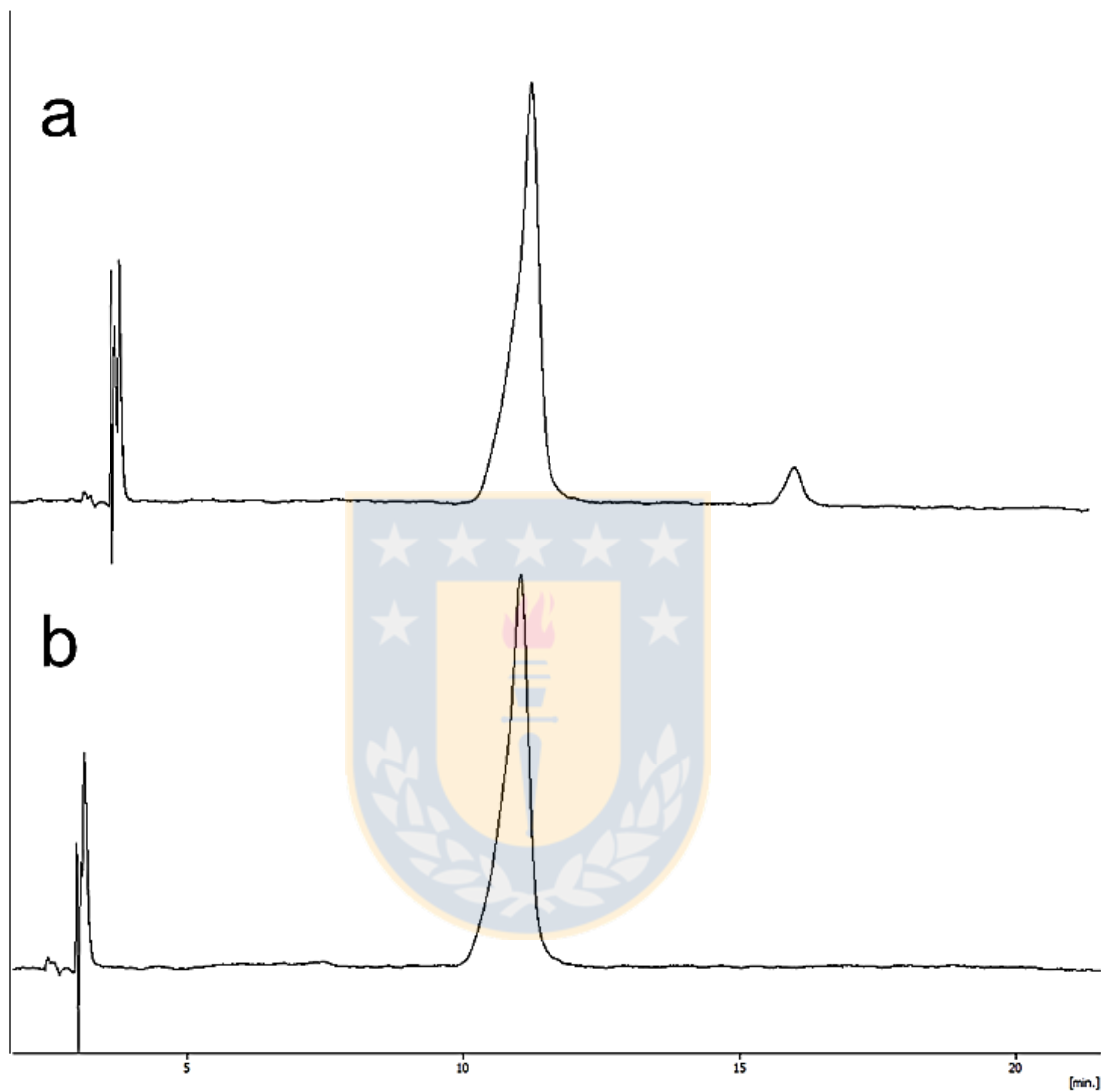


Figura 13. Purificación de pigmentos de la cepa *Iodobacter* sp. UDEC-P20. Se muestra el cromatograma del extracto crudo de *Iodobacter* sp. UDEC-P20 (a) y el cromatograma del pigmento purificado (b). Todos a una longitud de onda de 530 nm. (Fuente: Elaboración propia)

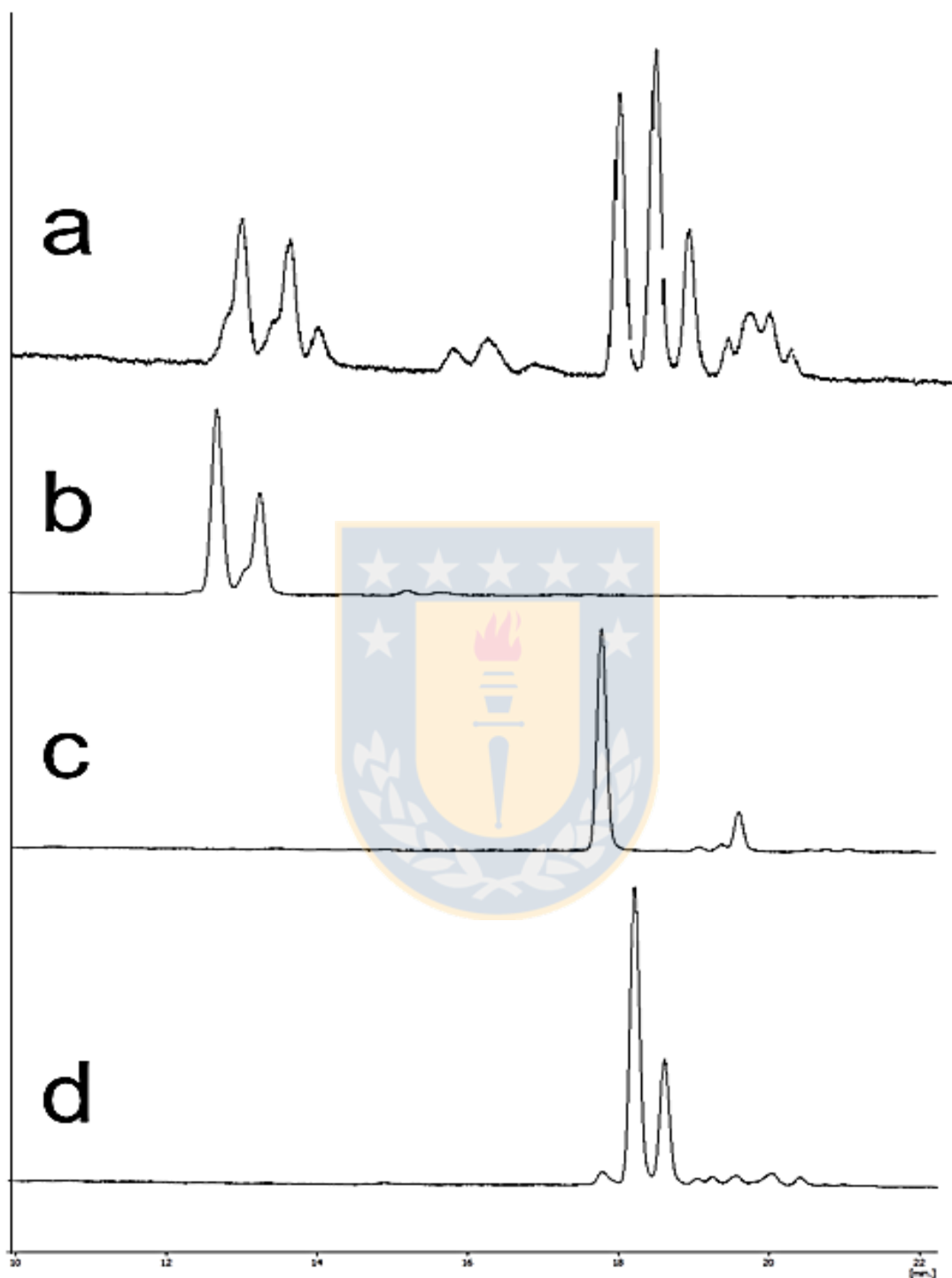


Figura 14. Purificación de pigmentos de la cepa *Arthrobacter* sp. UDEC-A13. Se muestra el cromatograma del extracto crudo (a) y de las fracciones obtenidas, estas son Fracción F1 (b), Fracción F2 (c) y Fracción F3 (d). Todos medidos a una longitud de onda de 450 nm. (Fuente: Elaboración propia)

4.6. Actividad citotóxica de pigmentos purificados

La exposición a una concentración de 40 µg/ml del pigmento de *Deinococcus* sp. UDEC-P1 ocasiono la disminución de la viabilidad de la línea Neuro-2a en un 10 %, mientras que al ser expuestas a una concentración de 40 µg/ml de las fracciones F1 y F2 de *Arthrobacter* sp. UDEC-A13 la viabilidad disminuyó en un 19.63 y 13.4 % respectivamente, caso contrario a lo ocurrido con la fracción F1 y el pigmento puro de *Iodobacter* sp. UDEC-P20, que no mostraron citotoxicidad sobre esta línea (Figura 15).

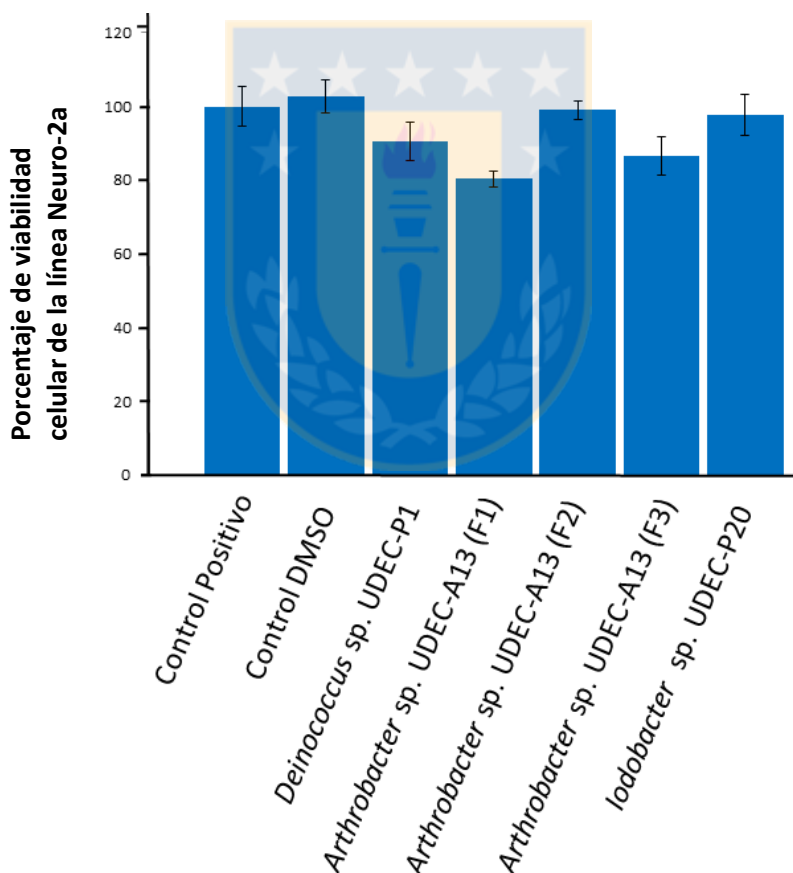


Figura 15. Porcentaje de viabilidad de la línea celular Neuro-2A. Las células fueron expuestas durante 24 horas a una concentración de 40 µg/ml de los pigmentos puros de las cepas *Deinococcus* sp. UDEC-P1, *Arthrobacter* sp. UDEC-A13, (Fracción F1, F2 y F3) e *Iodobacter* sp. UDEC-P20. Control positivo corresponde al cultivo de células sin extracto, la concentración de DMSO corresponde al 0,1 %. (Fuente: Elaboración propia)

La exposición a una concentración de 40 µg/ml de la fracción F1 de la cepa *Arthrobacter* sp ocasiono la disminución de la viabilidad de la línea MCF-7 en un 13.22 %, mientras que al ser expuestas a la F2 la viabilidad disminuyo un 10.52 %. El pigmento de la cepa *Deinococcus* sp. UDEC-P1 y el de la cepa *Iodobacter* sp. UDEC-P20 no provoco un cambio considerable de la viabilidad celular (Figura 16)

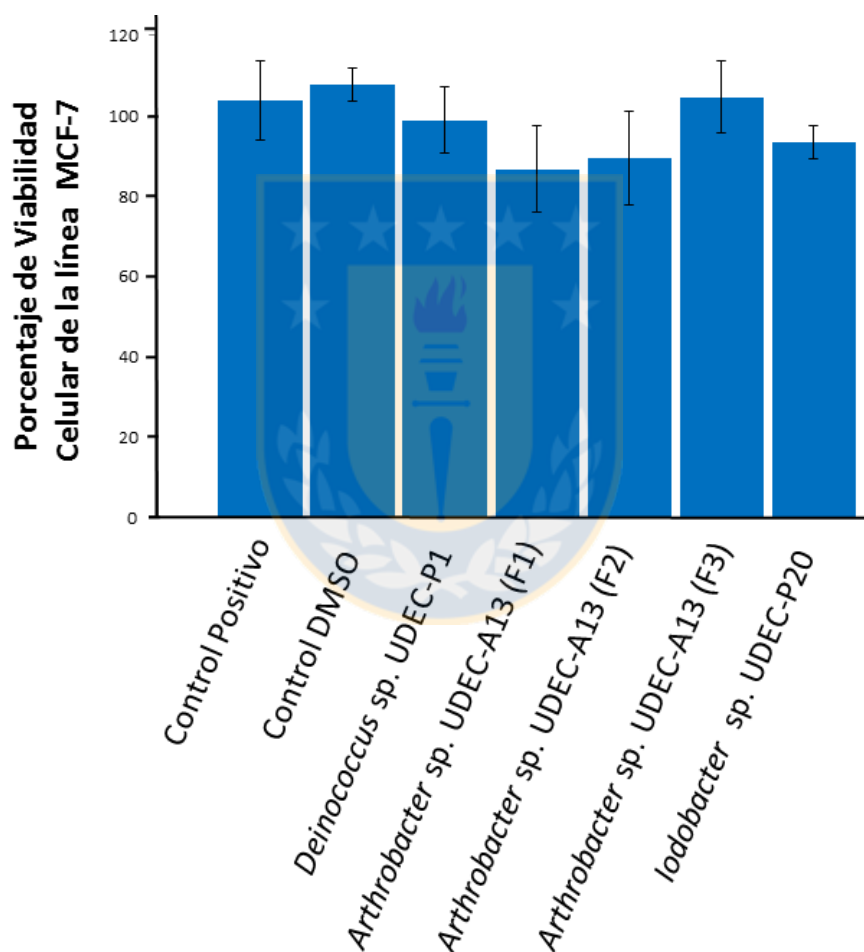


Figura 16. Porcentaje de viabilidad de la línea celular MCF-7. Las células fueron expuestas durante 24 horas a una concentración de 40 µg/ml de los pigmentos puros de las cepas *Deinococcus* sp. UDEC-P1, *Arthrobacter* sp. UDEC-A13, (Fracción F1, F2 y F3) e *Iodobacter* sp. UDEC-P20. Control positivo corresponde al cultivo de células sin extracto, la concentración de DMSO corresponde al 0,1 %. (Fuente: Elaboración propia)

Por último, la exposición a 40 µg/ml del pigmento de *Deinococcus* sp. UDEC-P1 ocasiono una disminución de la viabilidad celular de línea de osteosarcoma Saos-2 en un 37,1 %, mientras que al ser expuestas a una concentración de 40 µg/ml de la fracción F1 de *Arthrobacter* sp. UDEC-A13 la viabilidad disminuyó en un 26,33 %, caso contrario a lo ocurrido con la fracción F2, F3 y el pigmento puro de *Iodobacter* sp. UDEC-P20, que no mostraron citotoxicidad sobre esta línea (Figura 17).

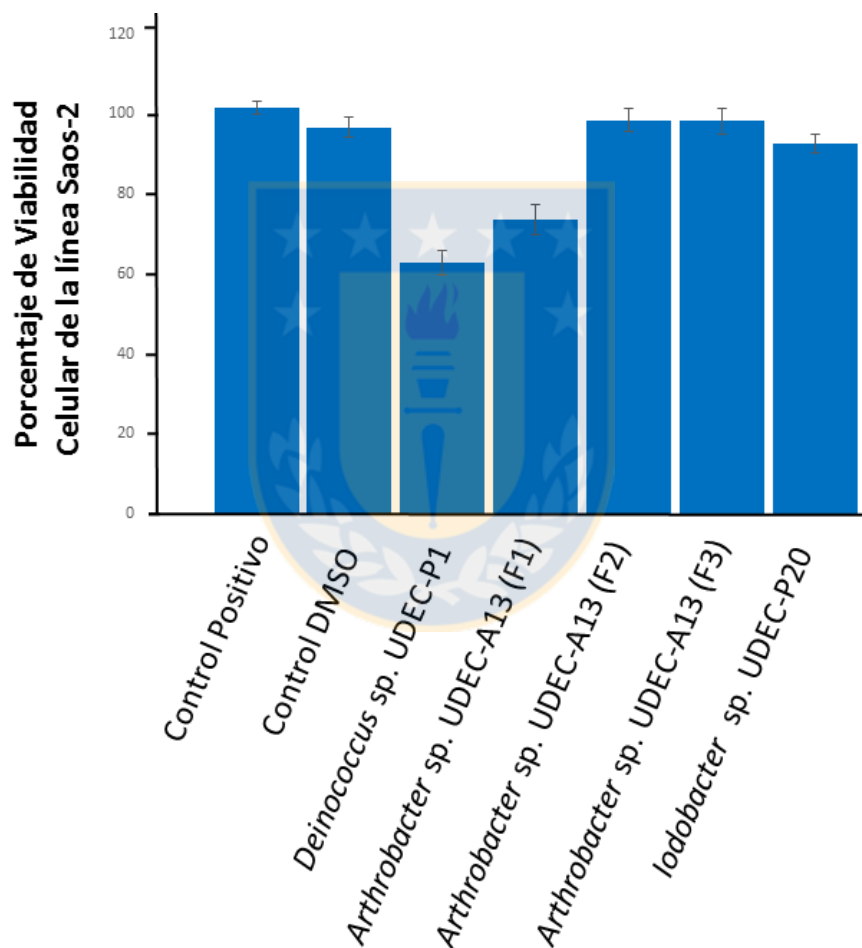


Figura 17. Porcentaje de viabilidad de la línea celular Saos-2. Las células fueron expuestas durante 24 horas a una concentración de 40 µg/ml de los pigmentos puros de las cepas *Deinococcus* sp. UDEC-P1, *Arthrobacter* sp. UDEC-A13, (Fracción F1, F2 y F3) e *Iodobacter* sp. UDEC-P20. Control positivo corresponde al cultivo de células sin extracto, la concentración de DMSO corresponde al 0,1 %. (Fuente: Elaboración propia)

5. Discusión

Detección de genes para la síntesis de policétidos en bacteria Antárticas y Patagónicas

La búsqueda de compuestos de origen natural con actividad biológica ha tomado importancia debido a que muchos de estos productos naturales pueden ser utilizados para el tratamiento de enfermedades. En el último siglo, las bacterias han sido estudiadas por su capacidad para sintetizar diferentes metabolitos secundarios con actividad biológica. En general, en bacterias, las principales rutas biosintéticas implicadas en metabolismo secundario son los que forman compuestos aromáticos, isoprenos, oligosacáridos, péptidos y policétidos (Ruiz et al., 2010), estos son un grupo de metabolitos secundarios sintetizados por plantas, hongos y bacterias, estos metabolitos se caracterizan por poseen un amplio espectro de actividad biológica como antibacteriano, antifúngico, inmunomodulora y citotóxica (Hofle et al., 1996; Loper et al., 2008; Fenical et al., 2009).

Los policétidos son sintetizados por un complejo multienzimático denominado Policetido Sintasa (PKS) el cual es codificado por un operón el cual posee sitios conservados en el gen codifica para el dominio ceto sintasa (KS) del complejo (Piel et al., 2004). Zhao et al. (2008) demostró que las secuencias PKS obtenidas a partir de bacterias antárticas tienen menos de un 80 % de similitud con las secuencias disponibles en la base de datos GenBank, lo que implica que bacterias de estos ambientes tienen la capacidad para sintetizar policétidos químicamente diferentes a los descritos, por lo que la búsqueda de compuestos bioactivos en este tipo de microorganismos permitiría encontrar una nueva fuente de moléculas con un

potencial uso como drogas para el tratamiento del cáncer. Así, con el objetivo de detectar el complejo policétido sintasa en bacterias antárticas y patagónicas, se utilizó un par de partidores degenerados para amplificar el dominio cetosintasa del complejo PKS (Piel et al., 2004; Schirmer et al., 2005; Fieseler et al., 2007). Un total de 20 cepas aisladas desde la Antártica seleccionadas para la búsqueda del complejo policétido sintasa, de estas, las cepas *Stenotrophomonas* sp. UDEC-A14, *Stenotrophomonas* sp. UDEC-A3 y *Microbacterium* sp. UDEC-A15 correspondientes al 15% presentaron producto de amplificación, mientras que, de 20 cepas bacterianas patagónicas, las cepas *Flavobacterium* sp. UDEC-P22, *Pseudomonas* sp. UDEC-P23 y *Pseudomonas* sp. UDEC-P24 correspondientes al 15% presentaron producto de amplificación. De acuerdo con los resultados del BlastX, la identidad de los productos de amplificación de las cepas *Stenotrophomonas* sp. UDEC-A14 y *Stenotrophomonas* sp. UDEC-A3 corresponden a un receptor dependiente de TonB, estas son una familia de proteínas β -barril que se ubican en la membrana externa de las bacterias Gram negativas, la función de estas proteínas es recibir señales externas y transformarlas en señales intracitoplasmáticas, lo que lleva a la activación transcripcional de genes diana (Koebnik, 2000). Estos receptores están asociados con la absorción y el transporte sustratos como sideróforos de hierro y vitamina B12 (Koebnik, 2000). La identidad del amplicón de la cepa *Pseudomonas* sp. UDEC-P23 correspondió a un regulador transcripcional YiaG, mientras que la identidad del amplicón de la cepa *Pseudomonas* sp. UDEC-P23 correspondió a una enzima sulfóxido reductasa. Estos resultados indican que la identidad de los amplicones secuenciados de las cepas *Stenotrophomonas* sp. UDEC-A3, *Stenotrophomonas* sp. UDEC-A14,

Pseudomonas sp. UDEC-P23 y *Pseudomonas* sp. UDEC-P24 no corresponden a genes policétido sintasa, mientras que la secuencia de aminoácidos de *Microbacterium* sp. UDEC-A15 y *Flavobacterium* sp. UDEC-P22 muestran que no se pudo determinar la función o identidad de la proteína. Con estas secuencias se realizó un alineamiento para la búsqueda de un patrón conservado presente en el dominio KS, este patrón N(DV)KD está ubicado 22 aminoácidos río arriba de la cisteína del sitio activo V(QE)TACS(TS)S (Moffitt et al., 2003). El patrón descrito no fue encontrado en las secuencias de aminoácidos de la cepa *Microbacterium* sp. UDEC-A15 y *Flavobacterium* sp. UDEC-P22, por lo que de acuerdo a los resultados se puede inferir que la identidad de estos amplicones no corresponde a genes Policétido Sintasa (PKS). Resultados similares fueron reportados por Fieseler et al (2007), al amplificar el dominio KS en bacterias simbiotes de esponjas utilizando partidores usados en el presente trabajo, solo un 8% de los amplicones correspondieron a los genes PKS, por otro lado, Piel et al. (2004), Zhang et al. (2009), Kurnia et al. (2017) detectaron los genes PKS, no obstante, no reportaron que porcentaje de los amplicones correspondió a genes PKS.

Las secuencias de los amplicones de las cepas bacterianas utilizadas en este estudio indican que los productos de PCR no corresponden al dominio ceto sintasa del complejo policétido sintasa. Esto puede explicarse debido a que los partidores degenerados hibridaron con el templado ADN de forma inespecífica, ya que a medida que aumenta la degeneración de los partidores, estos pierden especificidad (Linhart et al., 2002). Por lo que se propone que para detectar estos genes mediante PCR se utilicen partidores más confiables a los descritos por Piel et al. (2004) o en

su defecto, utilizar otra técnica como hibridación, ya que se ha demostrado que esta última es más efectiva que la PCR (Gerrish et al., 2007).

Debido a que los genes detectados no pertenecen a los de interés, estas bacterias no se incluyeron en los ensayos de citotoxicidad ya que no tendrían la capacidad para sintetizar metabolitos bioactivos de la familia de los policétidos, los cuales eran los de interés de este trabajo.

Caracterización de pigmentos bacterianos

Las 6 cepas bacterianas utilizadas en este estudio mostraron sintetizar pigmentos diferentes, siendo los más abundantes los del tipo carotenoides, este es un grupo de pigmentos ampliamente distribuido en la naturaleza, son estructural y funcionalmente diversos, se presentan en tonos que van desde el color rojo hasta amarillo en una amplia variedad de bacterias, algas, hongos y plantas. Se ha demostrado que los carotenoides juegan un rol importante en la resistencia a distintos tipos de estrés, por ejemplo, cepas antárticas pigmentadas, presentan carotenoides los que les permiten a estas bacterias soportar radiación ultravioleta y ciclos de congelamiento y descongelamiento (Dieser et al., 2010), *Arthrobacter agilis* MB813 sintetiza un carotenoide llamado bacterioruberina que le permite soportar cambios de osmolaridad y temperatura (Fong et al., 2001). Los pigmentos del tipo carotenoides representan una clase de moduladores de fluidez de la membrana. Se postula que tanto pigmentos carotenoides polares como apolares sintetizados por diferentes bacterias ayudan a mantener la fluidez y homeoviscosidad de la membrana durante las fluctuaciones de temperatura en ambientes antárticos (Chattopadhyay, 2006; Rodrigues et al., 2008).

Como los resultados lo muestran, *Deinococcus* es un género bacteriano que se caracteriza por sintetizar un carotenoide denominado deinoxantina, esta fue descrita por primera vez en la especie *Deinococcus radiodurans* (Lemee et al., 1997). De acuerdo a los resultados obtenidos del análisis por HPLC, la cepa *Deinococcus* sp. UDEC-P1 sintetiza un carotenoide que presenta 3 máximos de absorbancia a los 458, 482 y 510 nm en acetona. Saito et al. (1998) describió para la deinoxantina obtenida de *Deinococcus radiodurans* presenta un espectro de absorción con máximos de 454, 480 y 507 nm en acetona. Ambos espectros de absorción son similares entre sí, por lo que el pigmento sintetizado por *Deinococcus* sp UDEC-P1 podría corresponder a deinoxantina.

Se ha descrito que la deinoxantina participa en la resistencia a radiaciones UV (Ji, 2010). Este pigmento es el producto principal en la vía de síntesis de carotenoides en esta bacteria y tiene una mayor habilidad para secuestrar peróxido de hidrógeno que otros los carotenos licopeno y β -caroteno (Slade et al., 2011). No obstante, los distintos carotenoides parecen tener poca participación en la resistencia a radiación, pues hay cepas de *Deinococcus radiodurans* mutantes que carecen de pigmentos que son tan resistentes a radiaciones ionizantes y UV como la cepa nativa por lo que se ha mostrado que los carotenoides no serían indispensables en *Deinococcus radiodurans* (Battista et al., 1999). Se ha demostrado que el ADN de *Deinococcus radiodurans* es tan sensible a la rotura inducida por radiación como el ADN de otras bacterias (Burrell et al., 1971; Bonura et al., 1976; Gérard et al., 2001). Por lo que la resistencia a la radiación extrema se correlaciona a la capacidad extraordinaria para

reparar el daño masivo del ADN causado por la radiación ionizante o luz ultravioleta (krisko et al., 2013).

En el caso de la cepa *Sphingomonas* sp. UDEC-P21, el pigmento más abundante mostro máximos de absorbancia de 432, 454, 483 similares a los descritos por Jenkins et al. (1979) para el pigmento Nostoxantina con λ Max de 428, 453 y 480 nm, Este carotenoide es in derivado del β -caroteno y ha sido aislados solamente de algunas bacterias como *Brevundimonas* sp. SD212, *Brevundimonas vesicularis* DC263, *Thermosynechococcus elongatus* BP-1 y *Sphingomonas* (Iwai et al., 2008; Nishida et al., 2005; Tao et al., 2006; Zhu et al., 2012). Por lo que, el pigmento sintetizado por *Sphingomonas* sp. UDEC-P21 podría corresponder a Nostoxantina descrito en *Sphingomonas*.

La cepa *Iodobacter* sp. UDEC-P20 mostro un espectrograma cuyas señales muestran máximos de absorbancia a los 264, 375 y 577 nm, este patrón no corresponde a espectros típicos de carotenoides (400 – 550 nm). En efecto, se ha descrito que las bacterias del genero *Iodobacter* sintetizan un pigmento violeta denominado violaceina (Logan, 2005), este pigmento tiene máximos de absorbancia de 375 y 575 nm en metanol (Asencio et al., 2014), los cuales son similares a los encontrados en *Iodobacter* sp. UDEC-P20, por lo que el pigmento sintetizado por esta cepa, corresponderia a violaceina. Este pigmento también es sintetizado por *Chromobacterium*, *Collimonas*, *Duganella*, *Janthinobacterium* y *Pseudoalteromonas* (Choi et al., 2015) y se ha demostrado que mutantes incapaces de sintetizar violaceina disminuyen su capacidad de sobrevivencia frente a radiación

ultravioleta, demostrando que este tipo de pigmento ejerce un rol fotoprotector (Abboud et al., 2013).

Por otro lado, las cepas antárticas *Arthrobacter* sp. UDEC-A13, *Stenotrophomonas* sp. UDEC-A14 y *Microbacterium* sp. UDEC-A14 presentaron diferentes tipos de pigmentos. En la cepa *Arthrobacter* sp. UDEC-A13, la señal más intensa presenta máximos de absorbancia de 417, 441 y 471 nm, estos pigmentos pueden corresponder al carotenoide descrito en *Arthrobacter glacialis* denominado Decaprenoxantina (Arpin et al., 1975) cuyos máximos de absorbancia en acetona son a los 419, 443 y 472 nm (Liaaen-Jensen et al., 1968), la decaprenoxantina es una carotenoide C50, el cual en su ruta biosintéticas puede ser glicosidado a ambos extremos de la molécula (Krubasik et al., 2001).

La cepa antártica *Stenotrophomonas* sp. UDEC-A14 sintetiza un pigmento con máximos de absorbancia de 400, 419 y 436 nm, dichos máximos de absorbancia no coinciden con ningún carotenoide descrito, por lo que no fue posible determinar una identidad aproximada del pigmento. Sin embargo, la cepa pertenece al género *Stenotrophomonas*, genero creado para ubicar a *Xanthomonas maltophilia* (Palleroni et al., 1993). Se ha descrito que las bacterias del genero *Xanthomonas* producen un pigmento de naturaleza carotenoide denominado Xanthonomadina. Se ha señalado que este pigmento es una característica determinante para la diferenciación entre el género *Xanthomonas* y *Stenotrophomonas* (Palleroni et al., 1993). En consecuencia, el pigmento sintetizado por *Stenotrophomonas* sp. UDEC-A14 no correspondería a Xanthonomadina. En este sentido, Stainer et al., (1966) sugiere el pigmento sintetizados por bacterias del genero *Stenotrophomonas*

corresponde a algún tipo de flavinas, por lo que la naturaleza del pigmento podría determinarse mediante comparación de su Masa Molecular y/o Espectroscopia de Resonancia Magnética Nuclear (RMN).

La cepa *Microbacterium* sp. UDEC-A15 sintetiza un pigmento carotenoide con máximos de absorbancia de 418, 443 y 472 nm. Se ha descrito que bacterias del genero *Micrococcus* sintetizan diversos carotenoides, por ejemplo, *Microbacterium pumilum* NIT-D sintetiza como pigmento mayoritario la Zeaxantina (Das et al., 2016), cuyos máximos de absorbancia en acetona son a los 430, 452 y 479 nm (Sajilata et al., 2008), también ha sido descrita la síntesis de Licopeno en *Microbacterium arborescens* (Godinho et al., 2008), con máximos de absorbancia de 445, 473 y 505 nm en acetona (Yodjun et al., 2011). Meddeb-Mouelhi et al. (2016) aisló un carotenoide de la cepa *Microbacterium oxydans*, determinando que los máximos de absorbancia en metanol son de 415, 435 y 465 nm, con una diferencia de 20 y 30 nanómetros en sus 3 máximos de absorbancia, distancias similares a las del carotenoide de *Microbacterium* sp. UDEC-A15 (con 20 y 30 nm), por lo que se puede inferir que el pigmento sintetizado por esta cepa correspondería al descrito en *Microbacterium oxydans*.

Citotoxicidad de pigmentos bacterianos

El cáncer se define como una enfermedad en la que células anormales se dividen sin control y pueden invadir los tejidos cercanos cuyo tratamiento consiste en la administración al paciente de distintas drogas, de las cuales se ha descrito que aproximadamente el 50 % son de origen natural o derivados de estos, siendo plantas, hongos y bacterias los principales productores de estos.

La multirresistencia a drogas de células cancerosas es la habilidad de estas a sobrevivir o crecer posterior al tratamiento anticáncer, se postula que la heterogenicidad celular del tumor sea la causante de este fenómeno, se basa en la idea de que los tumores están compuestos de diferentes poblaciones de células que morfológica y fenotípicamente diferentes (Marusyk et al., 2010). Ciertas poblaciones celulares de cáncer pueden poseer características inherentes, tales como las mutaciones y/o cambios epigenéticos, que confieren resistencia a los medicamentos (Marusyk et al., 2010). La multiresistencia a drogas es el principal factor por el que muchos tipos de cáncer desarrollan resistencia a los medicamentos usados en la quimioterapia (Zahreddine et al., 2013).

Así, la búsqueda de nuevos productos naturales para el tratamiento de esta enfermedad es necesaria y puede incluirse microorganismos de ambientes extremos como fuente de moléculas bioactivas con potencial para el tratamiento de esta enfermedad (Cragg et al., 2013).

Los resultados de los ensayos citotóxicos realizados con la línea Neuro-2a mostraron que 3 de los 6 extractos de bacterias pigmentadas utilizados en el primer screening fueron ser citotóxicos. Los extractos no citotóxicos correspondieron los de las cepas *Sphingomonas* sp. UDEC-P21 y *Microbacterium* sp. UDEC-A15, cuyo análisis indico que pertenecen al grupo de los carotenoides, en consecuencia, estos pigmentos no serían citotóxicos sobre otras líneas celulares, por lo que podrían tener una potencial aplicación biotecnológica y deberá ser corroborada usando modelos celulares relacionados a su potencial aplicación. Los colorantes sintéticos han sido ampliamente utilizados en diversas industrias, incluyendo alimenticia, textil y cosmética, estos han sido prohibidos debido a su hiperalergenicidad, carcinogenicidad y otros problemas toxicológicos (Amchova et al., 2015). Debido a esto, se ha generado un aumento en la demanda de colorantes o pigmentos de origen natural (Downham et al., 2000; Lakshmi, 2014; Saini et al., 2017) por lo que los carotenoides de las cepas *Microbacterium* sp. UDEC-A15 y *Sphingomonas* sp. UDEC-P21 pueden ser proyectados para su uso como colorantes en la industria alimenticia.

Por otro lado, los extractos de las cepas *Arthrobacter* sp. UDEC-A13, *Deinococcus* sp. UDEC-P1 e *Iodobacter* sp. UDEC-P20 mostraron ser citotóxicos a una concentración de 250 µg/ml sobre la línea Neuro-2a. Los principales pigmentos de estos extractos fueron purificados para determinar la citotoxicidad de estos.

El principal pigmento sintetizado por *Iodobacter* sp. UDEC-P20 fue identificado como violaceina, un pigmento que ha sido descrito en bacterias del genero *Iodobacter* (Logan, 2005). Los resultados mostraron que el extracto crudo de *Iodobacter* sp. UDEC-P20 a una concentración de 250 µg/ml disminuyo considerablemente la viabilidad celular de línea Neuro-2a, no obstante, al ser expuesta al pigmento purificado la viabilidad celular no fue afectada, mismos resultados fueron observados en las líneas Saos-2 y MCF-7. La violaceina es un pigmento violeta que ha sido descrito presentar citotoxicidad en diferentes líneas celulares de cáncer, por ejemplo, Rahul et al. (2015) reportó que la IC50 de la violaceina sobre la línea MCF-7 está en un rango desde 98 a 158 µg/ml, por lo que, la alta citotoxicidad que presento el extracto crudo de la cepa *Iodobacter* sp. UDEC-P20 pueda ser ocasionado por un compuesto que actúa de forma sinérgica con la violaceina.

El principal carotenoide sintetizado por *Deinococcus* sp. UDEC-P1 fue identificado como deinoxantina. Los resultados muestran que el extracto crudo de *Deinococcus* sp. UDEC-P1 a una concentración de 250 µg/ml disminuyo considerablemente la viabilidad celular de línea Neuro-2a, no obstante, al ser expuesta al pigmento purificado en una concentración de 40 µg/ml durante 24 h la citotoxicidad fue menor, esto supone que puede ser producto de un efecto sumatorio o sinergismo entre alguno de los compuestos presentes en el extracto y la deinoxantina. En efecto, se demostró que este último posee actividad citotóxica por sí solo, ya que la línea Saos-2 disminuyo su viabilidad en un 37.1% al ser expuesta a 40 µg/ml durante 24 h, lo que sugiere un efecto específico sobre este tipo de línea celular de cáncer. Choi et

al. (2014) realizó un estudio en el cual evaluó la citotoxicidad de la deinoxantina de la especie *Deinococcus radiodurans*, siendo este citotóxico de manera dosis dependiente en las líneas HepG2, HT-29 y PC-3, se determinó una IC50 de 59 μM (31.2 $\mu\text{g/ml}$) para la línea celular HepG2, 61 μM (32.2 $\mu\text{g/ml}$) para la línea HT-29 y 77 μM (40.7 $\mu\text{g/ml}$) para la línea celular PC-3, por lo que en términos generales, la deinoxantina de *Deinococcus radiodurans* tiene mayor efecto citotóxico que la deinoxantina de *Deinococcus* sp. UDEC-P1, no obstante, este último posee actividad citotóxica selectiva sobre la línea celular Saos-2, por lo que, al determinar el mecanismo de acción de este compuesto, se puede proyectar un posible uso como droga antitumoral, por lo que afectaría solamente células de osteosarcoma evitando los efectos secundarios producto de la quimioterapia.

El extracto crudo de *Arthrobacter* sp. UDEC-A13 mostro 12 carotenoides diferentes, este fue citotóxico a una concentración de 250 $\mu\text{g/ml}$ en la línea Neuro-2a, sus pigmentos fueron purificados, obteniéndose 3 fracciones denominadas F1, F2 y F3 para evaluar su actividad citotóxica. Los resultados mostraron que esta fracción a una concentración de 40 $\mu\text{g/ml}$ disminuyó la viabilidad de todas las líneas celulares utilizadas en este estudio en un porcentaje que está entre un 13.22 y 26.33%. Estos resultados indican que estos pigmentos provocan la muerte celular de forma no específica sin discriminar la naturaleza o el origen de esta, en consecuencia, se podría proyectar el estudio de este carotenoide para su uso terapéutico frente a distintos tipos de cáncer, lo que deberá ser estudiado posteriormente.

Los pigmentos encontrados en la cepa *Arthrobacter* sp. UDEC-A13 podrían corresponder a decaprenoxantina, o sus derivados como decaprenoxantina

monoglucosa y decaprenoxantina diglucosa. En efecto, este tipo de pigmentos han sido descrito en otras cepas pertenecientes al género *Arthrobacter* (Arpin et al., 1975). La decaprenoxantina es un carotenoide C50, estos derivan de la estructura de un carotenoide C40 a los cuales se le añaden dos unidades de isopreno (Britton et al., 2004), hasta la fecha se ha descrito que estos carotenoides C50 son sintetizados solamente por Bacterias y Archeas (Yang et al., 2015). No obstante, no se ha descrito en la literatura que el carotenoide decaprenoxantina o sus derivados tengan actividad citotóxica sobre líneas celulares de cáncer, por lo que este sería el primer reporte de citotoxicidad de este pigmento.

En general, se ha descrito que algunos carotenoides poseen actividad similar a la descrita en este estudio, por ejemplo, la crocina, un carotenoide aislado de *Crocus sativus* posee actividad citotóxica sobre las líneas de cáncer colorectal HCT-116, SW-480 and HT-29 (Aung et al., 2007), la Genisteina, una isoflavona de la Soya, inhibe el crecimiento celular de las líneas LNCaP y PC-3 (Susuki et al., 2002). Neoxantina y fucoxantina de dinoflagelados inhibe el crecimiento de las células PC-3 (Kotake-Nara et al., 2005). Violaxantina aislada de *Dunaliella tertiolecta* inhibe el crecimiento de la línea celular MCF-7 a una concentración de 40 µg/ml (Pasquet et al., 2011). *Halobacterium*, una Archea sintetiza un carotenoide que posee un efecto citotóxico sobre la línea HepG2 (Abbes et al., 2013). De esta manera, los resultados de los ensayos de citotoxicidad MTT para determinar si existe actividad citotóxica de los pigmentos de las cepas *Deinococcus* sp. UDEC-P1 y *Arthrobacter* sp. UDEC-A13 son similares a los resultados obtenidos en las investigaciones mencionadas anteriormente.

La apoptosis es una vía de destrucción o muerte celular programada, esta es provocada por el mismo organismo con el fin de controlar su desarrollo y crecimiento, puede ser de naturaleza fisiológica y está desencadenada por señales celulares controladas genéticamente (Tsujiimoto, 1998). Las proteínas que regulan la apoptosis pertenecen a la familia de la proteína Bcl-2, esta se subdivide en 3 grupos, una subfamilia incluyendo Bcl-2, Bcl-XL y Bcl-w las que se caracterizan por evitar la apoptosis inducida por estímulos como shock térmico y reactivos quimioterapéuticos. Otra subfamilia comprende las proteínas Bax y Bak, encargadas de la actividad proapoptotica en la célula, finalmente existe una tercera subfamilia denominada BH3 (Tsujiimoto, 1998). Bcl-2 y Bcl-xL se localizan en la membrana mitocondrial, así como también en la membrana del retículo endoplásmico y envoltura nuclear. En las mitocondrias, Bcl-2 y Bcl-xL evitan la apoptosis asociada liberación de factores apoptogénicos, como el citocromo c (Tsujiimoto, 1998). En células cancerígenas, las proteínas de la familia Bcl están alteradas de forma que se promueve su sobreexpresión, evitando que estas entren en estado de apoptosis (Yip et al., 2008). Por otro lado, algunos carotenoides tienen efecto sobre algunas proteínas relacionadas a la regulación de la apoptosis ya que regulan negativamente la expresión de las proteínas antiapoptoticas Bcl-2 y Bcl-xL, mientras que regulan positivamente la expresión de las proteínas proapoptoticas Bax y Bak en diferentes líneas celulares de cáncer (Palozza et al., 2002; Palozza et al., 2009; Kim et al., 2010; Bi et al., 2013; D'Alessandro et al., 2013). Por lo que, el mecanismo de citotoxicidad mostrada por los carotenoides de las cepas *Deinococcus* sp. UDEC-P1 y *Arthrobacter* sp. UDEC-A13 pueda estar relacionada a la inducción de apoptosis estimulando la sobreexpresión de proteínas pro-

apoptoticas Bax y Bak y/o disminuyendo la expresión de proteínas antiapoptoticas Bcl-2 y Bcl-xL, por lo que estudios posteriores serían necesarios para dilucidar esta hipótesis.



6. Conclusiones

1. Los principales pigmentos no difusibles sintetizados por bacterias aisladas de ambientes extremos pertenecen al grupo de los carotenoides, algunos de estos presentan amplio o reducido espectro actividad citotóxica sobre diferentes líneas celulares de cáncer, por lo que, estos microorganismos son una fuente de compuestos con potencial uso farmacológico en el tratamiento del cáncer.

2. Por la degeneración de los partidores utilizados en este estudio, los genes Policétido Sintasa no pudieron ser detectados, por lo que es necesario evaluar otras técnicas de detección para estos genes.



7. Proyecciones

Dado que los pigmentos de las cepas *Deinococcus* sp. UDEC-P1 y *Arthrobacter* sp. UDEC-A13 presentaron actividad citotóxica, en consecuencia, se podría proyectar el uso del pigmento de *Deinococcus* sp. UDEC-P1 en el tratamiento de Osteosarcoma, ya que este presentó actividad inhibitoria solo sobre la línea Saos-2, mientras que el pigmento de *Arthrobacter* sp. UDEC-A13 presentó actividad citotóxica sobre todas las líneas celulares utilizadas en este estudio, este podría proyectarse como fármaco para el tratamiento de distintos tipos de cáncer.

Los colorantes sintéticos han sido ampliamente utilizados en diversas industrias, incluyendo alimenticia, textil, cosmética y de productos farmacéuticos. Sin embargo, muchos han sido prohibidos debido a su hiperalergenicidad, carcinogenicidad y otros problemas toxicológicos. Debido a esto, se ha generado un aumento en la demanda de colorantes o pigmentos de origen natural (Downham, et al., 2000; Lakshmi, 2014; Saini, et al., 2017). Los resultados obtenidos en este estudio determinaron que los pigmentos de las cepas *Microbacterium* sp. UDEC-A15 y *Sphingomonas* sp. UDEC-P21 no poseen actividad citotóxica, por lo que se puede proyectar el uso de estos carotenoides como colorantes de origen natural para la industria alimenticia.

8. Bibliografía

1. Abbes M, Baati H, Guermazi S, Messina C, Santulli A, Gharsallah H, Ammar E. (2013) Biological properties of carotenoids extracted from *Halobacterium halobium* isolated from a Tunisian solar saltern. BMC Complementary and Alternative Medicine 13:255
2. Abboud A, Arment A. (2013) The protective effects of the violacein pigment against UV-C irradiation in *Chromobacterium violaceum*. Ohio J Sci 111:28-32.
3. Abdelnasser S. (2008) Production of Carotenoids by a Newly Isolated Marine *Micrococcus* sp. Biotechnology 7: 469-474.
4. Agogue H, Joux F, Obernosterer I, Lebaron P. (2005) Resistance of marine bacterioneuston to solar radiation. Appl Environ Microbiol 71: 5282-5289.
5. Amchova P, Kotolova H, Ruda-Kucerova J (2015). Health safety issues of synthetic food colorants. Regulatory toxicology and pharmacology. 30:1-9
6. Auclair K, Sutherland A, Kennedy J, Witter D, Van den Heever J, Hutchinson C, Vederas J. (2000) Lovastatin nonaketide synthase catalyzes an intramolecular diels-alder reaction of a substrate analogue. J Am Chem Soc 122: 11519-11520.
7. Asencio G, Lavina P, Alegría K, Domínguez M, Bello H, González-Rocha G, González-Aravena M. (2014) Antibacterial activity of the Antarctic bacterium *Janthinobacterium* sp. SMN 33.6 against multi-resistant Gram-negative bacteria. Electron J Biotechnol 17:1-5.
8. Arpin N, Fiasson J, Norgård S, Borch G, Liaaen-Jensen S. (1975) C50-carotenoids from *Arthrobacter glacialis*. Acta Chem. Scand. 29: 921-926.
9. Aung H, Wang C, Ni M, Fishbein A, Mehendale S, Xie J, Shoyama C, Yuan C. (2007) Crocin from *Crocus sativus* possesses significant anti-proliferation effects on human colorectal cancer cells. Exp Oncol. 29(3):175-80.

10. Barros J, Becerra J, González C, Martínez M. (2013) Antibacterial metabolites synthesized by psychrotrophic bacteria isolated from cold-freshwater environments. *Folia Microbiol* 58:127–133.
11. Battista J, Earl A, Park M. (1999) Why is *Deinococcus radiodurans* so resistant to ionizing radiation? *Trends Microbiol* 7:362–365.
12. Beerhues L, Liu B. (2009) Biosynthesis of biphenyls and benzophenones – Evolution of benzoic acid-specific type III polyketide synthases in plants. *Phytochemistry* 70: 1719–1727.
13. Bennett J. (2000) Seeing Red: The story of prodigiosin. *Adv Appl Microbiol* 47: 1-32.
14. Bi M, Rosen R, Zha R, McCormick S, Song E, Hu D. (2013) Zeaxanthin induces apoptosis in human uveal melanoma cells through Bcl-2 family proteins and intrinsic apoptosis pathway. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* Volumen 2013. ID del artículo:205082.
15. Bonura T, Smith K. (1976) The involvement of indirect effects in cell-killing and DNA double-strand breakage in γ -irradiated *Escherichia coli* K-12. *Int J Rad Biol* 29: 293–296
16. Britton G, Liaaen-Jensen S, Pfander H. (2004) Carotenoids handbook. Birkhäuser Verlag, Basel, Switzerland.
17. Burrell A, Feldschreiber P, Dean C. (1971) DNA–membrane association and the repair of double breaks in X-irradiated *Micrococcus radiodurans*. *Biochim Biophys Acta* 247: 38–53
18. Campas C, Dalmau M, Montaner B, Barragan M, Bellosillo B, Colomer D, Pons G, Perez-Tomas R, Gil J. (2003) Prodigiosin induces apoptosis of B and T cells from B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia* 17: 746-750.

19. Campos V, Valenzuela C, Yarzac P, Kämpferd P, Vidal R, Zarorf C, Mondaca M, Lopez-Lopez A, Rosselló-Móra R. (2009) *Pseudomonas arsenicoxydans* sp nov., an arsenite-oxidizing strain isolated from the Atacama desert. Syst Appl Microbiol 33:193-197.
20. Castoe T, Stephens T, Noonan B, Calestani C. (2006) A novel group of type I polyketide synthases (PKS) in animals and the complex phylogenomics of PKSs. Gene 392: 47–58.
21. Chan Y, Podevels A, Kevany B, Thomas M. (2009) Biosynthesis of polyketide synthase extender units. Nat Prod Rep 26(1): 90-114.
22. Chattopadhyay M. (2006) Mechanisms of bacterial adaptation to low temperatures. J Biosci 31:157-165
23. Chintalapati S, Kiran M, Shivaji S. (2004) Role of membrane lipid fatty acids in cold adaptation. Cell Mol Biol 50:631-642.
24. Choi S, Yoon K, Lee J, Mitchell R. (2015) Violacein: Properties and production of a versatile bacterial pigment. BioMed Research International. ID Artículo 465056
25. Choi Y, Hur J, Lim S, Jo M, Kim D, Choi J. (2014) Induction of apoptosis by deinoxanthin in human cancer cells. Anticancer Res 34(4):1829-1835.
26. Cortes J, Haydock S, Roberts G, Bevitt D, Leadlay P. (1990) An unusually large multifunctional polyketide in the erythromycin-producing polyketide synthase of *Saccharopolyspora erythraea*. Nature 348: 176-178.
27. Cragg G, Newman D. (2013) Natural products: A continuing source of novel drug leads. Biochim Biophys Acta. 1830(6):3670–3695.
28. D'Alessandro M, Mancini A. (2013) *Crocus sativus* stigma extract and its major constituent crocin possess significant antiproliferative properties against human prostate cancer. Nutr Cancer 65(6): 930–942.

29. Das S, Bera S, Dutta D. (2016) Identification of a golden yellow biocolorant from *Microbacterium pumilum* NITD. International Journal of Management and Applied Science (IJMAS) 4(2):12-15.
30. De Carvalho D, Costa F, Duran N, Haun M. (2006) Cytotoxic activity of violacein in human colon cancer cells. Toxicol In Vitro 20: 1514-1521.
31. Deming J. (2002) Psychrophiles and polar regions. Curr Opin Microbiol 5:301-309.
32. Diaz-Ruiz C, Montaner B, Perez-Tomas R. (2001) Prodigiosin induces cell death and morphological changes indicative of apoptosis in gastric cancer cell line HGT-1. Histol Histopathol 16(2):415-421.
33. Dieser M, Greenwood M, Foreman C. (2010) Carotenoid pigmentation in antarctic heterotrophic bacteria as a strategy to withstand environmental stresses. Arct Antarct Alp Res 42(4): 396-405.
34. Donadio S, Staver M, McAlpine J, Swanson S, Katz L. (1991) Modular organization of genes required for complex polyketide biosynthesis. Science 252: 675-679.
35. Downham A, Collins P. (2000) Colouring our foods in the last and next millennium. Intl J of Food Sci and Tech 35(1): 5-22.
36. Du L, Sanchez C, Shen B. (2001) Hybrid peptide polyketide natural products: Biosynthesis and prospects toward engineering novel molecules. Metab Eng 3: 78-95.
37. Duran N, Menck C. (2001) *Chromobacterium violaceum*: a review of pharmacological and industrial perspective. Crit Rev Microbiol 27: 201-222.
38. Dworkin J, Shah I. (2010) Exit from dormancy in microbial organisms. Nat Rev Microbiol. 8:890–896.

39. Fenical W, Jensen P, Palladino M, Lam K, Lloyd G, Potts B. (2009) Discovery and development of the anticancer agent salinosporamide A (NPI-0052). *Bioorg Med Chem* 17: 2175–2180.

40. Fernandez-Bunster. (2012) Detección del gen luxS en *Deinococcus* sp. LP2 y su relación con estrés oxidativo. Seminario de título para el grado académico de Magister. Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad de Concepción.

41. Fieseler L, Hentschel U, Grozdanov L, Schirmer A, Wen G, Platzer M, Hrvatin S, Butzke D. (2007) Widespread occurrence and genomic context of unusually small polyketide synthase genes in microbial consortia associated with marine sponges. *Appl Environ Microbiol* 73: 2144–2155.

42. Fisch K. (2013) Biosynthesis of natural products by microbial iterative hybrid PKS–NRPS. *RSC Adv* 3: 18228–18247.

43. Foght J, Aislabie J, Turner S, Brown C, Ryburn J, Saul D, Lawson W. (2004) Culturable bacteria in subglacial sediments and ice from two southern hemisphere glaciers. *Microb Ecol* 47: 329–340.

44. Fong N, Burgess M, Barrow K, Glenn D. (2001) Carotenoid accumulation in the psychrotrophic bacterium *Arthrobacter agilis* in response to thermal and salt stress. *Appl Microbiol Biotechnol* 56: 750–756.

45. Funa N, Ohnishi Y, Fujii I, Shibuya M, Ebizuka Y, Horinouchi S. (1999) A new pathway for polyketide synthesis in microorganisms. *Nature* 400: 897-899.

46. Garnham C, Gilbert J, Hartman C, Campbell R, Laybourn-Parry J, Davies P. (2008) A Ca²⁺-dependent bacterial antifreeze protein domain has a novel beta-helical ice-binding fold. *Biochem J* 411: 171-180.

47. Gao X, Wang P, Tang Y. (2010) Engineered polyketide biosynthesis and biocatalysis in *Escherichia coli*. *Appl Microbiol Biotechnol* 88(6): 1233-1242.

48. Gérard E, Jolivet E, Prieur D, Forterre P. (2001) DNA protection mechanisms are not involved in the radioresistance of the hyperthermophilic archaea *Pyrococcus abyssi* and *P. furiosus*. *Mol Genet Genomics* 266: 72–78.
49. Gerrish R, Lee J, Reed J, Williams J, Farrell L, Spiegel K, Sheridan P, Shields M. (2007) PCR versus Hybridization for Detecting Virulence Genes of Enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Emerg Infect Dis.* 13(8): 1253–1255.
50. Godinho A, Bhosle S. (2008) Carotenes produced by alkaliphilic orange-pigmented strain of *Microbacterium arborescens*-AGSB isolated from coastal sand dunes. *Indian J Mar Sci* 37(3):307-312.
51. Gomes E, Schuch V, Lemos E. (2013) Biotechnology of polyketides: New breath of life for the novel antibiotic genetic pathways discovery through metagenomics. *Brazilian Journal of Microbiology* 44(4): 1007-1034.
52. Goodin S, Kane M, Rubin E. (2004) Epothilones: Mechanism of Action and Biologic Activity. *J Clin Oncol* 22(10): 2015-2025.
53. Gulder T, Moore B. (2010) Salinosporamide natural products: potent 20s proteasome inhibitors as promising cancer chemotherapeutics. *Angew Chem Int* 49: 9346-9367.
54. Hari R, Patel T, Martin A. (1994) An overview of pigment production in biological systems: Functions, biosynthesis, and applications in food industry. *Food Reviews International* 10: 49-70
55. Hofle G, Bedorf N, Steinmetz H, Schomburg D, Gerth K, Reichenbach H. (1996) Epothilone A and B Novel 16-membered macrolides with cytotoxic activity: isolation, crystal structure, and conformation in solution. *Angew Chem Int* 35 (13): 1567-1569.
56. Ibrahim A, Gebremariam T, Liu M, Chamilos G, Kontoyiannis D, Mink R, Kwon-Chung K, Fu Y, Skory C, Edwards J, Spellberg B. (2008) Bacterial endosymbiosis is widely present among Zygomycetes but does not contribute to the pathogenesis of mucormycosis. *J Infect Dis* 198(7):1083-1090.

57. Itriago L, Silva N, Cortes E. (2013) Cáncer en Chile y el mundo: una mirada epidemiológica, presente y futuro. *Rev med clin condes* 24(4):531-552.

58. Iwai M, Maoka T, Ikeuchi M, Takaichi S. (2008) 2,2'-beta-hydroxylase (CrtG) is involved in carotenogenesis of both nostoxanthin and 2-hydroxymyxol 2'-fucoside in *Thermosynechococcus elongatus* strain BP-1. *Plant Cell Physiol* 49(11):1678-1687.

59. Jenkins C, Andrewes A, McQuade T, Starr M. (1979) The pigment of *Pseudomonas paucimobilis* is a carotenoid (Nostoxanthin), rather than a brominated aryl-polyene (xanthomonadin). *Curr Microbiol* 3:1-4

60. Ji H. (2010). Insight into the strong antioxidant activity of deinoxanthin, a unique carotenoid in *Deinococcus radiodurans*. *Int J Mol Sci* 11:4506-4510.

61. Kelly W. (2008) Intramolecular cyclizations of polyketide biosynthesis: mining for a "Diels-Alderase"? *Org Biomol Chem* 6: 4483-4493.

62. Kim K, Heo S, Kang S, Ahn G, Jeon Y. (2010) Fucoxanthin induces apoptosis in human leukemia HL-60 cells through a ROS-mediated Bcl-xL pathway. *Toxicol In Vitro* 24:1648-1654

63. Kim E, Lee J. (2015) Effect of changes in the composition of cellular fatty acids on membrane fluidity of *Rhodobacter sphaeroides*. *J Microbiol Biotechnol* 25: 162-173.

64. Koebnik R. (2000) Structures and function of bacterial outer membrane proteins: barrels in a nutshell. *Micro Review*. 37(2): 239-253.

65. Kodach L, Bos C, Duran N, Peppelenbosch M, Ferreira C, Hardwick J. (2006) Violacein synergistically increases 5-fluorouracil cytotoxicity, induces apoptosis and inhibits Akt-mediated signal transduction in human colorectal cancer cells. *Carcinogenesis* 27: 508-516.

66. Kotake-Nara E, Asai A, Nagao A. (2005) Neoxanthin and fucoxanthin induce apoptosis in PC-3 human prostate cancer cells. *Cancer Lett* 220: 75-84.

67. Kroken S, Glass N, Taylor J, Yoder O, Turgeon B. (2003) Phylogenomic analysis of type I polyketide synthase genes in pathogenic and saprobic ascomycetes. PNAS 100(26): 15670-15675.
68. Krisko A, Radman M. (2013). Biology of Extreme Radiation Resistance: The Way of *Deinococcus radiodurans*. Cold Spring Harb Perspect Biol. 5(7): a012765.
69. Krubasik P, Takaichi S, Maoka T, Kobayashi M, Masamoto K, Sandmann G. (2001) Detailed biosynthetic pathway to decaprenoxanthin diglucoside in *Corynebacterium glutamicum* and identification of novel intermediates. Arch Microbiol 176: 217–223
70. Kurnia N, Uria A, Kusnadi Y, Dinawati L, Zilda D, Hadi T, Setyahadi S, Felix F. (2017) Metagenomic Survey of Potential Symbiotic Bacteria and Polyketide Synthase Genes in an Indonesian Marine Sponge. HAYATI J Biosci (Doi: 10.1016/j.hjb.2017.04.004)
71. Lakshmi C. (2014) Food Coloring: The Natural Way. Res J of Chem Sci 4(2): 87-96.
72. Lemee L, Peuchant E, Clerc M, Brunner M, Pfander H. (1997) Deinoxanthin: a new carotenoid isolated from *Deinococcus radiodurans*. Tetrahedron 53: 919–926.
73. Li F, Maskey R, Qin S, Sattler I, Fiebig H, Maier A, Zeeck A, Laatsch H. (2005) Chinikomycins A and B: Isolation, structure elucidation, and biological activity of novel antibiotics from a marine *Streptomyces* sp. Isolate M045. J Nat Prod 68: 349-353.
74. Liaaen-Jensen S, Hertzberg S, Weeks O, Schwieter U. (1968) Bacterial carotenoids XXVII. C50-carotenoids. 3. Structure determination of dehydrogenans-P439. Acta Chem Scand 22:1171–1186.
75. Linhart C, Ron C, Ron S. (2005). The Degenerate Primer Design Problem: Theory and Applications. Journal of computational biology : a journal of computational molecular cell biology. 12. 431-456.

76. Lo Giudice A, Bruni V, Michaud L. (2007) Characterization of Antarctic psychrotrophic bacteria with antibacterial activities against terrestrial microorganisms. *J Basic Microbiol* 47: 495-505.

77. Logan N. (2005) *Iodobacter*. In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 2nd ed. pp. 833–835. Edited by G. Garrity & other authors.

78. Lopanik N, Targett N, Lindquist N. (2006) Ontogeny of a symbiont-produced chemical defense in *Bugula neritina* (Bryozoa). *Mar Ecol Prog Ser* 327:183–191

79. Loper J, Henkels M, Shaffer B, Valeriote F, Gross H. (2008) Isolation and identification of rhizoxin analogs from *Pseudomonas fluorescens* Pf-5 by using a genomic mining strategy. *Appl Environ Microbiol* 74:3085-3093.

80. Malpartida F, Hopwood D. (1984) Molecular cloning of the whole biosynthetic pathway of a *Streptomyces* antibiotic and its expression in a heterologous host. *Nature* 309: 462-464.

81. Mann J. (2002) Natural products in cancer chemotherapy: past, present and future. *Nat Rev Cancer* 2:143-148.

82. Marusyk A, Polyak K. (2010) Tumor heterogeneity: Causes and consequences. *Biochim Biophys Acta* 1805:105–117.

83. Mathers C, Loncar D. (2006) Projections of global mortality and burden of disease from 2002 to 2030. *PLOS Med* 3: 2011-2030.

84. Meddeb-Mouelhi F, Moisan J, Bergeron J, Daoust B, Beauregard M. (2016) Structural characterization of a novel antioxidant pigment produced by a photochromogenic *Microbacterium oxydans* Strain. *Appl Biochem Biotechnol* 180(7):1286-1300.

85. Menezes C, Silva B, Sousa I, Ruiz A, Spindola H, Cabral E, Eberlin M, Tinti S, Carvalho J, Foglio M, Fantinatti-Garboggini F. (2013) In vitro and in vivo antitumor activity of crude extracts obtained from Brazilian *Chromobacterium* sp isolates. *Braz J Med Biol Res* 46(1):65-70.

86. Moffitt M, Neilan BA. (2003) Evolutionary affiliations within the superfamily of ketosynthases reflect complex pathway associations. *J Mol Evol* 56:446–457

87. Montaner B, Navarro S, Pique M, Vilaseca M, Martinell M, Giralt E, Gil J, Perez-Tomas R. (2000) Prodigiosin from the supernatant of *Serratia marcescens* induces apoptosis in haematopoietic cancer cell lines. *Br J Pharmacol* 131: 585-593.

88. Montaner B, Pérez-Tomás R. (2001) Prodigiosin-induced apoptosis in human colon cancer cells. *Life Sci* 68: 2025-2036.

89. Motamedi H, Hutchinsont R. (1987) Cloning and heterologous expression of a gene cluster for the biosynthesis of tetracenomyacin C, the anthracycline antitumor antibiotic of *Streptomyces glaucescens*. *Proc Nat Acad Sci* 84: 4445-4449.

90. National Cancer Institute. (2009) The NCI consumers' cancer dictionary for peer review.

91. Nishida Y, Adachi K, Kasai H, Shizuri Y, Shindo K, Sawabe A, Komemushi S, Miki W, Misawa N. (2005) Elucidation of a carotenoid biosynthesis gene cluster encoding a novel enzyme, 2,2'-beta-hydroxylase, from *Brevundimonas* sp. strain SD212 and combinatorial biosynthesis of new or rare xanthophylls. *Appl Environ Microbiol* 71(8):4286-4296.

92. Palleroni N, Bradbury J. (1993) *Stenotrophomonas*, a new bacterial genus for *Xanthomonas maltophilia* (Hugh 1980) Swings et al., 1983. *Int J Syst Bacteriol.* 43(3):606-609.

93. Palozza P, Serini S, Maggiano N, Angelini M, Boninsegna A, Nicuolo F, Ranelletti F, Calviello G. (2002) Induction of cell cycle arrest and apoptosis in human colon adenocarcinoma cell lines by β -carotene through down-regulation of cyclin A and Bcl-2 family proteins. *Carcinogenesis* 23: 11-18.

94. Palozza P, Torelli C, Boninsegna A, Simone R, Catalano, Mele M, Picci N. (2009) Growth-inhibitory effects of the astaxanthin-rich alga *Haematococcus pluvialis* in human colon cancer cells. *Cancer Lett* 283:108–117.

95. Pandey R, Chander R, Sainis K. (2007) Prodigiosins: A novel family of immunosuppressants with anticancer activity. *Indian J Biochem Biophys* 44: 295-302.
96. Partida-Martinez L, Hertweck C. (2005) Pathogenic fungus harbours endosymbiotic bacteria for toxin production. *Nature* 437: 884-888.
97. Pasquet V, Morisset P, Ihammouine S, Chepied A, Aumailley L, Berard J, Serive B, Kaas R, Lanneluc I, Thiery V, Lafferriere M, Piot J, Patrice T, Cadoret J, Picot L. (2011) Antiproliferative activity of violaxanthin isolated from bioguided fractionation of *Dunaliella tertiolecta* extracts. *Marine drugs* 9(5):819-831.
98. Piel J, Hui D, Fusetani N, Matsunaga S. (2004) Targeting modular polyketide synthases with iteratively acting acyltransferases from metagenomes of uncultured bacterial consortia. *Environ Microbiol* 6(9): 921–927.
99. Rahul S, Chandrashekhar P, Hemant B, Bipinchandra S, Mouray E, Grellier P, Satish P. (2015) In vitro antiparasitic activity of microbial pigments and their combination with phytosynthesized metal nanoparticles.
100. Raymond J, Christner B, Schuster S. (2008) A bacterial ice-binding protein from the Vostok ice core. *Extremophiles* 12: 713–717.
101. Rodrigues D, Tiedje J. (2008) Coping with our cold planet. *Appl Environ Microbiol* 74: 1677-1686
102. Ruiz B, Chávez A, Forero A, García-Huante Y, Romero A, Sánchez M, Rocha D, Sánchez B, Rodríguez-Sanoja R, Sánchez S, Langley E. (2010) Production of microbial secondary metabolites: Regulation by the carbon source. *Crit Rev Microbiol* 36(2): 146-167.
103. Saini R, Young-Soo K. (2017). Progress in Microbial Carotenoids Production. *Indian J. Microbiol.* 57(1): 129–130.
104. Saito T, Ohyama Y, Ide H, Ohta S, Yamamoto O. (1998) A carotenoid pigment of the radioresistant bacterium *Deinococcus radiodurans*. *Microbios* 95:79–90.

105. Sajilata M, Singhal R, Kamat M. (2008) The carotenoid pigment zeaxanthin: a review. *Compr Rev Food Sci Food Saf* 7(1):29-49.

106. Sarfo F, Phillips R, Wansbrough-Jones M, Simmonds R. (2016) Recent advances: role of mycolactone in the pathogenesis and monitoring of *Mycobacterium ulcerans* infection/Buruli ulcer disease. *Cell Microbiol* 18(1):17-29.

107. Schirmer A, Gadkari R, Reeves C, Ibrahim F, Delong E, Hutchinson C. (2005) Metagenomic analysis reveals diverse polyketide synthase gene clusters in microorganisms associated with the marine sponge *Discodermia dissoluta*. *Appl Environ Microbiol* 71:4840–4849.

108. Shen B. (2003) Polyketide biosynthesis beyond the type I, II and III polyketide synthase paradigms. *Curr Opin Chem Biol* 7: 285–295.

109. Singh P, Hanada Y, Singh S, Tsuda S. (2014) Antifreeze protein activity in Arctic cryoconite bacteria. *FEMS Microbiol Lett* 351:14–22

110. Slade D, Radman M. (2001) Oxidative Stress Resistance in *Deinococcus radiodurans*. *Microbiol Mol Biol Rev* 75(1):133-191

111. Stanier R, Palleroni N, Doudoroff M. (1966) The aerobic pseudomonads: a taxonomic study. *J Gen Microbiol* 43(2):159-271.

112. Strober W. (2001) Trypan blue exclusion test of cell viability. *Current protocols in immunology*, A3-B.

113. Sudek S, Lopanik N, Waggoner L, Hildebrand M, Anderson C, Liu H, Patel A, Sherman D, Haygood M. (2007) Identification of the putative bryostatin polyketide synthase gene cluster from “*Candidatus Endobugula sertula*”, the uncultivated microbial symbiont of the marine bryozoan *Bugula neritina*. *J Nat Prod* 70:67–74.

114. Susuki K, Koike H, Matsui H, Ono Y, Hasumi M, Nakazato H, Okugi H, Sekine Y, Oki K, Ito K, Yamamoto T, Fukabori Y, Kurokawa K, Yamanaka H. (2002) Genistein, a soy isoflavone, induces glutathione peroxidase in the human prostate cancer cell lines LNCaP and PC-3. *Int J Cancer* 99: 846-852.

115. Takahashi M, Iwasaki S, Kobayashi H, Okuda S. (1987) Studies on macrocyclic lactone antibiotics XI: Anti-mitotic and anti-tubulin activity of new antitumor antibiotics, rhizoxin and its homologues. *J Antibiot* 40:66-72.

116. Takeuchi K, Noda N, Katayose Y, Mukai Y, Numa H, Yamada K, Someya N. (2015) Rhizoxin analogs contribute to the biocontrol activity of newly isolated *Pseudomonas* strain. *Mol Plant Microbe Interact* 28(3):333-342.

117. Tao L, Rouvière P, Cheng Q. (2006) A carotenoid synthesis gene cluster from a non-marine *Brevundimonas* that synthesizes hydroxylated astaxanthin. *Gene* 379:101-108.

118. Torres S, Cajas D, Palfner G, Astuya A, Aballay A, Pérez C, Hernández V, Becerra J. (2016) Steroidal composition and cytotoxic activity from fruiting body of *Cortinarius xiphidipus*. *Natural Product Research*. DOI:10.1080/14786419.2016.1185717.

119. Tsujimoto Y. (1998) Role of Bcl-2 family proteins in apoptosis: apoptosomes or mitochondria? *Genes to Cells* 3:697-707.

120. Velly H, Bouix M, Passot S, Penicaud C, Beinsteiner H, Ghorbal S, Lieben P, Fonseca F. (2015) Cyclopropanation of unsaturated fatty acids and membrane rigidification improve the freeze-drying resistance of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* TOMSC161. *Appl Microbiol Biotechnol* 99: 907-918.

121. Velimirov, B. (2001) Nanobacteria, ultramicrobacteria and starvation forms: A search for the smallest metabolizing bacterium. *Microbes Environ* 16(2):67-77.

122. Velkov V. (1999) How environmental factors regulate mutagenesis and gene transfer in microorganisms. *J Biosci* 24(4):529-559

123. Venil C, Lakshmanaperumalsamy P. (2009) An insightful overview on microbial pigment: prodigiosin. *Ele J Biol* 5(3): 49-61.

124. Venil C, Zakariab Z, Ahmada W. (2013) Bacterial pigments and their applications. *Process Biochem* 48(7): 1065-1079.

125. Weisburg W, Barns S, Pelletier D, Lane D. (1991) 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *J Bacteriol* 173:697–703.

126. Wong W, Oliver A, Linington R. (2012) Development of antibiotic activity profile screening for the classification and discovery of natural product antibiotics. *Chemistry & Biology* 19:1483–1495

127. World Health Organization. 2015. Global status report on noncommunicable diseases.

128. Yang Y, Yatsunami R, Ando A, Miyoko N, Fukui T, Takaichi S, Nakamura S. (2015) Complete Biosynthetic Pathway of the C50 Carotenoid Bacterioruberin from Lycopene in the Extremely Halophilic Archaeon *Haloarcula japonica*. *J Bacteriol* 197(9):1614-1623

129. Yip K, Reed J. (2008) Bcl-2 family proteins and cancer. *Oncogene* 27:6398–6406.

130. Yodjun P, Soontarapa K, Eamchotchawalit C. (2011) Separation of lycopene/solvent mixture by chitosan membranes. *Journal of Metals, Materials and Minerals* 21(1):107-113.

131. Zahreddine H, Borden K. (2013) Mechanisms and insights into drug resistance in cancer. *Front Pharmacol* 4:28.

132. Zhang W, Zhang F, Li Z, Miao X, Meng Q, Zhang X. (2009) Investigation of bacteria with polyketide synthase genes and antimicrobial activity isolated from South China Sea sponges. *J Appl Microbiol.*107(2):567-575.

133. Zhang X, Yao T, Tian L, Xu S, An L. (2008) Phylogenetic and physiological diversity of bacteria isolated from Puruogangri ice core. *Microb Ecol* 55:476–488

134. Zhao J, Yang N, Zeng R. (2008) Phylogenetic analysis of type I polyketide crasynthase and nonribosomal peptide synthetase genes in Antarctic sediment. *Extremophiles* 12: 97-105.

135. Zhu L, Wu X, Li O, Qian C, Gao H. (2012) Cloning and characterization of genes involved in nostoxanthin biosynthesis of *Sphingomonas elodea* ATCC 31461. PLoS one 7(4): e35099.



9. Anexos

Anexo 1

Secuencias reconstruidas del Gen que codifica para el ARN ribosomal 16S de las bacterias utilizadas en este estudio.

Cepa	Secuencia
UDEC-A13	<p>ATGACGGCCTTCGGGTTGTAAACCTCTTTTCAGTAGGGAACAAGGCCAGCATTTTTGT TGGTTGAGGGTACTTGCAGAAGAAGCGCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGG TAATACGTAGGGCGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGC GGTTTGTGCGCTCTGCCGTGAAAGTCCGGGGCTCAACNCCGATCTGCGGTGGGT ACGGGCAGACTAGAGTGATGTAGGGGAGACTGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAAT GCGCAGATATCAGGAGGAACCCGATGGCGAAGGCAGGTCTCTGGGCATTAAGTGA CGCTGAGGAGCGAAAGCATGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCATG CCGTAAACGTTGGGCACTAGGTGTGGGGGACATTCCACGTTTTCCGCGCCGTAGCT AACGCATTAAGTGCCCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAAAGTCAAAGGAA TTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGCGGAGCATGCGGATTAATTGATGCAACGCGA AGAACCTTACCAAGGCTTGACATGAACTGGAAANACNTGAAACNGGTGCCCCGCT TCGCGTTCGGTTTACAGGTGGTGCATGTTTGTGCGTCAGCTCGTGTGCGTGTGAGATGTTG GGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTCGTTCTATGTTGCCAGCACGTAATGGTG GGGACTCATAGGAGACTGCCGGGGTCAACTCGGAGGAAGGTGAGGACGACGTCAA ATCATCATGCCCTTATGTCTTGGGCTTACGCATGCTACAATGGCCGGTACAATGG GTTGCGATACTGTGAGGTGGAGCTAATCCCAAAAAGCCGGTCTCAGTTCGGATTGG GGTCTGCAACTCGACCCCATGAAGTCGGAGTCGCTAGTAATCGCAGATCAGCAACG CTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCAAGTCACGAAAGTT GGTAACACCCGAAGCCGGTGGCCTAACCCC</p>
UDEC-A14	<p>TGGCGGTAGGCCTAACACATGCAAGTCGAACGGCAGCACAGAGGAGCTTGCTCCTT GGGTGGCGAGTGGCGGACGGGTGAGGAATACATCGGAATCTACTYTGTCGTGGGG GATAACGTAGGGAACTTACGCTAATACCGCATAACGACCTACGGGTGAAAGCAGGG GAYCTTCGGACCTTGCGCGATTGAATGAGCCGATGTCGGATTAGCTAGTTGGCGGG GTAAAGGCCACCAAGGCGACGATCCGTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACA CTGGAAGTGTGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGA CAATGGGCGCAAGCCTGATCCAGCCATAACCGCGTGGGTGAAGAAGGCCTTCGGGTT GTAAAGCCCTTTTGTGGGAAAGAAAYGGCTAATACCYGGTTGGGATGACGGTACCC AAAGAATAAGCACCGGCTAACTTCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGAAGGGTGCA AGCGTACTCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGTGCGTAGGTGGTYGTTTAAGTCYGT GTGAAAGCCCTGGGCTCAACCTGGGAACTGCAGTGGAYACTGGYCACTAGAGTGTG GTAGAGGGTAGCGGAATTCCYGGTGTACAGTGAATGCGTAGAGATCGGGAGGAAC ATCCATGGCGAAGGCAGCTACCTGGACCAACACTGACACTGAGGCACGAAAGCGTG GGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCCTAACGATGCGAACTGG ATGTTGGGTGCAATTTGGCACGCAGTATCGAAGCTAACGCGTTAAGTTCGCCGCT GGGGAGTACGGTCGCAAGACTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCGCGACAAG CCGTGGAGTATGTGGTTTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTGGCCTTGACA TGTCGAGAACTTTCCAGAGATGGATTGGTGCCTTCGGGAACTCGAACACAGGTGCT GCATGGCTGTGCTCAGCTCGTGTGCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCG CAACCCTTGTCTTAGTTGCCAGCACGTAATGGTGGGAACTCTAAGGAGACCGCCG GTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGGCCA GGGCTACACACGTAACAATGGTAGGGACAGAGGGCTGCAAGCCGGCGACGGTA</p>

	<p>AGCCAATCCCAGAAACCCTATCTCAGTCCGGATTGGAGTCTGCAACTCGACTCCATG AAGTCGGAATCGCTAGTAATCGCAGATCAGCATTGCTGCGGTGAATACGTTCCCGG GCCTTGTACACACCGCCCGTACACCATGGGAGTTTGTGGCACCAGAAGCAGGTAG CTTAACCTTCGGGAGGGCGCTTGCCACGGTGTGGCCGATGACTGGGGTGAAGTCG TAACAAGGTAGCC</p>
<p>UDEC-A3</p>	<p>GCCTAACACATGCAGTCGAACGGCAGCACCATAAGAGCTTGCTCTTATGGGTGGCG AGTGGCGGACGGGTGAGGAATACATCGGAATCTACTTTTTTCGTGGGGGATAACGTA GGGAAACTTACGCTAATACCGCATAACGACCTACGGGTGAAAGCAGGGGATCTTCGG ACCTTGCGCGATTGAATGAGCCGATGTCGGATTAGCTAGTTGGCGGGGTAAAGGCC CACCAAGGCGACGATCCGTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGAAGT AGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGC GCAAGCCTGATCCAGCCATAACCGCGTGGGTGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGCC CTTTTGTGGGAAAGAAATCCAGCCGGCTAATACCTGGTTGGGATGACGGTACCCAA AGAATAAGCACCGGCTAACTTCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGAAGGGTGAAG CGTTACTCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGTGCCTAGGTGGTTGTTTAAAGTCTGTTGT GAAAGCCCTGGGCTCAACCTGGGAACTGCAGTGGAACTGGACAAGTAAAGTGTGG TAGAGGGTAGCGGAATTCCCGGTGTAGCAGTGAATGCGTAGAGATCGGGAGGAAC ATCCATGGCGAAGGCAGCTACCTGGACCAACTGACACTGAGGCACGAAAGCGTG GGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCCTAACGATGCGAACTGG ATGTTGGGTGCAATTTGGCACGCAGTATCGAAGCTAACGCGTTAAGTTCGCCGCT GGGAGTACGGTCGCAAGACTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCGCAACAAG CGGTGGAGTATGTGGTTTAAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTGGCCTTGACA TGTCGAGAACTTTCCAGAGATGGATTGGTGCCTTCGGGAACTCGAACACAGGTGCT GCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCG CAACCCTTGTCTTAGTTGCCAGCACGTAATGGTGGGAACTCTAAGGAGACCGCCG GTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGGCCA GGGCTACACACGTAACAATGGTAGGGACAGAGGGCTGCAAGCCGGCGACGGTA AGCCAATCCCAGAAACCCTATCTCAGTCCGGATTGGAGTCTGCAACTCGACTCCATG AAGTCGGAATCGCTAGTAATCGCAGATCAGCATTGCTGCGGTGAATACGTTCCCGG GCCTTGTACACACCGCCCGTACACCATGGGAGTTTGTGGCACCAGAAGCAGGTAG CTTAACCTTCGGGAGGGCGCTGCCACGG</p>
<p>UDEC-A15</p>	<p>GGTCTGGGATGGGCTCGCGGCCTATCAGCTTGTTGGTGAGGTAATGGCTCACCAAG GCGTCGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGTGACCGGCCACACTGGGACTGAGACAC GGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGC CTGATGCAGCAACGCCGCGTGAGGGANGACGGCCTTCGGGTTGTAACCTCTTTTA GTAGGGAGAAGCGAAAGTGACGGTACCTGCAGAAAAGCGCCGGCTAACTACGTG CCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGCGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAA AGAGCTCGTAGGCGGTTTGTGCGCTCTGCTGTGAAATCCGGAGGCTAACCTCCGG CCTGCAGTGGGTACGGGCAGACTAGAGTGCGGTAGGGGAGATTGGAATTCCTGGT GTAGCGGTGGAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGATGGCGAAGGCAGATCTCT GGGCCGTAAGTACGCTGAGGAGCGAAAGGGTGGGGAGCAAACAGGCTTAGATAC CCTGGTAGTCCACCCCGTAAACGTTGGGAACTAGTTGTGGGGTCCATTCCACGGAT TCCGTGACGCAGCTAACGCATTAAGTTCCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCT AAAACCTCAAAGGAATTGACGGGGACCCGCACAAGCGGCGGAGCATGCGGATTAATT CGATGCAACGCGAAGAACCTTACCAAGGCTTGACATATACGAGAACGGGCCAGAAA TGGTCAACTCTTTGGACACTCGTAAACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGT CGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTCGTTCTAAGTTGCCAG CACGTAATGGTGGGAACTCATGGGATACTGCCGGGGTCAACTCGGAGGAAGGTGG GGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGTCTTGGGGTTCACGCATGCTACAATGG</p>

	<p>CCGGTACAAAGGGCTGCAATACCGCGAGGTGGAGCGAATCCCAAAAAGCCGGTCC CAGTTCGGATTGAGGTCTGCAACTCGACCTCATGAAGTCGGAGTCGCTAGTAATCG CAGATCAGCAACGCTGCGGTGAATACGTTCCCGGGTGTGTACACACCGCCCGTCA AGTCATGAAAGTCGGTAACACCTGAAGCCGGTGGCCTAAC</p>
<p>UDEC-P21</p>	<p>AGATTTATCGCCTGAGGATGAGCCCGCTACGATTAGCTAGTTGGTGTGGTAAAGG CGCACCAAGGCGACGATCCTTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGGAC TGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGG GCGAAAGCCTGATCCAGCAATGCCGCGTGAGTGATGAAGGCCTTAGGGTTGTAAAG CTCTTTTACCCGGGATGATAATGACAGTACCGGGAGAATAAGCTCCGGCTAACTCCG TGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGAGCTAGCGTTATTCGGAATTACTGGGCGT AAAGCGCACGTAGGCGGCTTTGTAAGTTAGAGGTGAAAGCCTGGAGCTCAACTCCA GAATTGCCTTTAAGACTGCATCGCTTGAATCCAGGAGAGGTGAGTGGAATTCCGAGT GTAGAGGTGAAATTCGTAGATATTCGGAAGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTCACT GGACTGGTATTGACGCTGAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACC CTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGATAACTAGCTGTCCGGGCTCTTAGAGCTTCG GTGGCGCAGCTAACGCATTAAGTTATCCGCCTGGGGGTACGGCCGCAAGGTTAAA ACTCAAATGAATTGACGGGGGCCTGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTTAATTCGA AGCAACGCGCAGAACCTTACCAGCGTTTGACATGTCCGGACGATTCGGGAGACCG ATCTCTTCCCTTCGGGGACTGGAACACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGGTGGTG TCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTGGTCCTTAATTGCCAT CATTTAGTTGGGCACTCTAAGGAAACCGCCGGTGATAAACCGGAGGAAGGTGGGGA TGACGTCAAGTCCATGGCCCTTACGCGCTGGGGTACACACGTGTTACAATGGCG GTGACAGTGGGCAGCAATCTCGCAAGGGTGAAGTAACTCCAAAAGCCGTTTTCAGT TCGGATTGTTCTCTGCAACTCGAGAGCATGAAGGCGGAATCGTTAGTAATAGCGGAT CAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCAGGCGTTGTACACACCGCCCGTACACCCAT GGGAGTTGGATTCTCTGAAGGCCCTGCGCGAACCAGCAAGGAGGCA</p>
<p>UDEC-P22</p>	<p>GGCTCGTCAGCTGAGTTTGATCCTGGCTCAGGCTGGATCACCTCCTTTTCGAGACCG GCGCACGGGTGCGTAACGCGTATGCAATCTACCTTTTAGCTGAGTTTGACCCTGGC ACATTTTGATTAACCTCCTTACTATATAAACTCGAGCATCGAGATTATATTAAGTCAC AACGGTAAAAGATGAGCATGCGTCCCATTAGCTAGTTGGTAAGGTAACGGCTTACCA AGGCTACGATGGGTAGGGGTCCTGAGAGGGAGATCCCCACACTGGTACTGAGAC ACGGACCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGAAGGAATATTGGACAATGGGCGCAA GCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGACAGGATGACGGTCTATGGATTGTAAACTGCTT TTATACGAGAAGAAACATACCGACGTGTCGGGACTTGACGGTATCGTAAGAATAAGG ATCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGATCCAAGCGTTATCCG GAATCATTGGGTTTAAAGGGTCCGTAGGGGGTTTAATAAGTCAGTGGTGAAAGCCCA TCGCTCAACGGTGGAACGGCCATTGATACTGTTAGACTTGAATTATTAGGAAGTAAC TAGAATATGTAGTGTAGCGGTGAAATGCTTAGAGATTACATGGAATACCAATTGCGA AGGCAGGTTACTACTAATTGATTGACGCTGATGGACGAAAGCGTGGGTAGCGAACA GGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGGATACTAGCTGTTGGAAGCA ATTTTCAGTGGCTAAGCGAAAGTGATAAGTATCCACCTGGGGAGTACGTTTCGCAAGA ATGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAA TTCGATGATACGCGAGGAACCTTACCAAGGCTTAAATGTAGATTGACCGGTTTGGAA ACAGATCTTTTCGCAAGACAATTTACAAGGTGCTGCAGGGTTGTCGTCACCTCGGGG GGTGAGGTGTCAGGTTAAGTCTATAACGAGCGCAACCCCTGTTGTTAGTTGCCAG CGAGTCATGTCCGGAACTCTAACAAGACTGCCAGTGCAAACCTGTGAGGAAGGTGGG GATGACGTCAAATCATCACGGCCCTTACGCCTTGGGCTACACACGTGCTACAATGG CCGGTACAGAGAGCAGCCACTGGGCGACCAGGAGCGAATCTATAAAACCGGTCACA GTTCCGGATCGGAGTCTGCAACTCGACTCCGTGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGGA</p>

	<p>TATCAGCCATTCCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCAAGCC ATGGAAGCTGGGGTGCCTGAAGTCGGTGACCGCAAGGAGCTGCCTAGGGTAAAA CTGGTAACTAGGGCTAAGTCGTATCAAAGTAGCATGCCGCGG</p>
<p>UDEC-P23</p>	<p>TTAGTGGCGCAGCTAACGCATTAAGTNGACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTT AAAAC TCAAATGAATTGACGGGGGCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATT CGAAGCAACGCGAAGAACCCTTACCAGGCCTTGACATCCAATGAACTTTCNAGAGATN GATTGGTGCCTTCGGGAACATTGAGACAGGTGCTGCATGGCTGTTCGTCAGCTCGTG TCGTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGTAACGAGCGCAACCCTTGTCTTAGTTACCAG CACGTNATGGTGGGCACTCTAAGGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGG GGATGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGGCCTGGGCTACACACGTGCTACAATG GTCGGTACAGAGGGTTGCCAAGCCGCGAGGTGGAGCTAATCCANAAAACCGATCG TAGTCCGGATCGCAGTCTGCAACTCGACTGCGTGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCG CGAATCAGAATGTCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCAC ACCATGGGAGTGGGTGCACCAGAAGTAGCTAGTCTAACCTTCGGGAGGACGGTTA GCGCGGTGTG</p>
<p>UDEC-P24</p>	<p>TCGGAAACGGACGCTAATACCGCATACGTCCTACGGGAGAAAGCAGGGGACCTTCG GGCCTTGCGCTATCAGATGAGCCTAGGTGCGATTAGCTAGTTGGTGAGGTAATGGC TCACCAAGGCGACGATCCGTAAC TGGTCTGAGAGGATGATCAGTCACACTGGAAC T GAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGG CGAAAGCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGTCTTCGGATTGTAAAGC ACTTAAGTTGGGAGGAAGGGCATT TACCTAATACGTAAGTGTTTTGACGTTACCGAC AGAATAAGCACCGGCTAACTCTGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACAGAGGGTGCAAG CGTTAATCGGAATTA CTGGGCGTAAAGCGCGCGTAGGTGGTTTGTTAAGTTGGATGT GAAATCCCCGGGCTCAACCTGGGAACTGCATTCAA AACTGACAAGCTAGAGTATGGT AGAGGGTGGTGGAAATTCCTGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATAGGAAGGAACA CCAGTGGCGAAGGCGACCACCTGGACTGATACTGACACTGAGGTGCGAAAGCGTG GGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGTCAACTAG CCGTTGGGAGCCTTGAGCTCTTAGTGGCGCAGCTAACGCATTAAGTTGACCGCCTG GGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAACTCAAATGAATTGACGGGGGCCGCACAAGC GGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGCCTTGACAT CCAATGAACTTTCAGAGATGGATTGGTGCCCTTCGGGACTCTGACACAGGTGCTGC ATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGCTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGTAACGAGCGCA ACCCTTGTCTTAGTTACCAGCACGTTATGGTGGGCACTCTAAGGAGACTGCCGGT GACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGGCCTG GGCTACACACGTGCTACAATGGTCCGTACAGAGGGTTGCCAAGCCGCGAGGTGGA GCTAATCTCACAAAACCGATCGTAGTCCGGATCGCAGTCTGCAACTCGACTGCGTGA AGTCGGAATCGCTAGTAATCGCGAATCAGAATGTCGCGGTGAATACGTTCCCGGGC CTTGTACACACCGCCCGTCACACCATGGGAGTGGGTGCACCAGAAGTAGCTAGTC TAA</p>

Anexo 2

Secuencias reconstruidas de los amplicones obtenidos de la búsqueda de genes PKS

Cepa	Secuencia
UDEC-A14	TCAGAAGCGGTAATCGAAGCCCAGCGTGAAGTAGCGGCCACGCAGGTCGTA CTGAAGTCGTACGGTGCGCGGATACCCGGGAACGAGGCGTCGTACGGCGGCGTCT TGTCACCCAGGTTCTGCACCTTGGCATAACGGTGAGGTTCTCGATGCCGGTGTAG GCCAGGTACAGATCGAACTGGTTGTAGCATCGACGCGGCTCTGCACCCGCGGCAGC GGCGGTGCTGGCCTCCTGGTCGTAGCCACTGGTGTAGTACCAGGTCACCCGACGCG GTGTAGTCGCTGTA CTTCCAGTCCAGGGTGGTGGTGGCCTTGTTCTTCGGCAGGGT GGCGCCGAGGTTGCTGCCGGCATAGTCCACCAACGGGCCACCGACCACGGTCGGG CGCCGGTAGTCGCGCACATGGGTGTAGGCCGAGGTCACGGTGAAGTCACCGAGCG CCGCGGTCCGGATGCGCTGGCGCAGTTCAACGTCGATGCCCGAGGTCTTCAGCTC GCTCAGGTTCTGGTAGCGGTTGTAGACCGCCTGCAGCTTGCCACGCTCATCGCGCT GCACGGCGCCGGCCACGTTGTCGTTGACCAGGGTCTGGGTGTTGTTGGTGCCGAC CAGGTTGTCCAGCTGGATGCGGTAGTAGTCCACGCTCAGGTTGGTGTGGCCACG GCGAC
UDEC-A3	ACGACAACGTGGCCGGTGCCGTGCAGCGCGATGAGCGCGGCAAGCTGCAGGCGG TCTACAACCGCTACCAGAACCTGAGCGAGCTGAAGACCTCGGGCATCGACGTTGAA CTGCGCCACCGCATCCCGACCACCGCCTTCGGTGACTTCACCGTGACCTCGGCCTA CACCCATGTGCGCGACTACCGTCGCCCCGACCCTGGTGGTGGCCCGCTGGTGGAC TATGCCGGCCGACGCTCGGGCGGACCCTGCCCAAGAACAAGGCCACCACCACC TGGACTGGAAGTACGGCGACTACACCGCTGCGGTGACCTGGTACTACACCAGTGGC TACCACCAGAAGGCCAGCACCAGCGCTGCCGCGTGCAGAGCCGCGTCGATGCCT ACAGCCAGTTCGACCTGTACCTGGGCTACACCGGCATCGAGAACCTCACCGTGTAT GCCAAGGTGCAGAACCTGGGCGACAAGACGCCCGCCGTACGACGCCTCGTTCCCGG GTAT
UDEC-A15	CTCGATCGTGGCAGATGCGAACGCTATTGCTGCTGAACGCCACGTATCTTCATAAGC AAAACGAGGTCCCTTCGCGAGACGGGGAGCGGAGGAAGCCTTTCGCCTCGTTTGCA CCCTCGGTGTACGCGCAGGTGGCCTCGACGCCGCTGCCCAATGCGGCGATCGG CGTTATCAACCCGCGCCTCGTCCGCTATGCGCTGCTTACGTCCGTGAGTGCGGGAG ACGAGTCCGCGCTTGTCCGAACCTCACGAAGCCAGGCCGCGAGCTGATGAACCGT CCTCACTGCAGGCCGAGATCTAGGT
UDEC-P22	CAAATGTAACGTTTTGAAGCAATTGGGTTTTGTTTNAATCGGAATAAAAACTAAATAA CGCATCATTCAAATCCGTTAATTTTTTCTCGTGAATNGCGAGTTGATTATCATGCGTA TCGAATCCTCCGAGTGAAGTGAATATACTTTTGGAGTTTCAGGTTTCTTTTATTAATCT TCCAATCCATTCCAGATTTTTAGACAAATCCGTTTTTGGGATAACTGATTTTCNGATTT GGATTTAGCTAAAGCTTTCTGGATTTTACCGATCCTTCGGTA ACTGAATTGGCTATT TTTTCGAACAAAATATAAACGCGGATTATGTGATAAGTCTACATTTTTCTTCGTTGTCAG ATTTTACTTAGAAGCGTTTTGGATCTTTTACCGTTATTGAATTAGGCTC
UDEC-P23	TGGCAGCCCGCTTGAAGGAGCTGGCCAGTGTGCTGGGCGTGCTGCAACTGGAGGC CGACACTTCTGCATGCCGGTGCCGAAGGTCCGGTTCGATGGGGCACAGGTCGAGG CGCTGATCCAGGCCCGTCTGGCAGCCCGTGCCAACAAGGATTGGGCTGAGTCCGA CCGTATTCGCGATCAGATACCGCCATGGGCGTGATCCTGGAAGACGGCAAGGGC GGTACGACCTGGCGCCTGGCTGACTGAGCCTGCGTTTCGCTGCAACAAGAAACCCG

	<p>CCTGGTGCGGGTTTTTTGTTGCCCTTCGAACAGTGCCGGATCAGGCCAGCGAAGCG AGGCGCTCCACCGTGTGCGGGTAGCGTTCCACCAGGCGGATCAGGGTCGTGGCCT GGGCATTGGGCGTGGCGCGGCCCTGTTCCAGTTCTCCAGGGTGCGGGTGTGGT GCGCAGGTACATGGCGAATACCGAGCGCGAGAGGTTGAGTTGCTGGCGGATGTT ATCACCTCGGCGGCGGTGATGGGCGGCAGCTTTTCGAGCTTCACTTTATGGCTGCG CAGGGTGATCTTGCCCTGGCGTTCCTGGGTGAGGGCGTCGATGCCTTCTACCAGTT CGGAAAAGATGTCA</p>
UDEC-P24	<p>GCACGATCTGCAGGAACTGCAGTCACCCCATCCCAAGCACCCACTAGAGCAACTTG TGCAGTTTCTTCCACCGCGCCCGCTGGCGTACTGGTTATACCGATTCGAGGTAGC CGCCAAGGCCAGCAAGCACAGGAACCCAAACGCACCCACAGTANTGTAGGGCCGC TTGCACATCTCCTCCGCCAACTGCCCCCAATCCAGCCCAAGAATAAAGAACAGGTAA CAAAGGATGTGCAGCACTATATAAGCAAACACCCACAACCCAGCTGCCGACGCAC CACGATCCACCCCGACCAGCCCGTCACCTTCTGCAGTGGCGTCATGCTCAAGGTCA CCAACAGGAAGGTGAGTGCCCAAGCCCAAGGCGATCCATCATGATCTTCCCGGGG TCAGGCCCCAGCAGTT</p>

