



**UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO**  
**INSTITUTO DE INVESTIGACIONES QUÍMICO-BIOLÓGICAS**

“CARACTERIZACIÓN DE CICLODIPÉPTIDOS CON ACTIVIDAD BIOLÓGICA  
PROCEDENTES DE AISLADOS BACTERIANOS ORIGINARIOS DE POZAS DE  
CUATRO CIÉNEGAS, COAHUILA”

TESIS

PRESENTA:

Q.F.B. ENRIQUE MARTÍNEZ CARRANZA

PARA OBTENER EL GRADO DE:  
MAESTRO EN CIENCIAS CON ESPECIALIDAD EN  
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

ASESOR: DOCTOR EN BIOTECNOLOGÍA JESÚS CAMPOS GARCÍA

CO-ASESOR: DOCTOR EN CIENCIAS (BIOLOGÍA) VICTOR MEZA CARMEN

Morelia, Michoacán

Febrero de 2015

**ESTE TRABAJO SE REALIZÓ EN EL LABORATORIO DE BIOTECNOLOGÍA MICROBIANA DEL INSTITUTO DE INVESTIGACIONES QUÍMICO BIOLÓGICAS DE LA UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO BAJO LA ASESORÍA DEL D.C. JESÚS CAMPOS GARCÍA Y LA COASESORIA DEL D.C. VICTOR MEZA CARMEN.**

**EN LA REALIZACIÓN DEL PRESENTE TRABAJO SE CONTÓ CON EL APOYO ECONÓMICO DE LA COORDINACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA DE LA UMSNH Y DEL CONSEJO NACIONAL DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA.**

## ABREVIATURAS

AHL	<i>N</i> -acil homoserina lactonas
CDPs	Ciclodipéptidos
CDPS	Ciclodipéptido sintasas
PSNR	Péptido sintasas no ribosomales
DKPs	Dicetopiperazinas
HPLC	Cromatografía líquida de alta presión
CG-EM	Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas
PG	Floroglucinol
MAPG	Acetilfloroglucinol
DAPG	Diacetilfloroglucinol
PCA	Análisis de componentes principales
NA	No disponible
ND	No determinado
RNAr	Ácido desoxirribonucleico ribosomal
RNA <sub>t</sub>	Ácido desoxirribonucleico de transferencia
aa-RNA <sub>t</sub>	Aminoacil- RNA <sub>t</sub>
CDO	Ciclodipéptido oxidasa
CLB	Caldo Luria – Bertani
ALB	Agar Luria – Bertani
rpm	Revoluciones por minuto
DMSO	Dimetilsulfóxido
nm	Nanómetros
$\lambda$	Longitud de onda
TR	Tiempo de retención
m/z	Relación masa / carga
$\mu$ g	Microgramos
DE	Desviación estándar

## ÍNDICE GENERAL

Página

### Contenido

I. INTRODUCCIÓN.....	1
1. La cuenca de Cuatro Ciénegas, Coahuila.....	1
2. Diversidad Microbiana en pozas de Cuatro Ciénegas.....	4
3. Compuestos microbianos de interés biológico y/o biotecnológico producidos por bacterias de Cuatro Ciénegas.....	7
4. Ciclodipéptidos o 2,5-dicetopiperazinas.....	8
5. Síntesis de ciclodipéptidos por Péptido Sintetas No Ribosomales (NRPS).11	
6. Síntesis de ciclodipéptidos a través de ciclodipéptido sintetas (CDPS).....	12
7. Enzimas accesorias que usan CDPs sintetizados por acción de CDPS para la formación de DKPs.....	14
a) Ciclodipéptido oxidasa (CDO) de <i>Streptomyces noursei</i> .....	15
b) Acoplamiento de anillos arilo por CYP121 del citocromo P450 de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> .....	15
c) Oxidación por CypX de <i>Bacillus subtilis</i> .....	16
8. Comparación de las vías de síntesis de CDPs.....	16
II. JUSTIFICACIÓN.....	18
III. HIPÓTESIS.....	19
IV. OBJETIVOS.....	19
Objetivo general.....	19
Objetivos particulares:.....	19
V. MATERIALES Y MÉTODOS.....	20
a) MATERIALES.....	20
1.- Medios de cultivo.....	20
2.- Aislados bacterianos.....	21
b) MÉTODOS.....	22
3.- Ensayos de interacción antagónica.....	22
4. Selección de los aislados bacterianos inhibidores.....	24
5. Extracción de ciclodipéptidos.....	24

6.	Análisis por Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia (HPLC).....	25
7.	Análisis por Cromatografía de Gases acoplado a Espectrometría de Masas (CG-EM).....	26
8.	Ensayos de difusión en placa de los extractos.....	26
9.	Curvas dosis – efecto de los extractos.....	27
10.	Determinación del mecanismo de control poblacional de los compuestos. ....	27
VI.	RESULTADOS .....	28
1.	Ensayos de interacción antagónica entre aislados de Cuatro Ciénegas. ....	28
2.	Análisis de los extractos de los aislados bacterianos por Cromatografía Líquida de Alta Presión (HPLC). ....	32
3.	Análisis de los extractos de los aislados bacterianos por Cromatografía de Gases acoplado a Espectrometría de Masas (CG-EM). ....	39
4.	Evaluación de la actividad biológica de los extractos de los aislados bacterianos. ....	46
5.	Determinación del mecanismo general de control poblacional de los extractos de los aislados bacterianos. ....	51
VII.	DISCUSIÓN.....	53
VIII.	CONCLUSIÓN.....	60
IX.	REFERENCIAS.....	61

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Mapa del área de estudio, el valle de Cuatro Ciénegas.....	6
<b>Figura 2.</b> Abundancia relativa de grupos filogenéticos obtenidos de las librerías de clonas en diferentes sitios de la cuenca de Cuatro Ciénegas.....	7
<b>Figura 3.</b> Estructura base de los ciclodipéptidos o 2,5-Dicetopiperazinas.....	9
<b>Figura 4.</b> Ejemplos de diferentes combinaciones de ciclodipéptidos.....	10
<b>Figura 5.</b> Síntesis de ciclodipéptidos a través de la vía de PSNR.....	11
<b>Figura 6.</b> Síntesis de ciclodipéptidos por CDPS.....	12
<b>Figura 7.</b> Ejemplo de la síntesis de ciclodipéptidos a través de CDPS.....	13
<b>Figura 8.</b> Técnicas utilizadas para la realización de ensayos de confrontación entre los aislados.....	23
<b>Figura 9.</b> Ensayos de confrontación de los aislados empleados.....	27
<b>Figura 10.</b> Matriz de interacciones antagónicas.....	30
<b>Figura 11.</b> Cromatogramas representativos de HPLC de algunos de los aislados seleccionados.....	33
<b>Figura 12.</b> Cromatogramas de los análisis por HPLC de los aislados seleccionados de la colección agrupados por patrones.....	38
<b>Figura 13.</b> Cromatogramas representativos de los análisis por Cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas de los aislados bacterianos seleccionados.....	39
<b>Figura 14.</b> Espectros de masas de los compuestos ciclo(Pro-Leu), ciclo(Pro-Val) y 2,4-Diacetilfloroglucinol.....	40
<b>Figura 15.</b> Análisis de componentes principales (PCA) de los datos de HPLC a 210 nm.....	43
<b>Figura 16.</b> Análisis de componentes principales (PCA) de los datos de HPLC a 260 nm.....	45
<b>Figura 17.</b> Ensayos de difusión en placa con los extractos de los aislados seleccionados.....	47

**Figura 18.** Resultados de los ensayos de difusión en placa de los extractos de los aislados sobre aislados representativos de la colección..... 48

**Figura 19.** Ensayos de difusión en placa de extractos que contienen ciclo(Pro-Val) y ciclo(Pro-Leu), así como 2,4-DAPG con las bacterias *C. violaceum* WT y CV026..... 51

## ÍNDICE DE TABLAS

**Tabla 1.** Concentraciones de iones y nutrientes en algunas de las pozas estudiadas del valle de Cuatro Ciénegas..... 2

**Tabla 2.** Condiciones físico-químicas de pozas analizadas..... 3

**Tabla 3.** Aislados bacterianos de la colección originarios de la poza Jim's Pond perteneciente al sistema de Churince..... 20

**Tabla 4.** Gradiente utilizado en el análisis de los extractos por HPLC..... 24

**Tabla 5.** Aislados bacterianos seleccionados para análisis posteriores.... 31

**Tabla 6.** Compuestos de interés identificados mediante el análisis por Cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas..... 41

**Tabla 7.** Aislados de la colección inhibidos por extractos que contienen los ciclodipéptidos ciclo(Pro-Val) y ciclo(Pro-Leu) y el policétido 2,4-DAPG... 49

## RESUMEN

La cuenca de Cuatro Ciénegas en el desierto de Chihuahua en México, ha sido descrita como un reservorio importante de biodiversidad. La mayoría de los hábitats acuáticos son extremadamente oligotróficos debido entre otros factores a la deficiencia de fósforo. Pocos son los estudios que han intentado describir y caracterizar la diversidad de las poblaciones bacterianas en la cuenca, por lo que se conoce poco acerca de la relación de competencia entre dichas poblaciones. Por otro lado, los ciclodipéptidos (CDPs) y sus derivados, las dicetopiperazinas (DKPs) son componentes relativamente simples, constituidos por dos aminoácidos unidos mediante dos enlaces peptídicos. La síntesis de los CDPs está ampliamente distribuida en bacterias, hongos y organismos superiores, encontrado importantes actividades biológicas asociadas a éstos; entre las cuales se han descrito propiedades antimicrobianas, antifúngicas, antivirales y anticancerígenas. Recientemente se ha descrito que las DKPs son capaces de activar y/o antagonizar la percepción de quórum bacteriano mediada por reguladores transcripcionales del tipo LuxR. En el presente trabajo evaluamos la producción y actividad biológica de los CDPs procedentes de aislados bacterianos originarios de Cuatro Ciénegas, con el propósito de determinar si éstos compuestos influyen en el control poblacional bacteriano. La totalidad de los aislados estudiados pertenecieron a la división Gamaproteobacteria se confrontaron mediante ensayos de competencia para evaluar su capacidad de inhibir el crecimiento bacteriano. Mediante este escrutinio se seleccionaron 16 aislados capaces de producir inhibición del crecimiento a otros aislados, a los cuales les fue analizado el perfil de síntesis de CDPs extraídos de los cultivos bacterianos usando extracciones líquido-líquido con solventes mediante HPLC y CG-EM. Se confirmó la presencia de los CDPs ciclo(Pro-Val) y ciclo(Pro-Leu) en la mayoría de los extractos analizados, además del antibiótico 2,4-diacetil-fluoroglucinol (DAPG). Por otro lado, se evaluó la capacidad antagónica de los extractos bacterianos para corroborar su capacidad de inhibir el crecimiento de otros aislados bacterianos de la misma colección. Los resultados mostraron que los extractos obtenidos tienen fuerte actividad inhibitoria de crecimiento bacteriano. De manera similar, se realizaron ensayos con las bacterias biosensoras de acil-homoserina lactonas (AHL) *Chromobacterium violaceum* WT y CV026 para determinar si el efecto de los CDPs es asociado a la inhibición de la percepción de quorum. Los resultados sugieren que estos metabolitos producidos por bacterias de estos nichos ecológicos influyen en el control poblacional mediante un mecanismo que involucra actividad antibacteriana por la acción de los CDPs y el antibiótico DAPG.

Palabras clave: Ciclodipéptidos, Cuatro Ciénegas, ciclo(Pro-Val) y ciclo(Pro-Leu).



## ABSTRACT

The Cuatro Ciénegas basin in Mexico has been described as an important biodiversity reservoir within the Chihuahuan desert. Most of the aquatic habitats are not permanent. Between locations, environmental conditions can vary in water chemistry, flow rate and the volume of spring discharge. Moreover, most aquatic habitats in this area are extremely oligotrophic due to the almost negligible phosphorous levels. While some studies have sought to describe and characterize the diversity of prokaryotes in the basin, little has been to understand and interpret how the populations are related, if exist communication between them, through which molecular mechanisms performed competition for nutrients, or mechanisms used to control microbial populations. Thus, the study of the mechanisms that bacteria use to compete by resources in this environment has ecological and evolutionary interest and could lead to relevant biotechnological discoveries. On the other hand, cyclic dipeptides (CDPs) also known as 2,5-diketopiperazines (DKPs) are relatively simple compounds. The ability of microorganisms to produce diketopiperazines is widespread and published data have shown that about 90% of Gram-negative bacteria produce them. Diketopiperazines have also isolated from Gram-positive bacteria, fungi and higher marine organisms. Biosynthesis of CDPs can be achieved by dedicated nonribosomal peptide synthetases (NRPS). Recently was discovered a new biosynthetic route involving a named cyclodipeptide synthases. Important biological activities of diketopiperazines are as antibacterial, antifungal, antitumour, antiviral. In addition recently, was described that diketopiperazines are able to activate or antagonize LuxR-mediated quorum-sensing systems of bacteria, and they are considered to influence cell-cell signaling. In our work we evaluated the production and biological activity of CDPs of bacterial isolates originating in pools of Cuatro Ciénegas, Coahuila with the purpose of know if these molecules have influence in the control of bacterial populations. First we did competition assays and select those isolates with ability to inhibit the growth of other isolates, the selected isolates extractions were made with ethyl acetate and then analyzed by HPLC, a comparative analysis was made and then analyzed by GC-MS to identify the compounds. The ability of the extracts to inhibit the growth of other isolates was tested, and compared with the data obtained from the analysis by HPLC and GC-MS. The presence of CDPs cyclo(Pro-Val) and cyclo(Pro-Leu) was observed, and also an antibiotic previously reported called 2,4-diacetylphloroglucinol (2,4-DAPG). We propose that CDPs involved in population control with antibacterial effects antagonizing quorum sensing system, and some isolated using 2,4-DAPG to eliminate competition for nutrients.

Key words: Cyclic dipeptides, Cuatro Ciénegas basin, cyclo(Pro-Val) and cyclo(Pro-Leu)



## I. INTRODUCCIÓN

### 1. La cuenca de Cuatro Ciénegas, Coahuila.

El valle de Cuatro Ciénegas, localizado en la zona central de Coahuila, se decretó como área natural protegida en la categoría de Área de Protección de Flora y Fauna. El decreto se publicó en el Diario Oficial de la Federación el 7 de noviembre de 1994. Es considerado el humedal más importante dentro del desierto Chihuahuense y uno de los humedales más importantes de México. En este valle subsisten una gran cantidad de especies endémicas, que son la justificación más importante del decreto.

Cuatro Ciénegas se encuentra orientado hacia el este de la región conocida como altiplano septentrional o desierto Chihuahuense, en la parte central del desierto de Coahuila, a 80 Km al oeste de la ciudad de Monclova; está localizado entre los dos macizos montañosos más grandes de México, al este de la Sierra Madre Oriental y al oeste de la Sierra Madre Occidental. La humedad que viene tanto del Golfo de México como del Pacífico es bloqueada por ambos conjuntos montañosos, fenómeno que dio origen al desarrollo de este desierto. El valle está rodeado por montañas de hasta 3000 m de altura y en promedio tiene una altitud de 740 msnm (Minckley, 1969), con una extensión aproximada de 40 Km de norte a sur, estando cortado en dos por la Sierra de San Marcos y Pinos (figura 1).

El área es un pequeño valle entre montañas de aproximadamente 840 km<sup>2</sup> donde se localizan diferentes sistemas de agua. La mayoría de los hábitats acuáticos no son permanentes (Minckley, 1969), y el valle está dividido principalmente en siete sistemas permanentes de efluentes. Entre las diferentes localizaciones pueden variar las condiciones ambientales en cuanto a la química del agua, tasa de flujo y el volumen de descarga de los manantiales (Minckley, 1969, 1994; Dinger, 2001; Elser et al., 2005).

El Área de Protección de Flora y Fauna de Cuatro Ciénegas tiene una superficie de cerca de 85 000 ha, y se localiza entre las coordenadas 26° 45' 00'' y 27° 00' 00'' de latitud Norte; 101° 48' 49'' y 102° 17' 53'' de longitud Oeste.

El clima de la zona es muy árido, con una precipitación anual de menos de 200 mm durante mayo y octubre, temperaturas extremas de 44°C en verano y un mínimo de 0°C en invierno (Minckley, 1969).

Con tan poca precipitación anual, la gran cantidad de agua subterránea es la causa de la existencia de manantiales en el valle de Cuatro Ciénegas, que a su vez forman



arroyos permanentes y áreas inundadas donde se concentra el agua de los manantiales. Los manantiales se denominan localmente pozas y las áreas inundadas se conocen como lagunas o lagos, algunos de los cuales son lagunas de desecación. Casi todos estos ambientes acuáticos tienen agua con pocos nutrientes y con altas concentraciones de minerales provenientes de las rocas cársticas que existen en la zona, sobre todo iones sulfato y calcio resultado de la evaporación y precipitación de carbonato de calcio y sulfato de calcio; en menor proporción se han encontrado iones de sodio, magnesio y cloro (Winsborough y col., 1994; Escalante y col., 2008) Tabla 1.

**Tabla 1. Concentraciones de iones y nutrientes en algunas de las pozas de Cuatro Ciénegas.**

	$\text{NO}_3^-$	$\text{PO}_4^{3-}$	$\text{SO}_4^{2-}$	$\text{Ca}^2$	$\text{Mg}^2$	Na	$\text{Cl}^-$
C. Becerra	2.24	NA	1267	343	118	153	105
Garabatal	0.43	ND	2174	457	303	505	272
P-Becerra	2.1	NA	1181	331	110	137	93
Hundidos	ND	0.02	1871	364.5	162.5	241	139.6
Los Gatos	ND	0.1	3695	425	710	1123	494
P. Escobedo	1.83	ND	1290	320	108	129	99
Mojarral	1.8	ND	971	326	99	150	8
Playitas	ND	NA	3133	596	357	445	266
P. Churince	2.01	NA	1209	321	105	135	98

\*NA indica no disponible

\* ND indica que la concentración está por debajo de los niveles de detección. (Tomada de Escalante y col., 2008).

Los cuerpos de agua tienen además un contenido muy bajo de fósforo, tabla 1 (Elser et al., 2005, García- Oliva, dato no publicado) y la pobreza de nutrientes no permite el desarrollo de algas, por lo que la base de la pirámide alimenticia parece estar formada principalmente por las bacterias. En muchas de las pozas y ríos, tanto de agua salada como de agua dulce, hay estromatolitos (depósitos de carbonatos construidos por comunidades de bacterias) que son poco comunes en el mundo (Winsborough y col., 1994).



Los numerosos cuerpos de agua que brotan de manantiales tienen diámetros que van desde menos de un metro hasta más de cien; las profundidades de los mismos van desde 50 cm hasta 18 m; algunas pozas están comunicadas entre sí por un complicado sistema de drenaje.

La mayor parte de los manantiales se ubican en las faldas de la Sierra de San Marcos y Pinos, formando alrededor de 200 pozas dentro del Valle de Cuatro Ciénegas (Souza y col., 2006). Las características físico-químicas de las pozas son variables, la temperatura oscila en un rango de 18 a 35 °C y el pH está entre 5.76 a 8.3, lo cual permite el desarrollo de microorganismos mesófilos. En estudios recientes se obtuvieron datos de las condiciones físico-químicas de algunas de las pozas (tabla 2) que también se analizaron para conocer su diversidad microbiana (Escalante y col., 2008).

**Tabla 2. Condiciones físico-químicas de las pozas de Cuatro Ciénegas.**

Tomada de Escalante y col. 2008.

Sitio	Temperatura (°C)	pH	Oxígeno disuelto (mg/L)
Becerra (BE)			
C. Becerra	34.7	8.4	11.0
Garabatal	29.1	7.9	7.8
P-Becerra	33.7	7.1	2.9
Escobeda (ES/PCA)			
Hundidos	25.5	7.9	5.5
Los Gatos	30.3	8.5	8.0
P. Escobedo	34.2	7.2	2.3
Río Mesquites (RM)			
Mojarral	33.3	7.1	2.3
Playitas	25.3	8.5	6.9
Río Churince (CHU)			
P. Churince	29.5	7.1	4.2

A pesar del extremo oligotrofismo del agua en las pozas, la intensa radiación solar, y la extrema salinidad, el área es una de los dos únicos ecosistemas desérticos norteamericanos caracterizados por tener altos niveles de endemismo de especies, hospedando a 70 vertebrados acuáticos endémicos y siete especies de invertebrados, incluyendo un gran número de caracoles y peces (Schmidt y Owens, 1994; Minckley, 1969; Cole, 1984; Hershler, 1985; Contreras- Balderas, 2004). Los niveles inusuales de endemismo han llevado a comparar a Cuatro Ciénegas con las Islas Galápagos (Taylor y Minckley, 1966) y las características biológicas únicas del área hacen una prioridad para llevar a cabo esfuerzos para su conservación por la Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad, la Fundación Mundial de Vida Salvaje, entre otras fundaciones como MAB/UNESCO.



Como resultado de la exportación de agua fuera del valle y su uso dentro del mismo, se provocaron serios desequilibrios, como son la interconexión artificial de los manantiales, la disminución de las áreas inundadas y cambios en los niveles de agua en muchas de las pozas (Escalante y col., 2008).

La explotación de agua en otros valles de los alrededores de Cuatro Ciénegas (como son Hundido y Calaveras) ha sido motivo de preocupación, ya que la escasa información geológica e hidrológica de la zona no ha permitido determinar con claridad las rutas de flujo del agua subterránea. Por este motivo, la sobreexplotación en los valles vecinos podría afectar seriamente al área natural protegida de Cuatro Ciénegas.

## 2. Diversidad Microbiana en pozas de Cuatro Ciénegas.

Se sabe que los procariotes forman la base de las redes alimenticias en este entorno único, sin embargo se sabe muy poco acerca de la diversidad procariótica en este ecosistema (Souza y col., 2006).

Se han publicado tres estudios sobre la diversidad procariótica en hábitats acuáticos en Cuatro Ciénegas (García-Pichel et al., 2002; Elser et al., 2005; Souza et al., 2006). Dos de ellos se enfocaron sobre la diversidad encontrada en los tapetes microbianos y estromatolitos de diferentes sitios dentro del área de estudio: uno describió la estructura de la población de cianobacterias (García-Pichel et al., 2002) mientras que el segundo examinó los efectos del enriquecimiento de nutrientes sobre la biomasa y diversidad de la comunidad de estromatolitos (Elser et al., 2005).

Souza y colaboradores en el 2006 estudiaron la composición encontrada en la columna de agua en tres sitios de muestreo en la cuenca de Cuatro Ciénegas y cinco en áreas circundantes de donde reportaron hallazgos respecto a biodiversidad microbiana en este ecosistema desértico acuático. Encontraron que cerca del 50% de los filotipos analizados en ese estudio están cercanamente relacionados a organismos o secuencias de RNAr 16S de bacterias de ambientes marinos y este hallazgo fue consistente con las bacterias cultivadas, las cuales incluyeron cepas con 95 a 98% de similitud a organismos marinos tales como *Halomonas elongata*, *Bacillus aquamaris*, *Chromohalobacter canadensis*, *Exiguobacterium sp.*, *Marinococcus halophilusi*, etc. (Souza, 2006). Basados en estos resultados, concluyeron que los ecosistemas acuáticos en la cuenca de Cuatro Ciénegas albergan una diversa comunidad microbiana, donde parte de la microbiota consiste de organismos que son típicamente encontrados en suelo y agua dulce, pero sorprendentemente también una gran cantidad de organismos comúnmente



encontrados en ambientes marinos tales como el Pacífico norte, el Ártico, el océano Báltico y ventanas hidrotermales.

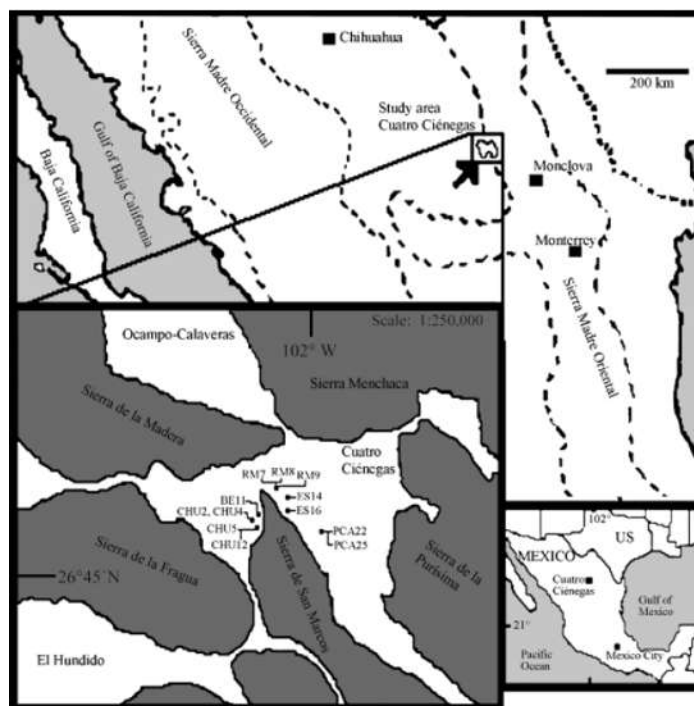
Mediante un análisis de Polimorfismo por Restricción Terminal de la Longitud de Fragmentos (T-RFLP) encontraron que hay un alto grado de similitud entre muestras de valles adyacentes (Calaveras y Hundido) y dos sistemas fluviales (Escobedo y Churince) confirmando la presencia de linajes cercanamente relacionados de Archaea y Bacteria en los sitios Hundido, Calaveras y otros sitios de Cuatro Ciénegas. Este grado de similitud sugiere que hay una conexión hidrológica entre los diferentes valles que mantiene un alto nivel de flujo de genes (Souza, 2006).

Con estos datos se demuestra que el valle de Cuatro Ciénegas es un “oasis en el desierto” de vida microbiana que incluye comunidades acuáticas altamente diversas. Esta alta diversidad es sorprendente, dado que las aguas oligotróficas de Cuatro Ciénegas representan a menudo ambientes extremos acuáticos con altas concentraciones de magnesio, calcio, carbonatos y sulfatos (Souza y col., 2006).

Después, en 2008, nuevamente Souza y colaboradores realizaron una evaluación de la diversidad procariótica en 12 hábitats acuáticos dentro de la cuenca de Cuatro Ciénegas usando una muestra de cada localización donde encontraron que predominantemente se encuentran Proteobacterias (57%), de las cuales las subdivisiones *Gamma* 23.8%, *Beta* 17.8%, *Alfa* 11.6%, *Delta* 3.8% y *Epsilon* 1.1%. Estas fueron seguidas en abundancia por clonas de *Bacteroidetes* (16.8%) y *Arqueas* del grupo *Eurarqueota* (15.1%). Otros grupos menos frecuentes son *Actinobacteria*, *Firmicutes*, *Planctomycetes*, *Chlamydiae* y *Verrumicrobia*.

Estas proporciones dependen claramente del sitio de muestreo, por ejemplo algunos como el denominado RM9 fueron dominados por *Arqueas*, mientras que ES16 y PCA25 fueron dominados por *Betaproteobacterias* y *Bacteroidetes* respectivamente (Figura 2). Sin embargo es notorio que se requiere de un muestreo aún más complejo para obtener datos más completos sobre la diversidad microbiana (Escalante y col., 2008).





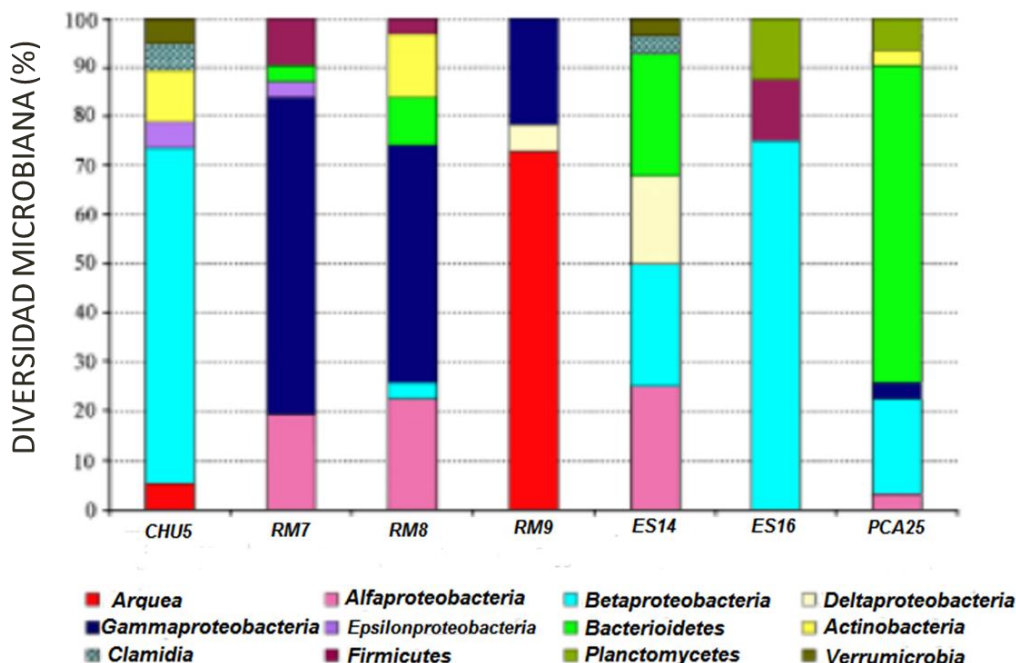
**Figura 1. Mapa del área de estudio donde se localiza el sistema Churince y la poza Jim's Pond.** Se muestra el valle de Cuatro Ciénegas, las montañas que lo rodean, así como los valles vecinos El Hundido y Ocampo-Calaveras. Tomada de Escalante y col., 2008.

Recientemente se ha logrado la caracterización de nuevas especies bacterianas endémicas de Cuatro Ciénegas, por ejemplo *Pseudomonas cuatrociénegasensis*, la cual se probó estar cercanamente relacionada a *P. peli*. Esta nueva y endémica bacteria posee propiedades características del género *Pseudomonas* como son: forma bacilar, móvil por medio de un único flagelo polar, Gram-negativa, oxidasa positivo y catalasa positivo (Escalante y col., 2009). Además de *Bacillus coahuilensis*, la cual está muy cercanamente relacionada a otras especies de *Bacillus* marinas (Alcaraz y col., 2008; Escalante, 2008).

Las variaciones en las poblaciones microbianas en cuanto a su composición y diversidad son estadísticamente significativas en las temporadas de invierno y verano, siendo la temperatura un factor involucrado en el mantenimiento de estas poblaciones (Rodríguez-Verdugo y col., 2012). Además se concluyó que en el dominio de un grupo filogenético así como la diversidad microbiana en cada una de las pozas está directamente influenciada por las condiciones fisicoquímicas contenidas en la poza, figura 2 (Escalante y col., 2008).







**Figura 2. Abundancia relativa de grupos filogenéticos obtenidos de las librerías de clonas en diferentes sitios en la cuenca de Cuatro Ciénegas.** Cada barra indica un sitio diferente de muestreo y el número de clonas obtenidas de cada sitio por código de colores, donde se observan diferentes proporciones de la diversidad microbiana en cada lugar. \*CHU5, Churince; RM7, RM8 y RM9, Rio Mesquites; ES14, ES15 y PCA Escobedo/Tio Candido/Los Hundidos/Los Gatos. Tomada y modificada de Escalante y col., 2008.

### 3. Compuestos microbianos de interés biológico y/o biotecnológico producidos por bacterias de Cuatro Ciénegas.

Se caracterizaron tres aislados de *Pseudomonas koreensis* que tienen distinta capacidad para producir biosurfactantes, los cuales fueron aislados a partir de dos cuerpos de agua en el sistema Churince en el valle de Cuatro Ciénegas. Los árboles filogenéticos construidos con su secuencia de RNAr 16S muestran que estas tres cepas de *P. koreensis* constituyen un linaje separado de *P. koreensis* originalmente aislado en Corea. Además, éstas tres cepas pueden distinguirse de la cepa coreana por su capacidad de producir un biosurfactante, posiblemente un lipopéptido cíclico que inhibe el crecimiento de una cepa de *Exiguobacterium aurantiacum* (m5-66) y éste componente tensoactivo también inhibe el crecimiento de *Bacillus subtilis* ATCC6633 (Toribio J. y col., 2011).

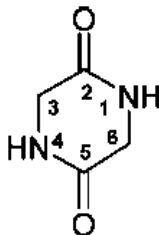


La capacidad para inhibir el crecimiento bacteriano puede ser de importancia para la adaptación de las cepas de *P. koreensis* al ambiente oligotrófico de Cuatro Ciénegas. En este trabajo se propone que la producción del biosurfactante por los tres aislados de *P. koreensis* es relevante para su adaptación al ambiente acuático y así haber jugado un papel importante en la evolución de éste grupo taxonómico en particular. Por lo que resulta interesante con base en estos resultados buscar compuestos bioactivos producidos por bacterias habitantes de las pozas de Cuatro Ciénegas. El estudio de los mecanismos que las bacterias utilizan para competir por los escasos recursos en este ambiente es de interés ecológico y evolutivo y podría llevar a descubrimientos de relevancia biotecnológica (Toribio y col., 2011; Hultberg y col., 2008).

#### **4. Ciclodipéptidos o 2,5-dicetopiperazinas.**

Los ciclodipéptidos (CDPs) y sus derivados, las diketopiperazinas (DKPs o 2,5-DKPs) constituyen una clase de pequeñas moléculas obtenidas por la condensación de dos  $\alpha$ -aminoácidos, las cuales son sintetizadas por un amplio rango de microorganismos, se ha reportado que el 90% de las bacterias Gram negativas los producen (Carvalho y col., 2012). Son los péptidos cíclicos más pequeños que existen, los cuales exhiben diversas y útiles actividades biológicas. Actualmente estas moléculas no sólo son una clase de estructuras privilegiadas de manera natural que tienen la capacidad de unirse a un amplio rango de receptores, sino que tienen también varias características que los hacen interesantes para el descubrimiento de nuevas drogas. Contienen dos enlaces *cis*-amida y como resultado poseen dos aceptores de puentes de hidrógeno y dos sitios donadores de puentes de H importantes para la unión a enzimas y receptores (Borthwick, 2012) (Figura 3). La estructura química de cada ciclodipéptido depende de los aminoácidos que lo conforman (figura 4). Estos componentes son sintetizados por una familia de enzimas formadoras de enlaces peptídicos dependientes de RNAt llamadas ciclodipéptido sintasas (CDPSs) y por las PSNR (Péptido Sintasa no Ribosomales) (Binbin y col., 2013).





**Figura 3. Estructura base de los ciclodipéptidos o 2,5-diketopiperazinas.** Consiste de un anillo heterocíclico con dos enlaces *cis*-amida y dos carbonilos en las posiciones 2 y 5. (Borthwick, 2012).

Las DKPs comprenden una importante familia de metabolitos secundarios, recientemente han recibido una mayor atención en cuanto al potencial descubrimiento de drogas. Por ejemplo, ciclo(*L*-Phe-*L*-Pro) y ciclo(*L*-Phe-*trans*-4-OH-*L*-Pro) actúan como componentes antifúngicos (Ström y col., 2002) y las epipolithiodioxopiperazinas muestran actividad antitumores, antibacterianas, antivirales e inmunosupresoras. Es importante mencionar que farmacológicamente hablando, los péptidos cíclicos son más biodisponibles y más estables contra la degradación por peptidasas que los péptidos lineales (Perzborn y col., 2013). A continuación se mencionan algunos ejemplos de DKPs y sus actividades biológicas sugeridas:

En *Streptomyces fungicidicus* se encontraron 5 diketopiperazinas con propiedades antifouling, que es el crecimiento indeseado de diversos organismos sobre varios tipos de sustratos en el mar, de los cuáles ciclo(*L*-Val-*L*-Pro) tiene la actividad antifouling más fuerte inhibiendo el crecimiento de *B. amphitrite* (Xiancui y col., 2006).

En otro caso, en cultivos de *Propionibacterium jensenii* se encontró el ciclo(*L*-Phe-*L*-Pro) y ciclo(*L*-Ile-*L*-Pro) con propiedades antifúngicas contra *Aspergillus fumigatus* (Carvalho y col., 2012).

En la bacteria *Pseudomonas aeruginosa* el sistema de percepción de quórum (quorum-sensing; QS) controla la producción de tres CDPs, ciclo(*L*-Pro-*L*-Val), ciclo(*L*-Pro-*L*-Phe) y ciclo(*L*-Pro-*L*-Tyr), que participan en la estimulación del crecimiento vegetal (Ortiz-Castro y col., 2012).

En *Lactobacillus plantarum* cepa MiLAB393 se reportaron sustancias con propiedades antifúngicas. Las tres sustancias fueron aisladas y las estructuras químicas determinadas como ácido 3-fenilacético, ciclo(*L*-Phe-*L*-Pro) y ciclo(*L*-Phe-



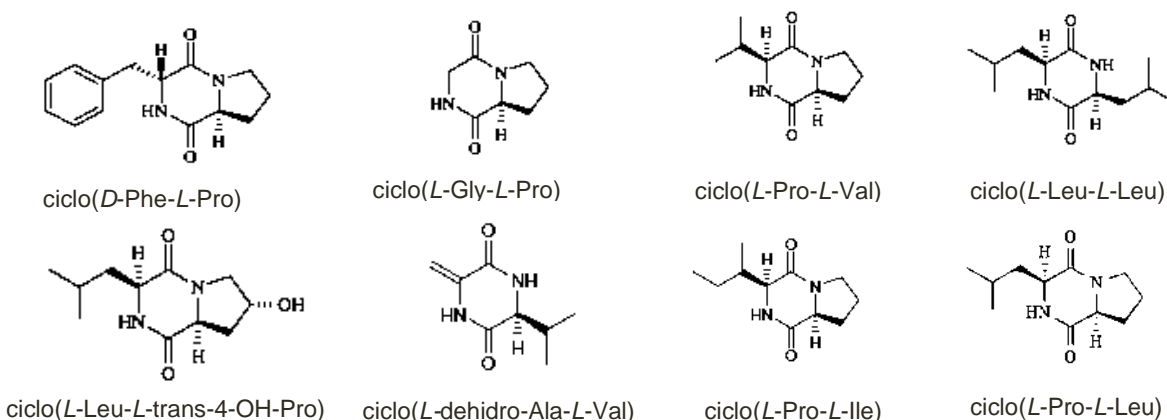
trans-4-OH-L-Pro), el cual funciona contra mohos y levaduras con potencial uso bromatológico (Ström y col., 2002).

Ciclo(L-Phe-L-Pro) ha sido aislado de *P. fluorecens* y *P. alcaligenes* en sobrenadantes libres de células y se ha reportado que están involucradas en mecanismos de percepción de quórum, los cuáles sincronizan respuestas fisiológicas bacterianas de una manera dependiente de la densidad celular, y el hallazgo de que éste mismo ciclodipéptido es producido por *L. plantarum* puede sugerir la posibilidad de un entrecruzamiento entre sistemas de señalización de bacterias Gram negativas y Gram positivas (Ström y col., 2002).

Recientemente se encontró que una mezcla de ciclodipéptidos producidos por *P. aeruginosa* PAO1, específicamente ciclo(Pro-Val), ciclo(Pro-Tyr) y ciclo(Pro-Phe) promueve a muerte celular de cultivos celulares de HeLa y Caco-2 de manera dosis-dependiente y sugiriendo una ruta apoptótica como el mecanismo que interviene en la inhibición de la proliferación celular (Vázquez-Rivera y col., 2014).

Las dicetopiperazinas comprenden también antibióticos clásicos y uno de los ejemplos mejor conocidos es el producto natural biciclomicina, este es un antibiótico producido por *Streptomyces sapporonensis* y *S. aizunensis* y ha sido desarrollado y puesto en el mercado. Su baja toxicidad ( $DL_{50} > 4$  g/Kg en ratón) permite su aplicación como una droga efectiva contra la diarrea no específica en humanos. Este exhibe actividad en contra de un amplio espectro de bacterias Gram negativas con excepción notoria de especies de *Proteus* y *P. aeruginosa* y es activa contra la bacteria Gram positiva *Micrococcus luteus* (Kamiya y col. 1972).



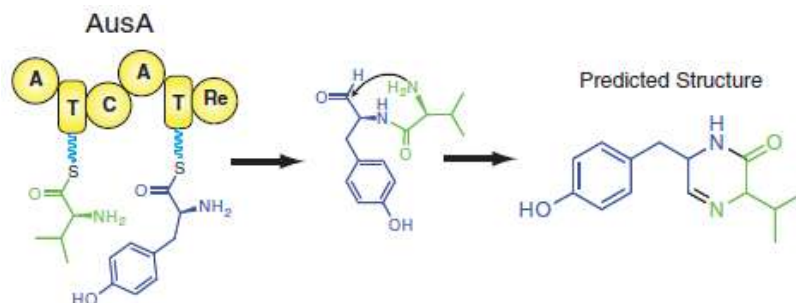


**Figura 4. Ejemplos de ciclodipéptidos con diferentes combinaciones de aminoácidos.** Se antepone el prefijo ciclo y entre paréntesis se indican los aminoácidos que forman el ciclodipéptido, de indica también si son *L* o *D* aminoácidos (Carvalho y col., 2012; Kanoh, 1999).

## 5. Síntesis de ciclodipéptidos por Péptido Sintetas No Ribosomales (NRPS).

Aunque las DKPs son moléculas bioactivas muy notorias, hay pocas rutas biosintéticas caracterizadas. En la mayoría de los casos, su síntesis está catalizada por NRPS (Péptido sintetas no ribosomales), éstas son enzimas modulares y multifuncionales, en las cuáles cada módulo es la responsable de la incorporación de un aminoácido en el péptido final. Cada módulo consiste de dominios responsables de una etapa particular de la síntesis, los dominios de adenilación seleccionan y activan a un aminoácido libre formando un aminoacil adenilato en un proceso que requiere ATP. El aminoácido activado es transferido al dominio que lleva la proteína, el cual es unido covalentemente por un 4'- fosfopantetenil. Los dominios de condensación son responsables de la formación del enlace peptídico entre sus sustratos aminoacil unidos a sus moléculas adyacentes, figura 5 (Morgan y col., 2010).





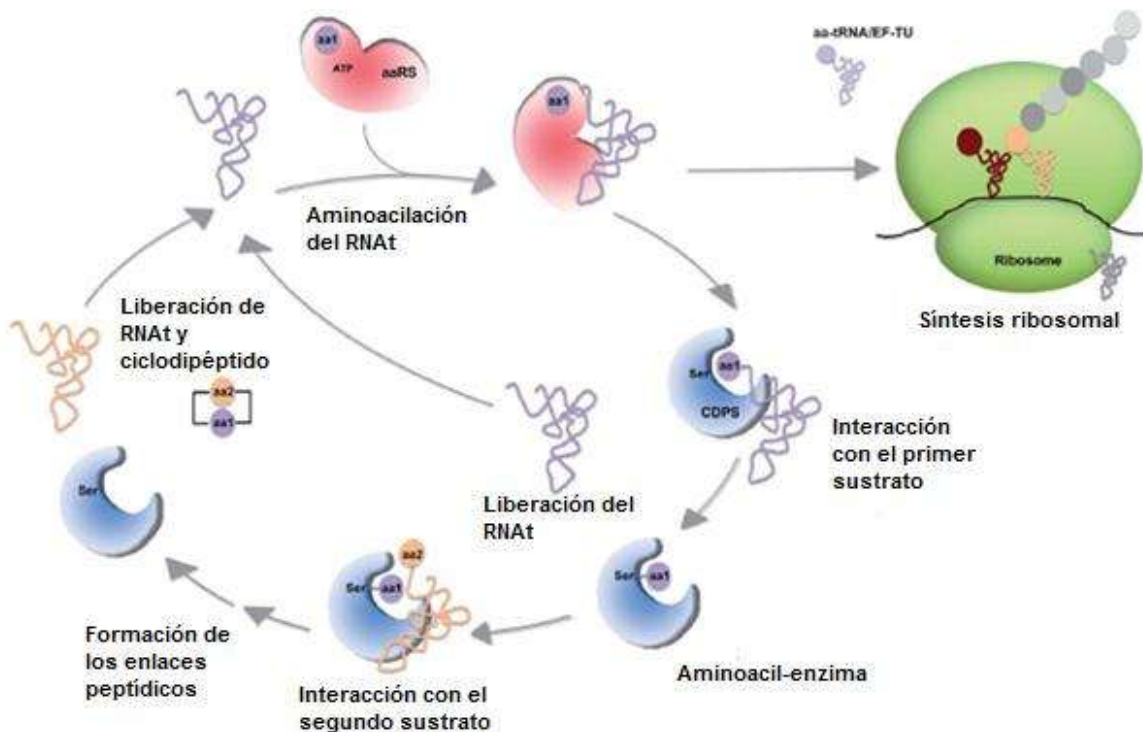
**Figura 5. Síntesis de ciclodipéptidos a través de la vía de NRPS.** Se indican los dominios de adenilación, tiolación, condensación y tioesterasa o reductasa. Después de la formación del ciclodipéptido la molécula es modificada por enzimas accesorias. Tomada de Morgan, y col., 2010.

También pueden ser formados por NRPS durante la síntesis de péptidos largos, como productos laterales truncados, por ejemplo ciclo(D-Phe-L-Pro) que es liberado prematuramente durante la síntesis del decapeptido tirocidina A (Gondry y col., 2009).

## 6. Síntesis de ciclodipéptidos a través de ciclodipéptido sintasas (CDPS).

En un estudio reciente se integró una nueva familia de enzimas formadoras de enlace peptídico a la que llamaron CDPS (ciclodipéptido sintasas). El hecho es que a diferencia de las NRPS, ellas no activan los aminoácidos, sino que en su lugar usan aminoácidos activados disponibles en forma de aa-tRNAs. Las CDPS son proteínas pequeñas, al contrario de las NRPS, que son proteínas mucho más grandes. El uso de aa-tRNAs como sustratos implica que las DKPs son producidas mayoritariamente durante la fase de crecimiento exponencial, en la cual, los sustratos son abundantes (Figura 6). La mayoría de los ciclodipéptidos formados por CDPS tienen la configuración L-L (Belin y col., 2012).



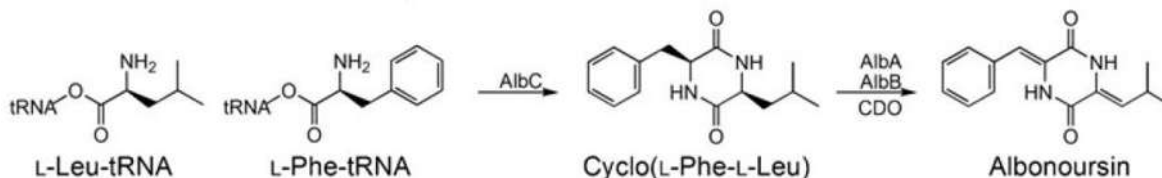


**Figura 6. Síntesis de ciclodipéptidos por ciclodipéptido sintasas (CDPS).** Se observa la utilización de aa-RNAt como sustratos para la síntesis de ciclodipéptidos, la enzima utiliza un mecanismo tipo ping-pong en el cual incorpora un aa-RNAt, toma el aminoácido y el RNAt lo libera e incorpora otro aa-RNAt y después de captar el segundo aminoácido libera el segundo aa-RNAt, después lleva a cabo la ciclación del dipéptido. Tomada y modificada de Belin y col., 2012.

Cada CDPS sintetiza preferentemente un ciclodipéptido principal, correspondiente a la introducción preferencial de un aminoácido en el producto, pero estas enzimas son claramente promiscuas produciendo combinaciones de varios ciclodipéptidos. Las CDPS se encuentran en la intersección entre el metabolismo primario y secundario ya que, el uso de RNAt cargados desvía éstas moléculas lejos del metabolismo primario para la síntesis de metabolitos secundarios. Se ha sugerido que la especificidad de las CDPS para al menos su primer sustrato, es principalmente dirigido al residuo aminoacil y no a una secuencia correspondiente de RNAt del sustrato. Todos los estudios hechos sobre CDPS sugieren que estas enzimas usan los 2 sustratos aa-RNAt en un mecanismo secuencial ping-pong, con un primer paso catalítico similar, primeramente la unión del primer aa-RNAt y la transferencia y almacenamiento de su residuo aminoacil sobre el residuo conservado de serina del sitio activo de la enzima, posteriormente la liberación del RNAt e incorporación del segundo aa-RNAt, retención del aminoácido y liberación del segundo RNAt, para formar un dipéptido en el sitio catalítico (Belin y col., 2012).



Los ciclodipéptidos formados por una CDPS tienen al menos un aminoácido en común. La hipótesis más probable para esto es que sólo el primer grupo aminoacil-probablemente el aminoácido “común” se une y se mantiene en el sitio catalítico, el segundo grupo aminoacil es acomodado en un sitio diferente con una especificidad menos estricta. El intermediario aminoacil-enzima luego reacciona con el residuo aminoacil del segundo aa-RNAt para formar ya sea un dipeptidil-enzima o un dipeptidil-RNAt intermediario, el cual puede sufrir ciclación intramolecular para generar el ciclodipéptido (Belin y col., 2012; Moutiez y col., 2014).



**Figura 7. Ejemplo de la síntesis de ciclodipéptidos a través de la vía de las CDPS.** Una vez formado el ciclodipéptido por una CDPS, en este caso AlbC, el ciclodipéptido es modificado por enzimas accesorias, aquí una ciclodipéptido oxidasa (CDO) para formar la 2,5-diketopiperazina albonoursina. Tomado de Binbin y col., 2013.

La formación de ciclodipéptidos es a menudo el primer paso en la síntesis de DKPs más complejos que se obtienen después de reacciones de adaptación (Figura 7). Éste parece ser el caso de la síntesis de ciclodipéptidos por CDPSs, los cuales no son probablemente los productos finales sino más bien intermediarios en la ruta biosintética de DKPs, que a menudo se reporta como las moléculas bioactivas (Carvalho y col., 2012).

## 7. Enzimas accesorias que usan CDPs sintetizados por acción de CDPS para la formación de DKPs.

Sólo se han caracterizado tres proteínas relacionadas a la modificación de CDPs y muestran tres actividades diferentes:  $\alpha,\beta$ -deshidrogenación (Albonoursina), oxidación (Ácido pulcherrimínico) y acoplamiento de anillos arilo (Micociclosina).





a) *Ciclodipéptido oxidasa (CDO) de Streptomyces noursei*

Un ejemplo de esto sería en *Streptomyces noursei*, el ciclodipéptido ciclo(Phe-Leu) sintetizado por la enzima AlbC y que luego es convertido en albonoursina por una ciclodipéptido oxidasa (CDO), una enzima de adaptación multimérica que utiliza flavina como cofactor, O<sub>2</sub> como aceptor de electrones y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> como producto lateral que cataliza la  $\alpha,\beta$ -deshidrogenación de las dos cadenas laterales de los aminoácidos transformándolo en bis-deshidro dicetopiperazina (Albonoursina) (Gondry y col., 2009) Figura 6. En *S. noursei*, los genes que codifican las CDPS, AlbC y a la enzima de adaptación CDO están muy cercanos uno del otro y se ha sugerido que se expresan de manera simultánea (Gondry y col., 2009).

b) *Acoplamiento de anillos arilo por CYP121 del citocromo P450 de Mycobacterium tuberculosis.*

En los genomas bacterianos que albergan otros genes que codifican para CDPS no se encontraron homólogos que codifiquen a CDO, sin embargo, todos los genes excepto albC, están localizados inmediatamente arriba de genes que codifican a proteínas que son altamente similares a aquellas de la familia citocromo P450, que constituyen una superfamilia de monooxigenasas que contienen el grupo hemo que disocia el oxígeno molecular para catalizar un gran número de reacciones sobre un amplio rango de moléculas estructuralmente diversas. Entonces los ciclodipéptidos sintetizados por las CDPS podrían ser sustratos para estas putativas proteínas de citocromo P450. Datos que apoyan esta hipótesis están disponibles en varios casos, en uno de ellos, en *M. tuberculosis* el *cyp121* es el gen río arriba de Rv2275, el citocromo CYP121 fue previamente caracterizado y mostró ser esencial para la viabilidad de *M. tuberculosis*, pero su sustrato natural permanecía desconocido; hallazgos recientes mostraron que Rv2275 sintetiza ciclo(Tyr-Tyr) y recientemente establecieron que CYP121 usa ciclo(Tyr-Tyr) como sustrato para formar un nuevo producto, una dicetopiperazina llamada micociclosina. El mecanismo mediante el cual se lleva a cabo la modificación del sustrato aún no está claro (Gondry y col., 2009; Belin y col., 2012).

Se sugiere por tanto que otros ciclodipéptidos sintetizados por otras CDPS son también modificados por citocromo P450 que está codificado en genes río abajo (Gondry y col., 2009).



### c) Oxidación por CypX de *Bacillus subtilis*.

En *Bacillus subtilis* el papel de CypX en la oxidación de ciclo(L-Leu-L-Leu) fue demostrado experimentalmente, con lo que se genera ácido pulcherrimínico que al asociarse con Fe(III) formará pulcherrimina. Cuando se purificó CypX generó un espectro UV-Vis característico de las enzimas del citocromo P450, además la presencia del grupo funcional hemo indica la relación con el citocromo P450. De manera similar, el mecanismo por el cual se lleva a cabo la oxidación del sustrato aún no está claro (Belin y col., 2012).

Se cree que algunas dicetopiperazinas resultan de la ciclización no enzimática de péptidos y sus amidas. Tienen una alta preponderancia a formarse durante procesos de fermentación y esto es consistente con varios hallazgos: 1) altos niveles de ciclo(His-Pro) en suplementos nutricionales derivados de caseína y se forman durante manipulaciones térmicas o el proceso de manufactura, 2) generación de ciclo(Asp-Phe) del dipéptido dulce aspartame bajo condiciones de temperatura elevada y pH's extremos (Chandan, 1995).

## 8. Comparación de las vías de síntesis de CDPs.

Los sistemas enzimáticos PSNR y CDPS son los responsables de la producción de las DKPs en la naturaleza. Las CDPS son proteínas pequeñas (alrededor de 26 kDa), mientras que las PSNR son sistemas multienzimáticos alrededor de diez veces mayor comparado con las CDPS. Funcionalmente hablando la gran diferencia de tamaño se debe a las estrategias que utilizan para la activación de los aminoácidos: 1) las PSNR utilizan a los dominios de adenilación y tiolación para reconocer y activar a los aminoácidos, además de requerir del empleo de ATP; y 2) las CDPS utilizan aminoacil-ARNt con lo que no requiere la activación del aminoácido. Por lo tanto, las CDPS están restringidas a los aminoácidos canónicos enlazados a los ARNt, mientras que el rango de sustratos que pueden ser usados por las PSNR es muy amplio, debido a que los sustratos pueden estar modificados previo o posterior a la síntesis enzimática y pueden tener orígenes muy variados, además de aminoácidos pueden emplear ácidos grasos, anillos hidrocarbonados, azúcares, etc. (Belin y col., 2012).

En cuanto a la distribución en la naturaleza, es interesante que las PSNR se encuentran ampliamente distribuidas en bacterias y hongos, pero no se han encontrado en animales, mientras que las CDPS han sido identificadas en bacterias, hongos, protozoarios y animales (Belin y col, 2012).



Las DKPs obtenidas a partir de CDPS sólo tienen funciones hipotéticas mientras que para las DKPs obtenidas a partir de PSNR generalmente se les ha asignado una función (sideróforos, toxinas, etc.) aunque esto también podría deberse a la escasa información acerca de los ciclodipéptidos sintetizados a partir de CDPS.

Las bacterias de pozas de Cuatro Ciénegas podrían ser muy útiles en cuanto a su potencial como fuente de ciclodipéptidos con actividad biológica y posiblemente con estructuras novedosas, ya que recientemente se han descubierto organismos de especies ya caracterizadas y originarias de otros hábitats, y sus homólogos de Cuatro Ciénegas producen componentes químicos de defensa y supervivencia que pueden ser de gran importancia biotecnológica (Toribio y col., 2011).



## II. JUSTIFICACIÓN

Se sabe que en la cuenca de Cuatro Ciénegas, a pesar de ser una zona con limitación de nutrientes y de tener condiciones no aptas para el desarrollo de la vida, ésta posee un gran endemismo de especies, y son esas distintas condiciones ambientales y físico-químicas las que influyen en la selección de especies tanto eucariontes como procariontes en cada uno de los ecosistemas acuáticos encontrados.

Además, el hecho de encontrar que bacterias como *Pseudomonas koreensis* que producen compuestos bioactivos que les permiten competir por los nutrientes o bien pozas dominadas prevalentemente de ciertos géneros microbianos, sugiere la posibilidad de encontrar en otros organismos moléculas similares que pueden estar asociados con la producción de compuestos con actividad biológica relevante para estos fenómenos ecológicos de las poblaciones.

Por lo tanto, es interesante buscar la producción de moléculas bioactivas como los ciclodipéptidos en especies microbianas que dominan los nichos ecológicos de las pozas de Cuatro Ciénegas, Coahuila y su posible correlación con los mecanismos que intervienen en el control poblacional de las bacterias en las pozas de Cuatro Ciénegas, Coahuila.



### **III. HIPÓTESIS**

Los ciclodipéptidos juegan un papel importante en el control poblacional microbiano en las pozas de la cuenca de Cuatro Ciénegas, Coahuila.

### **IV. OBJETIVOS**

#### **Objetivo general**

Estudiar el papel de los ciclodipéptidos bacterianos en el control de las poblaciones bacterianas de Cuatro Ciénegas Coahuila.

#### **Objetivos particulares:**

1. Seleccionar aislados bacterianos de las pozas de Cuatro Ciénegas con capacidad para inhibir el crecimiento de otras bacterias.
2. Analizar y catalogar los ciclodipéptidos producidos en aislados bacterianos seleccionados por su capacidad de inhibición.
3. Evaluar el papel biológico de los ciclodipéptidos producidos sobre las poblaciones microbianas aisladas de las pozas de Cuatro Ciénegas.
4. Proponer un mecanismo de control poblacional bacteriano de los ciclodipéptidos en las pozas de Cuatro Ciénegas.



## V. MATERIALES Y MÉTODOS

### a) MATERIALES

#### 1.- Medios de cultivo.

Los medios de cultivo o sus componentes se adquirieron en los laboratorios Bioxón de México S.A., Merck-México S.A. o Sigma Chemical Corporation.

a) Caldo Luria-Bertani (CLB). Composición: NaCl 0.5%, peptona de caseína 1%, extracto de levadura 0.5%. Se utiliza agua destilada en la preparación del medio.

b) Agar Luria-Bertani (ALB). Composición:  
La misma que el caldo CLB, excepto que contiene además agar bacteriológico 1.5%.

c) Caldo medio mínimo M9. Composición:  
Se preparó el buffer 20X con las siguientes sales y se corrigió el pH a 7.4 con HCl o NaOH, las sales que contiene el buffer son:  $K_2HPO_4$ , 120 g/L;  $KH_2PO_4$ , 60g/L; NaCl, 10g/L;  $NH_4Cl$ , 20g/L; Se aforó con agua destilada y se esterilizó en autoclave.

Por cada 100 ml de medio se mezcló:

Buffer de sales 20X, 5 ml;  $MgSO_4$  1M, 200  $\mu$ l;  $CaCl_2$  1M, 10  $\mu$ l; Trazas de metales, 5  $\mu$ l; Agua destilada c.b.p. 100 ml.

Las trazas de metales contienen:  $MnSO_4 \cdot H_2O$ ,  $Fe(NH_4)_2(SO_4)_2 \cdot 6H_2O$ ,  $CoCl_2 \cdot 6H_2O$ ,  $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ ,  $CuCl_2 \cdot 2H_2O$ ,  $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$ ,  $Na_2SeO_4$ .



Al medio mínimo M9 que se utilizó para realizar la extracción de los compuestos y realizar los análisis se le adicionó peptona de caseína a una concentración final del 0.02 % y como fuente de carbono glucosa al 0.2 %.

## 2.- Aislados bacterianos.

Una colección de cepas bacterianas fue aislada de muestras de agua de una pequeña poza, que forma parte del sistema de Churince, en Cuatro Ciénegas, Coahuila, México. Las cepas fueron aisladas usando medio de aislamiento de *Pseudomonas* (PIA). Las cepas fueron incubadas sobre placas de agar a temperatura ambiente en el campo hasta que se hizo el aislamiento de colonias en el laboratorio. Las colonias individuales fueron transferidas a medio Luria-Bertani (ALB) y fueron crecidas a 30°C. Las cepas fueron purificadas por medio de transferencia de una única colonia a la vez.

Las cepas fueron colectadas en cinco estaciones de muestreo separadas al menos de 1 a 5 metros una de las demás, con cuatro muestras tomadas simultáneamente en cada estación. Este procedimiento fue realizado por el equipo de trabajo de la D.C. Valeria Souza Saldívar del Instituto de Ecología de la Universidad Nacional Autónoma de México y los aislados bacterianos nos fueron donados directamente (tabla 3).

**Tabla 3. Aislados bacterianos de la colección originarios de la poza Jim's Pond perteneciente al sistema de drenaje del Churince, del valle de Cuatro Ciénegas Coahuila.**

Aislado	Género/Especie	Aislado	Género/Especie	Aislado	Género/Especie
CP14	No identificada	CNNP19	No identificada	ENNP23	<i>P. aeruginosa</i>
CP18	No identificada	CNNP27	No identificada	ENNP25	<i>P. aeruginosa</i>
CP26	No identificada	CNNP28	No identificada	1C9	<i>P. fluorescens</i>
CP27	No identificada	CNNP34	No identificada	1C11	<i>P. fluorescens</i>
CP28	No identificada	CNP39	No identificada	AP19	<i>P. fluorescens</i>
CP29	No identificada	AP10	No identificada	2C5	<i>P. fluorescens</i>



CP30	No identificada	BC45	No identificada	2C9	<i>P. fluorescens</i>
CP31	No identificada	1 A10	No identificada	3E2	<i>Aeromonas sp.</i>
CP32	No identificada	2B7	No identificada	3E3	<i>Aeromonas sp.</i>
CP33	No identificada	AP42	<i>Pseudomonas sp.</i>	DNP9	<i>A. veronii</i>
CP34	No identificada	2E3	<i>Pseudomonas sp.</i>	ANP5	<i>A. veronii</i>
CP35	No identificada	2E4	<i>Pseudomonas sp.</i>	ANNP30	<i>A. veronii</i>
CP36	No identificada	2E2	<i>Pseudomonas sp.</i>	1 A5	<i>Halomonas sp.</i>
CP37	No identificada	3C7	<i>Pseudomonas sp.</i>	1 A8	<i>Halomonas sp.</i>
CP38	No identificada	2C1	<i>Pseudomonas sp.</i>	1 A9	<i>Halomonas sp.</i>
CP39	No identificada	2C2	<i>Pseudomonas sp.</i>	2 A8	<i>Halomonas sp.</i>
CP40	No identificada	2C8	<i>Pseudomonas sp.</i>	1B6	<i>Rheinheimera sp.</i>
CP41	No identificada	3C8	<i>Pseudomonas sp.</i>	2 A3	<i>Rheinheimera sp.</i>
CP49	No identificada	3D8	<i>Pseudomonas sp.</i>	2 A4	<i>Rheinheimera sp.</i>
CP50	No identificada	1D4	<i>P. aeruginosa</i>	2 A9	<i>Rheinheimera sp.</i>
	<i>P. cuatrociénegasensis</i> *		<i>Bacillus coahuilensis</i> *	4D1	<i>P. aeruginosa</i>

\* Aislados provenientes de la Poza de desecación también del sistema de Churince.

## b) MÉTODOS

### 3.- Ensayos de interacción antagónica.

Los ensayos de interacción antagónica fueron llevados a cabo con el método de Burkholder llamado “spot-on-lawn” (Burkholder y col., 1966), Figura 8 (B), usando agar LB. Brevemente se creó un tapete de cada uno de los aislados probados para sensibilidad mezclando 2.5 ml de cultivos en crecimiento exponencial (Densidad óptica a 600 nm de 0.4 – 0.7) con medio de agar LB líquido y se colocó la mezcla en una caja de Petri que contenía agar LB. Cuando el “tapete” se solidificó, se agregó una gota en la parte superior de un aislado crecido en cultivo líquido durante toda la noche, al cual se probará su potencial





actividad antagónica, en cada caso se verificó que cada uno de éstos aislados crecidos toda la noche presentara turbidez del medio por inspección visual.

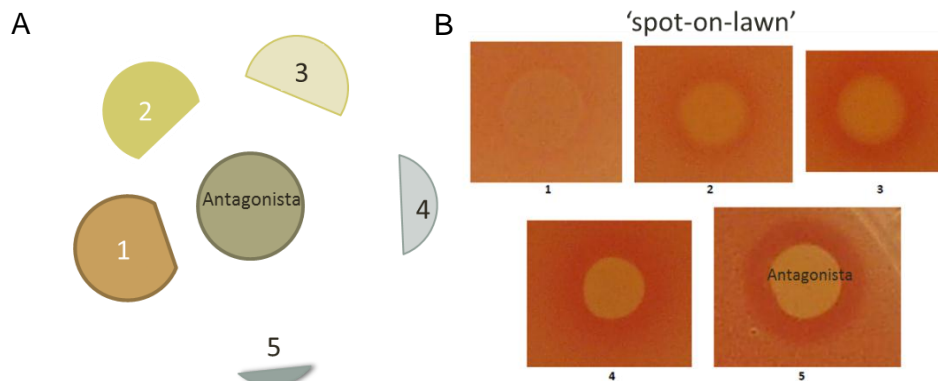
Las placas fueron inspeccionadas para buscar la presencia de halos de inhibición alrededor de las gotas después de 20 a 24 horas de incubación a 30°C.

Otra metodología utilizada para llevar a cabo los ensayos de interacción antagónica fue la utilizada para determinar la sensibilidad a determinados compuestos por difusión en placa, esta técnica es muy similar a la anteriormente mencionada y difiere en que en ésta no se mezcla cultivo bacteriano con medio líquido de agar LB. Se utilizan aislados en cultivo líquido (CLB) en crecimiento exponencial (D.O. 600 nm 0.4 – 0.7) para el caso se los aislados a los cuales se probará su sensibilidad, se toman 10 µl de ésta suspensión bacteriana y se agregan a una caja de Petri que contiene medio agar LB y con un hisopo estéril se hace un estriado cerrado sobre toda la superficie del medio a manera de hacer crecer al aislado cultivado en forma de “tapete”. Una vez que se secó el “tapete” se agregaron en la parte superior gotas de aislados cultivados durante toda la noche en medio líquido (CLB) y una vez secas se incubaron a 30°C. Después de 24 horas de incubación se revisan las cajas en busca de la presencia de halos de inhibición alrededor de las gotas.

Una técnica adicional implementada en el Laboratorio de Biotecnología Microbiana para realizar ensayos de confrontación o de interacción antagónica es semejante a las anteriores, Figura 8 (A). El cultivo de un aislado determinado para probar su capacidad antagónica es crecido durante toda la noche en medio líquido (CLB), se toman 10 µl del cultivo y se coloca en la parte superior de una caja de Petri conteniendo medio agar LB, una vez seca la gota se incuba a 30°C por 24 horas, posterior a esto se colocan gotas de cultivos de los aislados en crecimiento exponencial (D.O. 600 nm 0.4 – 0.7) a los cuáles se probará su sensibilidad, alrededor de la gota inicial (0.7 – 1 cm) y que para entonces habrá crecido. Posteriormente se incuban por 24 horas a 30°C, una vez finalizado el periodo de incubación se procede a la búsqueda de halos de inhibición alrededor de la gota central.

Cada interacción fue probada al menos tres veces, la presencia de interacción fue calificada subjetivamente en cada observación de 0 (donde no hubo interacción) a 5 (interacción antagónica muy marcada con un halo de inhibición grande). La figura 8 muestra ejemplos de los halos de inhibición y los valores asignados a cada uno de ellos.





**Figura 8. Técnicas utilizadas para la realización de ensayos de confrontación entre los aislados.** Se utilizaron dos metodologías, una montada en el laboratorio (A) con la cual se pueden identificar claramente aislados antagónicos además de la técnica “spot on lawn” (B) con la cual es muy fácil identificar halos de inhibición.

#### 4. Selección de los aislados bacterianos inhibidores.

La selección de aislados bacterianos que inhibieron el crecimiento de otros se realizó utilizando los datos obtenidos de los ensayos de confrontación o antagonismo. Los dos criterios utilizados fueron: 1) la capacidad antagónica (o de inhibición) de cada uno de los aislados, es decir, se seleccionaron aquellos aislados con mayor capacidad de inhibición basados en la escala utilizada de 0 (nula interacción antagónica o inhibición) a 5 (fuerte interacción antagónica o inhibición) y 2) además se buscó la mejor representatividad de género y especie entre los aislados que produjeron inhibición como segundo criterio.

#### 5. Extracción de ciclodipeptidos.

Se prepararon tubos con medio líquido (CLB) con 3 ml y se inocularon con el aislado bacteriano a extraer (preinóculo), se incuban 16 horas con movimiento a 30°C, posteriormente se tomó 2 ml del preinóculo y se depositaron en matraces con 100 ml de medio mínimo M9. Se procedió a incubar por 48 horas a 30°C con movimiento a 125 rpm. Posteriormente las bacterias son removidas por centrifugación a 7000 rpm por 10 minutos a temperatura ambiente, los sobrenadantes son extraídos tres veces por 2 minutos cada una con un volumen



igual de acetato de etilo (J.T. Baker) acidificado con ácido acético glacial (J.T. Baker) a una concentración de 0.01%. Se desechó la fase acuosa y las fases orgánicas se colectaron en un matraz balón para ser evaporadas a sequedad por evaporación rotativa (Rotavapor, Buchi R-215) a 60 °C. El residuo fue disuelto en 1 ml de metanol: acetonitrilo 1:1 grado HPLC (J.T. Baker), los extractos se concentran hasta sequedad en vacío (Concentrador Labconco) y se almacenaron a 4 °C hasta el momento de su análisis. Antes del análisis por HPLC o CG-EM las muestras fueron redisueltas en el solvente correspondiente, centrifugadas (3000 rpm por 3 minutos) y filtradas a través de un filtro Millipore 0.22 µm (Millipore). Se usó el mismo método para la extracción de compuestos del medio de cultivo sin crecimiento bacteriano como control negativo.

#### 6. Análisis por Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia (HPLC).

Las muestras resultantes de la extracción con acetato de etilo y disueltas en acetonitrilo, se analizaron por HPLC (Varian ProStar 335 Diode Array Detector) con un gradiente lineal de H<sub>2</sub>O: acetonitrilo a un flujo constante de 1.2 mL/min, usando una columna para cromatografía en fase inversa Sephasil Peptide C18 12µ ST4.6/250 a 50°C. El volumen de muestra inyectada fue de 5µL. Se utilizaron las absorbancias de 210 y 260 nm en el intervalo del ultravioleta y elución en gradiente (Tabla 4). El agua desionizada y el acetonitrilo grado HPLC fueron filtrados y desgasificados. El agua desionizada fue también acidificada con H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> al 0.05%.

**Tabla 4. Gradiente utilizado en análisis por HPLC.**

Tiempo	Tasa de flujo	% A*	% B*	% C
Inicio	1.2 mL/min	100	0	0
16:00	1.2 mL/min	40	60	0
18:00	1.2 mL/min	100	0	0
22:00	1.2 mL/min	100	0	0

\*Solvente A: Agua; Solvente B: Acetonitrilo.



### *7. Análisis por Cromatografía de Gases acoplado a Espectrometría de Masas (CG-EM).*

Las muestras resultantes de la extracción con acetato de etilo y disueltas en metanol grado HPLC, se analizaron por CG-EM (Agilent CG System 7890A equipado con un detector de Espectrometría de Masas Agilent MSD 5975C) usando He como gas acarreador a un flujo de 1 ml/min, usando una columna capilar de 30m x 250  $\mu$ m x 0.25 mm, con una matriz de 5% de fenil metil siloxano, con una temperatura de detector de 300 °C y una temperatura de inyección de 250°C. El volumen de la muestra inyectada fue de 1  $\mu$ L. Se realizó un análisis SCAN para verificar la presencia de ciclodipéptidos con los datos obtenidos de la espectrometría de masas. Cada una de las señales de los cromatogramas de cada extracto procesado fue analizado mediante su espectro de masas o patrón de fragmentación.

### *8. Ensayos de difusión en placa de los extractos.*

Una vez seleccionados y ya que se realizaron los extractos de los aislados bacterianos seleccionados por su capacidad de inhibición o antagonismo hacia otros aislados, para demostrar si en éstos extractos se encuentran algunas moléculas responsables de la actividad antagónica, dichos extractos se usaron en ensayos de difusión en placa. Para ello, los extractos se cuantificaron y se tomaron alícuotas, se disolvieron en dimetilsulfóxido (DMSO) como vehículo, se realizaron ensayos de difusión en placa de los extractos contra varios aislados de la poza Jim's Pond colocando los extractos en discos de papel filtro de 6 mm de diámetro y éstos a su vez sobre un estriado cerrado hecho con hisopo estéril sobre la superficie de medio sólido (ALB) de aislados en fase de crecimiento exponencial de un preinóculo en medio de cultivo líquido (CLB). Se colocó la concentración deseada de cada uno de los extractos en 6  $\mu$ l de DMSO para saturar la capacidad de absorción del disco de papel filtro. Esta primera etapa de ensayos de difusión en placa se realizó con los extractos de los aislados seleccionados por su capacidad antagónica contra aislados de la colección seleccionados al azar y continuamos con la realización de curvas dosis-efecto de los aislados.



### 9. *Curvas dosis – efecto de los extractos.*

Con el propósito de conocer la concentración de extracto necesaria para lograr la inhibición sobre los aislados, se propuso tener extractos a diferentes concentraciones (1.5, 3, 6, 12, 25 y 50  $\mu\text{g}/6\mu\text{L}$ ) disueltos en dimetilsulfóxido (DMSO) como vehículo, para lo cual los extractos fueron absorbidos en discos de papel.

Se incubaron las cajas por un periodo de 24 horas a 30 °C y una vez terminado se busca la presencia de halos de inhibición alrededor de cada uno de los papeles filtro que indiquen la actividad antagonica de los extractos. Como control negativo se colocó un disco con el vehículo DMSO en cada una de los ensayos.

### 10. *Determinación del mecanismo de control poblacional de los compuestos.*

A partir de ensayos de difusión en placa con los extractos que contienen los CDPs ciclo(Pro-Leu) y ciclo(Pro-Val) además del policétido 2,4-DAPG y las bacterias *Chromobacterium violaceum* WT y CV026 (mutante en la producción de acil-homoserina lactonas, AHL) se determinó la actividad positiva o negativa como agonista o para antagonizar el mecanismo de percepción de quorum de las bacterias biosensoras *C. violaceum* de dichos compuestos.

Las bacterias de *C. violaceum* se preinocularon en medio líquido (CLB) hasta una densidad óptica de 0.5 a 600 nm. Posteriormente se inocularon 10 $\mu\text{l}$  de éste cultivo bacteriano en una caja de Petri con medio de cultivo (ALB) y se realizaron siembras masivas con un hisopo estéril hasta lograr una capa homogénea sobre la superficie, una vez que éste se secó se colocaron los extractos sobre discos de papel filtro a concentraciones de 1.5, 3, 6 12.5 y 25  $\mu\text{g} / 6\mu\text{l}$  de DMSO como vehículo. Las cajas de Petri se incubaron a 30°C por 24 horas.



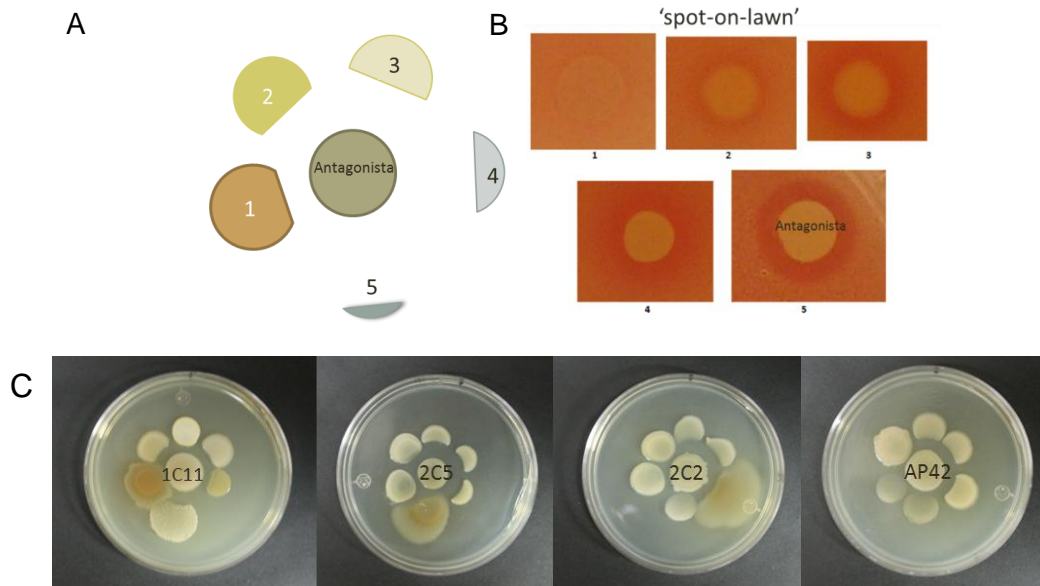
## VI. RESULTADOS

### 1. Ensayos de interacción antagonica entre aislados de Cuatro Ciénegas.

Las cepas fueron aisladas por la capacidad de crecer en medio de aislamiento de *Pseudomonas* (PIA) del efluente conocido como Churince, uno de los 7 principales sistemas del valle de Cuatro Ciénegas. Los aislados consistieron no sólo de miembros del género *Pseudomonas*, sino también incluyeron representantes de los géneros *Aeromonas*, *Halomonas* y *Rheinheimera*. Interesantemente, un muestreo similar para obtener aislados a partir del sedimento del Churince no fue exitoso, sugiriendo que el agua no es un ambiente transitorio para el desarrollo de estas *Proteobacterias* y que sus interacciones pueden reflejar su forma de vida en este ambiente. Los aislados fueron obtenidos por el equipo de trabajo de la D.C. Valeria Souza Saldivar del Instituto de Ecología de la Universidad Nacional Autónoma de México, quien nos donó la colección que se utilizó en la realización del presente trabajo (Tabla 3).

A partir de la colección de 62 aislados y con la finalidad de discriminar si entre los mismos aislados había algunos con capacidad para antagonizar o inhibir el crecimiento de otros aislados provenientes del mismo sitio ecológico, se realizaron ensayos de confrontación o interacción antagonica mediante los métodos “spot-on-lawn” y uno más que se montó en el laboratorio que permiten la fácil visualización de la actividad antagonica o inhibitoria de parte de los aislados mediante la formación de halos de inhibición (Figura 9), llevados a cabo por la difusión de compuestos liberados por los aislados y que difunden a través del medio de cultivo e impiden el crecimiento de los demás aislados bacterianos.





**Figura 9.** Ensayos de confrontación de los aislados bacterianos. Se muestra la calificación dada a cada una de las inhibiciones antagónicas por parte del aislado antagonista emisor de compuestos inhibidores con el método montado en el laboratorio de Biotecnología Microbiana (A) y con el método “spot-on-lawn” (B) dependiente del grado de inhibición y ejemplos de los ensayos realizados (C) donde se observan claros halos de inhibición y ejemplos de algunos de los aislados con capacidad antagónica.

Los ensayos de confrontación o interacción antagónica se realizaron con los 62 aislados contra los mismos 62, realizando 3844 interacciones por triplicado con la finalidad de detectar a los aislados capaces de inhibir el crecimiento de los demás. Los grados de interacción antagónica o inhibición fueron calificados subjetivamente asignándoles una calificación de 0 a 5, donde 0 indica una inhibición o interacción nula y 5 una interacción muy fuerte. Los valores fueron promediados y sólo los valores mayores a 1 indicaron una interacción positiva. (Figura 9).

Para resumir los resultados de los ensayos de interacción de los 62 X 62 se generó una matriz de interacciones donde se muestran los 62 aislados, (Figura 10), se observa la presencia de aislados altamente antagónicos o inhibidores donde la mayoría de los aislados (80%) fueron inhibidos por al menos un aislado y la mayoría de los aislados inhibieron a al menos un aislado (80%). Hubo una gran heterogeneidad entre el comportamiento antagonista y el de resistencia de los aislados, se observa a aislados con una alta tendencia a antagonizar a otros, en la mayoría de los casos siendo resistentes al antagonismo de los demás. Otros aislados, por el contrario, fueron altamente sensibles y mostraron una muy baja o



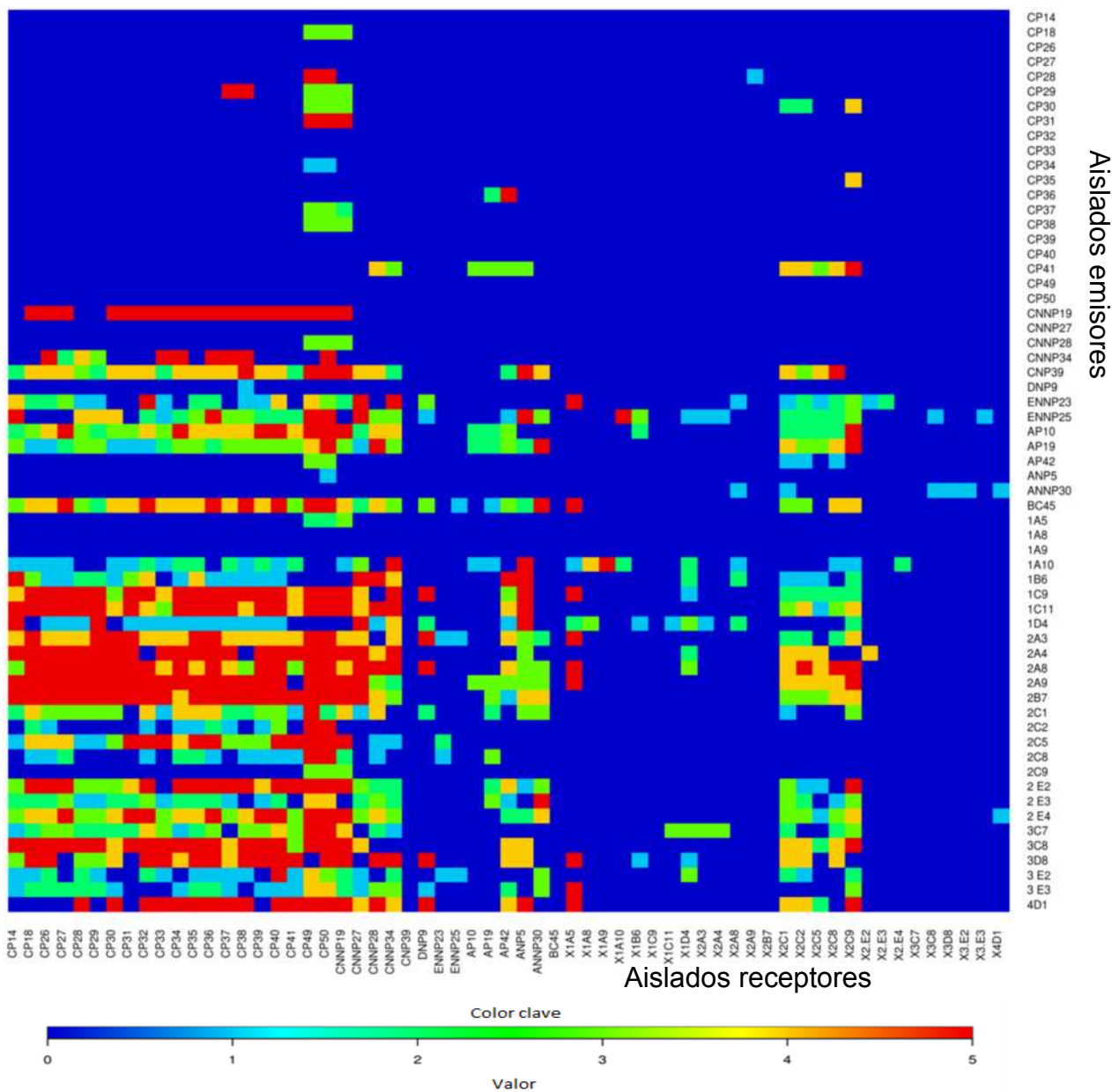
nula capacidad para antagonizar a otros aislados. La mayoría de los aislados altamente antagónicos pertenecen al género *Pseudomonas* sin embargo también se encontraron aislados sensibles pertenecientes a este mismo género. Además se encontraron aislados relacionados pertenecientes al género *Pseudomonas sp.*, los cuales mostraron en algunos de los casos patrones similares de antagonismo como los aislados 4D1, 3D8, 3C8, 2E4 y 2E2. Sin embargo hubo también algunos que fueron muy diferentes, tal es el caso de aislados como 2C1, 2C2 y 2C8 pertenecientes al género *Pseudomonas sp.* y tienen capacidad antagónica, más sin embargo también fueron sensibles al antagonismo o inhibición de varios de los aislados. Los aislados de *P. fluorescens* 1C9 y 1C11 tuvieron una buena actividad antagónica y poca sensibilidad a las interacciones antagónicas de otros aislados, de esta manera, las interacciones ocurrieron entre aislados provenientes de la misma muestra así como entre aislados provenientes de distintas muestras y estaciones de muestreo. También formaron parte de los aislados con capacidad antagónica algunos aislados como 2-A9, 2-A4, 2-A3 y 1B6 que pertenecen al género *Rheinheimera*, o los aislados ANP5 y DNP9 del género *Aeromonas*, entre estos, la sensibilidad a otras interacciones antagónicas fue muy variable. Los aislados de *Pseudomonas aeruginosa* ENNP23, ENNP25 y 1D4 mostraron buena capacidad antagónica y poca sensibilidad al antagonismo de los demás. Además se observó la capacidad antagónica de varios aislados de los cuales se desconoce aún el género como: 2B7, BC45, CNNP19, CNP39 y 1 A10, de éstos aislados destacan BC45 y CNP39 ya que tienen buena capacidad antagónica y fueron resistentes al antagonismo de todos los aislados.

Los aislados CP14, CP18, CP26, CP27, CP28, CP29, CP30, CP31, CP32, CP33, CP34, CP35, CP36, CP37, CP38, CP39, CP40, CP41, CP49 Y CP50 mostraron muy baja actividad antagónica y una alta sensibilidad al antagonismo de la mayoría de los aislados restantes en los ensayos. De los 61 aislados, 49 tienen capacidad de antagonizar cuando menos a un aislado y 12 no tuvieron capacidad antagónica.

En conclusión con estos ensayos se observó que no existe un patrón de comportamiento en general entre aislados relacionados cercanamente por género y/o especie y hubo aislados antagónicos de los distintos géneros analizados, además la mayoría de los aislados altamente antagónicos también son muy resistentes al antagonismo de los demás.







**Figura 10. Matriz de interacciones antagonicas entre los aislados de la colección.** Los distintos colores de la matriz representan la intensidad de las interacciones y equivalen al promedio de las calificaciones dadas para cada una de las interacciones de los ensayos, donde 0 (azul) interacción nula y 5 (rojo) interacción fuerte. La escala se representa en la barra inferior. En el eje de las X se encuentran los aislados receptores (sensibles o resistentes) a las interacciones de los aislados emisores (antagonistas) que se encuentran en el eje de las Y.

Con base en los resultados obtenidos de los ensayos de interacción antagonica se llevó a cabo la selección de aislados bacterianos para realizar los análisis



posteriores, dicha selección consistió en tener aislados con buena capacidad antagónica o inhibitoria y que éstos aislados sean representativos de los distintos géneros que conforman la colección. Por lo anterior, en la Tabla 5 se muestran los aislados seleccionados y con los cuáles se realizaron estudios de Cromatografía Líquida de Alta Presión (HPLC) y Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas (CG-EM).

**Tabla 5. Aislados bacterianos seleccionados para análisis posteriores.**

<b>Aislado</b>	<b>Género y/o especie</b>
2E4	<i>Pseudomonas sp.</i>
AP42	<i>Pseudomonas sp.</i>
3C8	<i>Pseudomonas sp.</i>
2C1	<i>Pseudomonas sp.</i>
2C8	<i>Pseudomonas sp.</i>
3D8	<i>Pseudomonas sp.</i>
1D4	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
1C11	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
2C5	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
3E2	<i>Aeromonas sp.</i>
3E3	<i>Aeromonas sp.</i>
ANP5	<i>Aeromonas veronii</i>
DNP9	<i>Aeromonas veronii</i>
2 A9	<i>Rheinheimera sp.</i>
1B6	<i>Rheinheimera sp.</i>
2 A4	<i>Rheinheimera sp.</i>

## **2. Análisis de los extractos de los aislados bacterianos por Cromatografía Líquida de Alta Presión (HPLC).**

A partir de los aislados seleccionados de los ensayos de confrontación, se realizaron extracciones orgánicas de los sobrenadantes de los cultivos en medio mínimo M9 de estos aislados y éstos extractos a su vez fueron analizados con la finalidad de hacer un análisis comparativo de los perfiles de compuestos producidos, con esta técnica de análisis de los extractos por HPLC no es posible determinar con exactitud

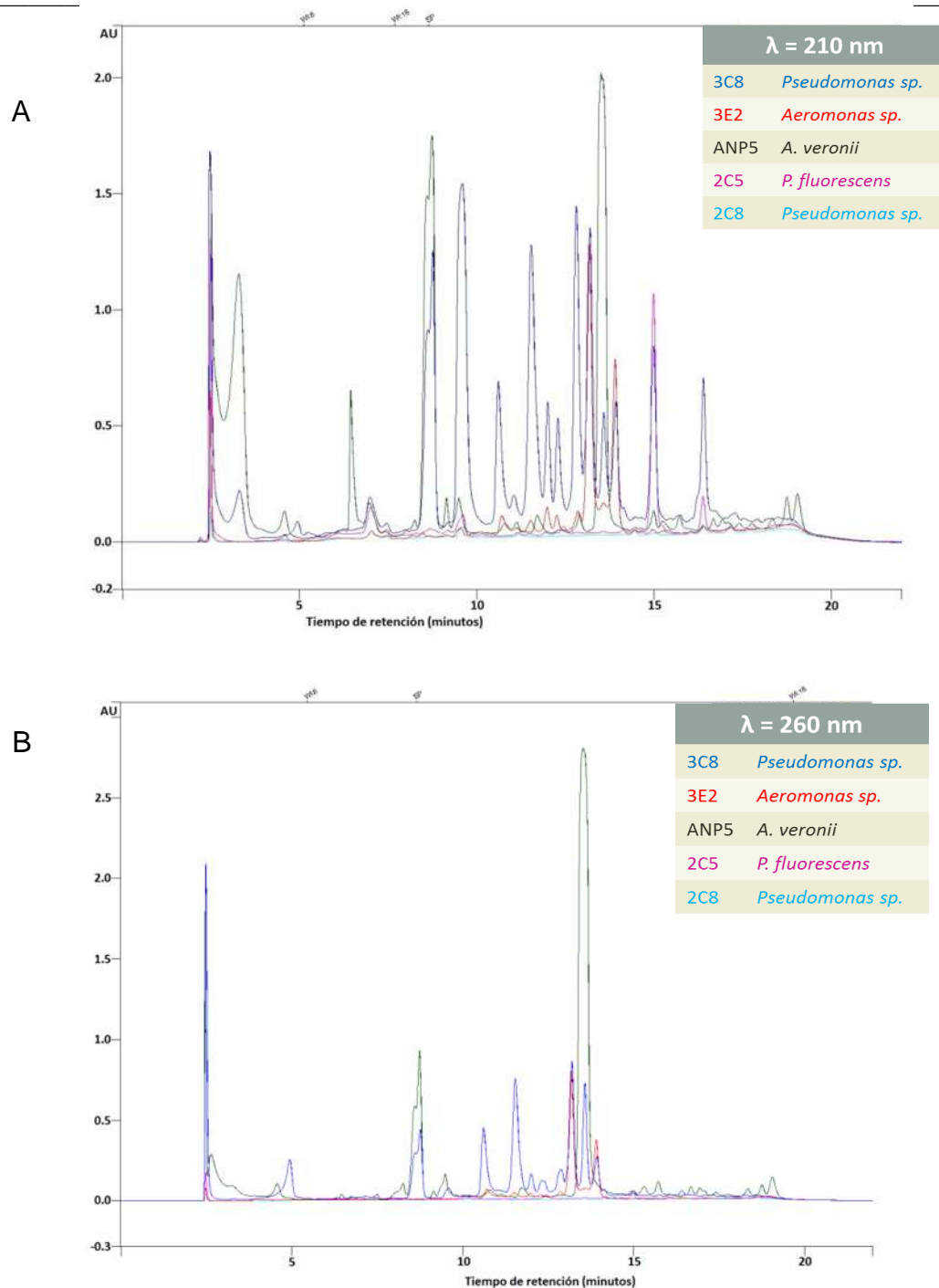


la naturaleza de cada compuesto químico, sin embargo el análisis por HPLC si nos permite tener una idea de la presencia o ausencia de compuestos presentes en los extractos de forma diferencial mediante la detección de éstos con el arreglo de diodos a longitudes de onda de 210 y 260 nm, intervalo del Ultravioleta (UV) que permiten la detección de enlaces peptídicos y las cadenas laterales de los aminoácidos triptófano, tirosina y fenilalanina, además de moléculas con presencia de anillos aromáticos respectivamente.

Los análisis de HPLC de los extractos de cada uno de los aislados mostraron la presencia de señales de distintas intensidades y distintos tiempos de retención tanto a 210 nm como a 260 nm. Por lo tanto de manera general se observó patrones de señales en los distintos cromatogramas, siendo éstos independientes del género y/o especie de los aislados analizados. Es decir, no hay una asociación entre el género de los aislados y el perfil de señales de los cromatogramas.

A partir de los cromatogramas representativos obtenidos con el detector a longitud de onda ( $\lambda$ ) de 210 nm obtenidos del análisis de algunos de los extractos (Figura 11), se pudo distinguir diferencias en las señales en los patrones de los cromatogramas en algunos de los extractos. Por ejemplo, se apreció que la intensidad de las señales del cromatograma del extracto 3C8 en contraste con el cromatograma del extracto 2C5 es muy alta tomando en cuenta las unidades de absorbancia (AU). Por lo tanto, a partir de estos datos se puede sugerir que existe diferencia en la presencia o ausencia además de la diferencia en la concentración de los compuestos presentes en los distintos extractos. De la misma manera, la detección a una longitud de onda de 260 nm se observó una señal muy intensa a un tiempo de retención de 13.5 minutos en el extracto del aislado ANP5, misma que no es visible con tal intensidad en los otros cromatogramas de otros extractos analizados (Figura 11). Con estos resultados, se sugiere que los distintos aislados bacterianos presentaron producción diferencial de compuestos, los cuales pueden ser los responsables de los efectos antagónicos de los aislados.

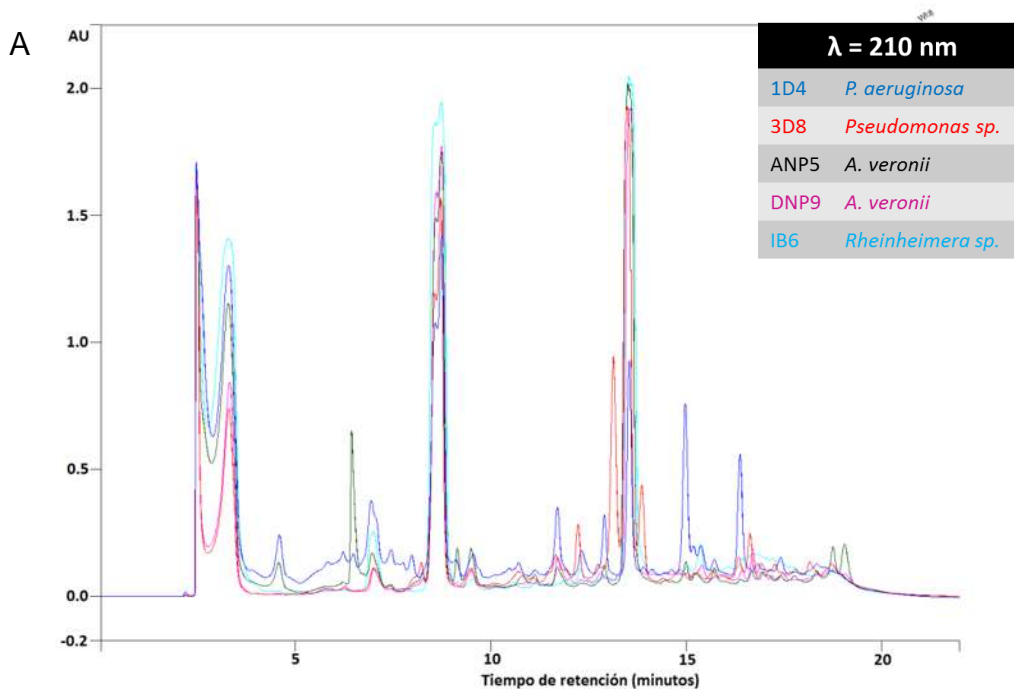


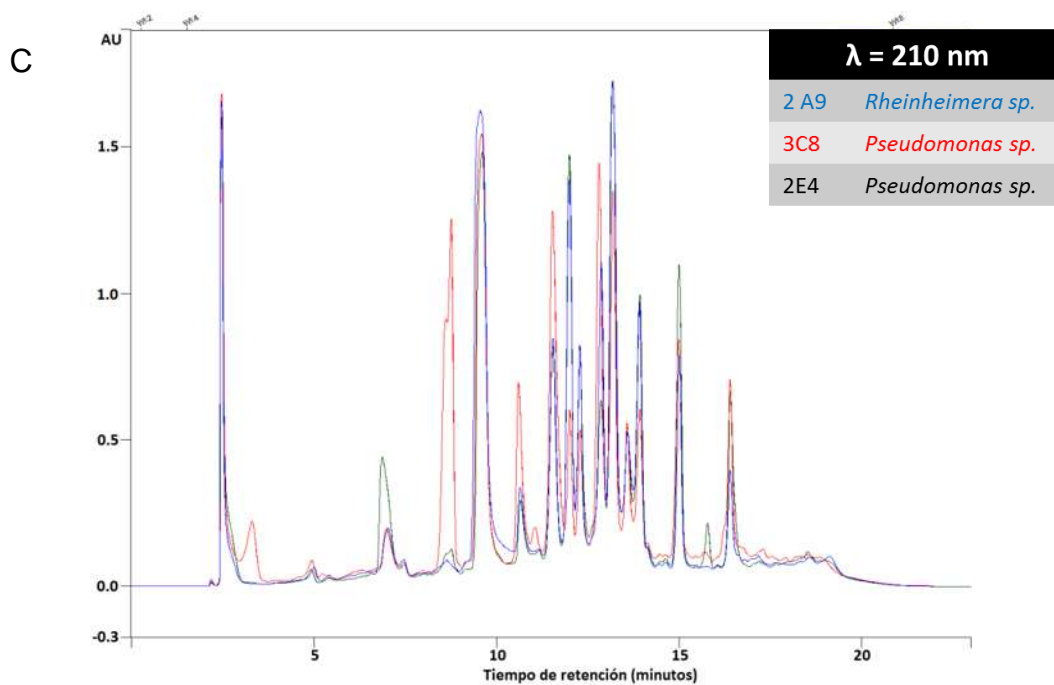
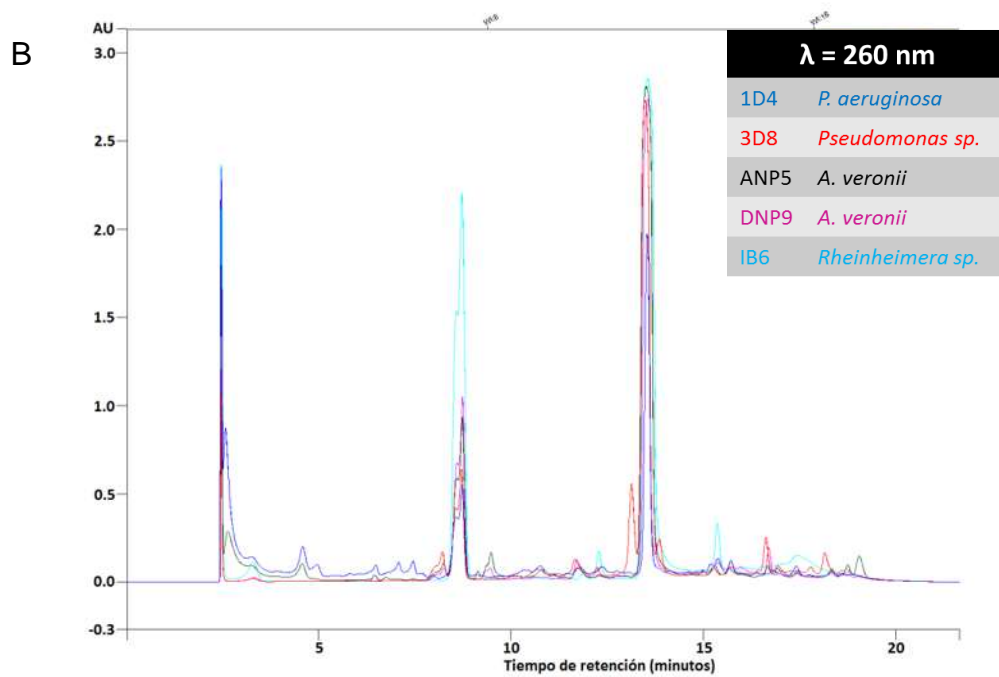


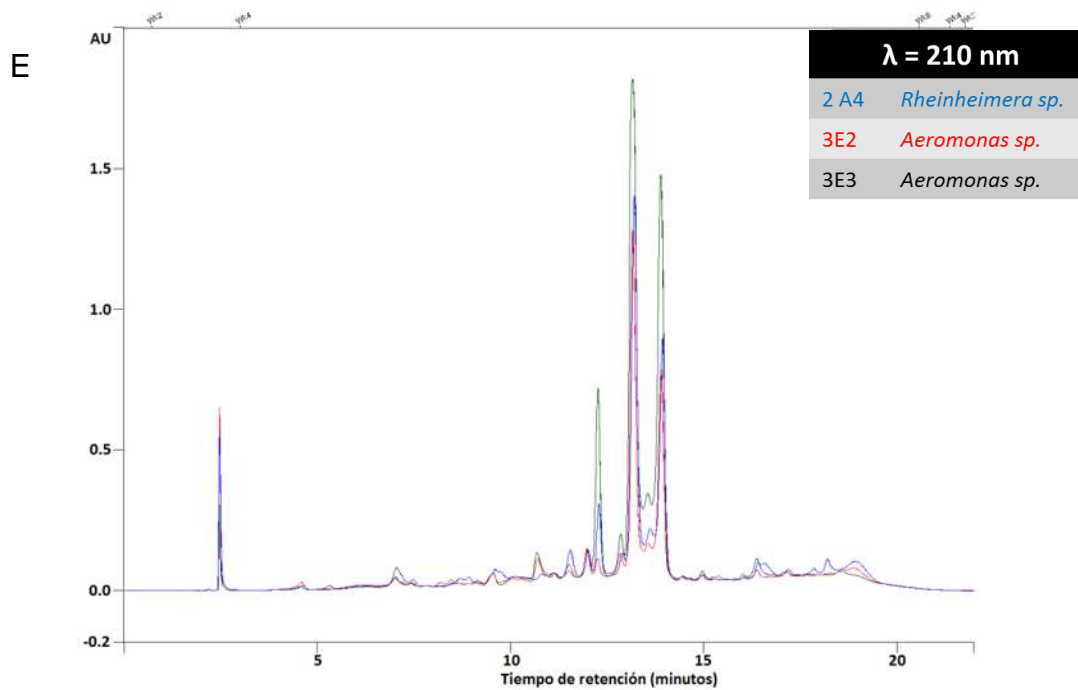
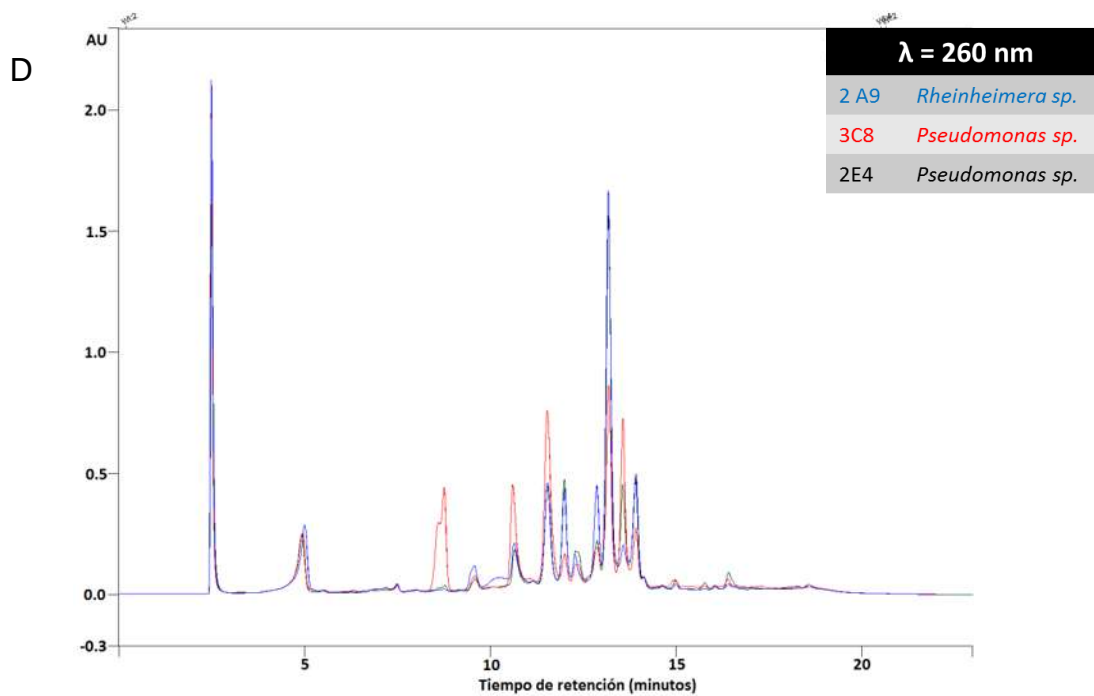
**Figura 11. Cromatogramas representativos del análisis por HPLC de algunos de los extractos de aislados bacterianos seleccionados por su capacidad inhibitoria. El análisis por HPLC se realizó utilizando las longitudes de onda  $\lambda = 210$  (A) y  $260 \text{ nm}$  (B). Se observan diferencias notorias en la intensidad de las señales de cada extracto en la detección de ambas longitudes de onda.**

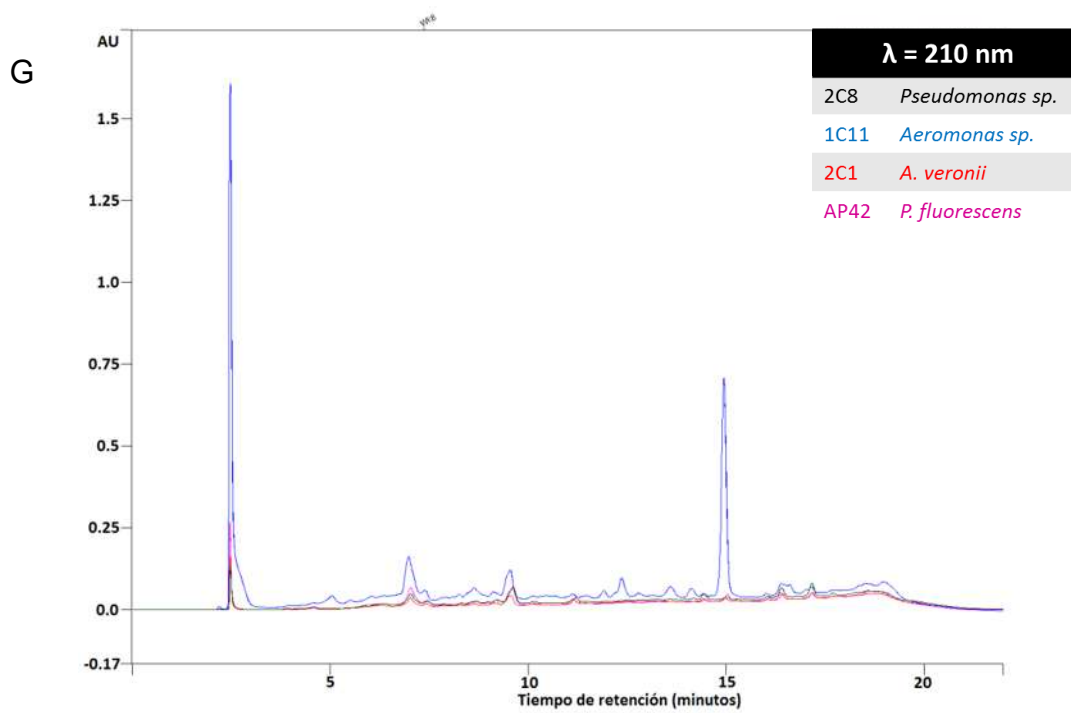
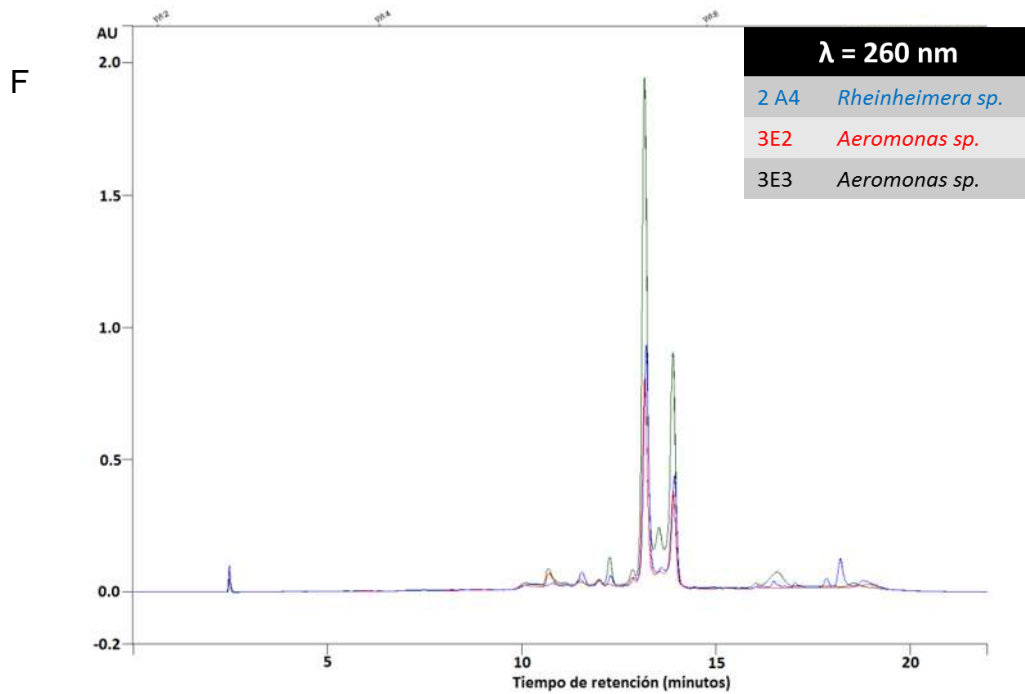


En conclusión, los cromatogramas de los aislados seleccionados se pueden agrupar en distintos patrones tomando en cuenta los perfiles de las señales a 210 y 260 nm (Figura 12). Con lo que se demuestra el parecido patrón de producción de compuestos por parte de algunos aislados que se agruparon, además, entre los distintos grupos se puede observar de manera general que puede haber diferencias en los compuestos producidos. Basándonos en datos obtenidos en el laboratorio sospechamos que los CDPs son las señales observadas en los tiempos 12.8, 13.2, 13.9 y 16.4 min.

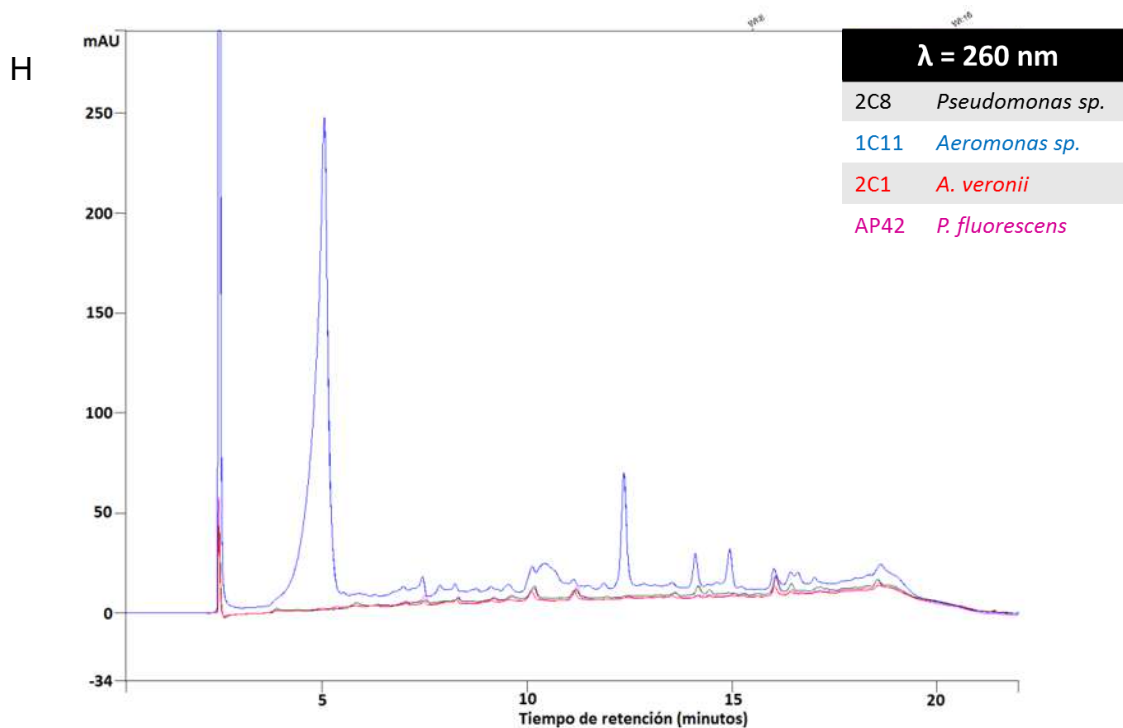












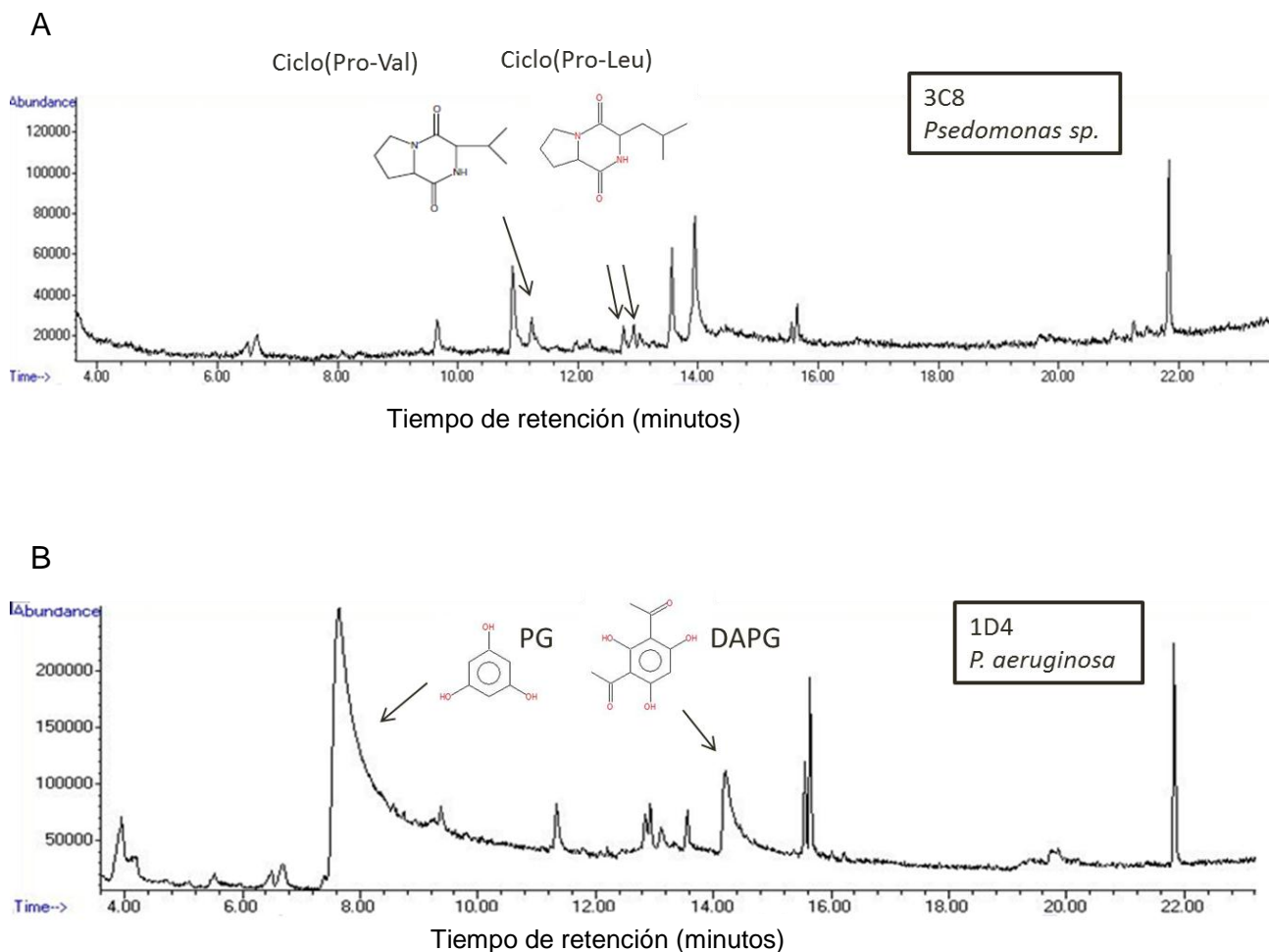
**Figura 12. Cromatogramas de los análisis por HPLC de los extractos de aislados seleccionados de la colección.** Se presentan los cromatogramas agrupándolos de acuerdo al patrón de señales de los cromatogramas a 210 y 260 nm, en las figuras (A-H) se observa graficado en el eje de las “x” el TR (min) contra la abundancia en unidades de absorbancia (AU).

### 3. Análisis de los extractos de los aislados bacterianos por Cromatografía de Gases acoplado a Espectrometría de Masas (CG-EM).

Con el objetivo de identificar la estructura química de los compuestos producidos por cada uno de los aislados, los extractos se analizaron por CG-EM. Para lo cual, se analizaron las señales de cada uno de los cromatogramas correspondientes a los distintos extractos, con la finalidad de identificar posibles compuestos que pudieran ser correlacionados con la actividad mostrada en los ensayos de interacción antagónica entre los aislados bacterianos. La Figura 13 muestra cromatogramas representativos de los análisis a partir de los aislados seleccionados de la colección (Tabla 5). En los extractos se logró identificar los ciclodipéptidos ciclo(Pro-Val) y ciclo(Pro-Leu) en la mayoría de los aislados analizados en los tiempos de retención (TR) 11.2 minutos, 12.7 y 13.0 minutos, respectivamente. En algunos aislados se detectó la presencia del policétido 2,4-diacetilfloroglucinol cuyo

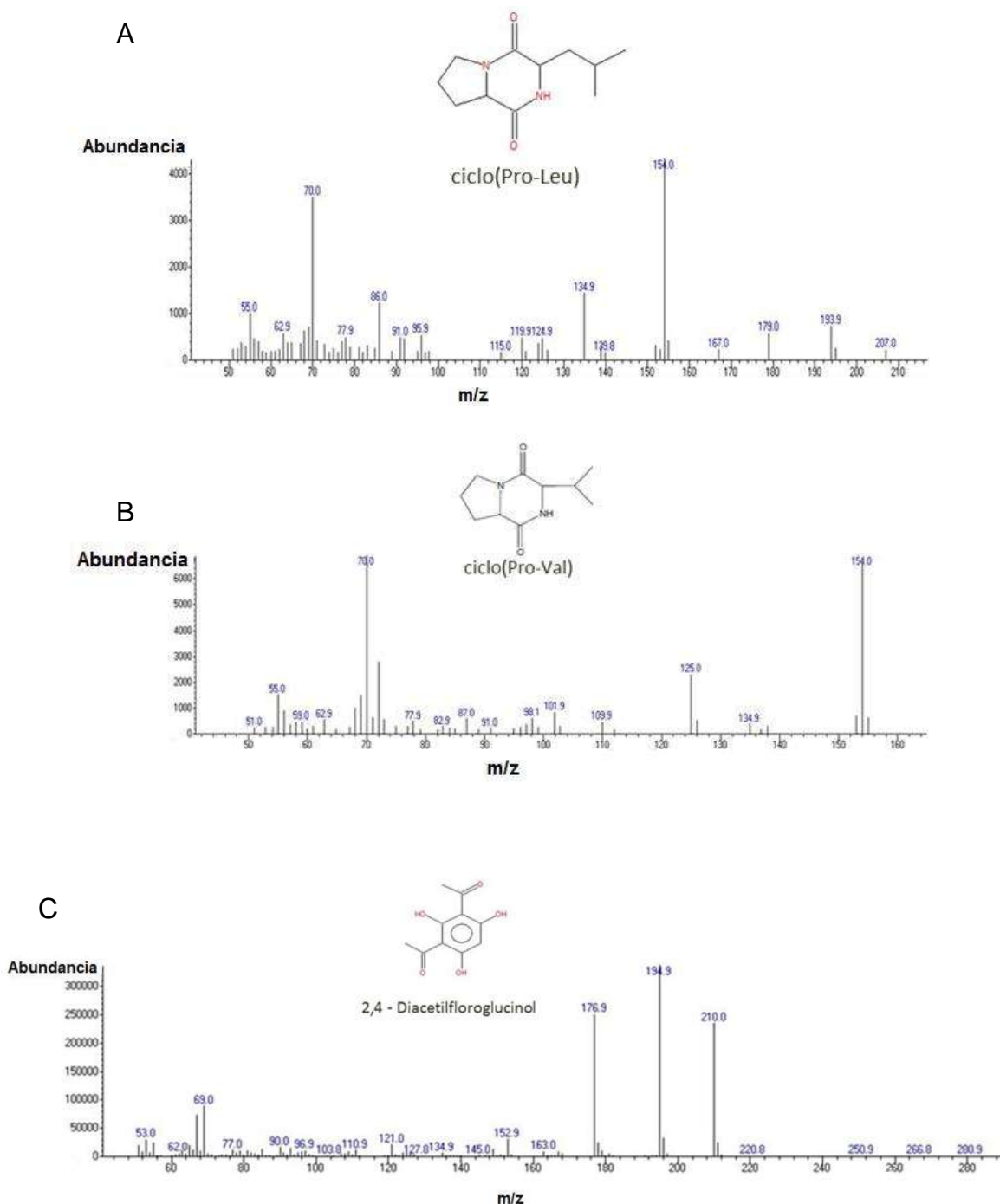


TR fue de 14.2 minutos, además del acetilfloroglucinol a los 12.4 minutos y el floroglucinol a los 7.6 minutos, determinando en base a su espectro de masas la estructura química de cada uno de los compuestos, (Figura 14).



**Figura 13. Cromatogramas representativos de los análisis de los extractos de los aislados seleccionados por Cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas.** En el eje de las X se encuentra el tiempo de retención contra la abundancia o intensidad de las señales en el eje de las Y. Se muestra un cromatograma en el cual se identificó a los ciclodipéptidos ciclo(Pro-Leu) y ciclo(Pro-Val) que corresponde al aislado 3C8 (A) y un cromatograma representativo correspondiente al aislado 1D4, donde se detectó al policétido 2,4-Diacetilfloroglucinol (B).





**Figura 14. Espectros de masas de los compuestos ciclo(Pro-Leu) (A), ciclo(Pro-Val) (B) y 2,4-Diacetilfloroglucinol (C).** En los espectros de masas se distingue en el eje de las X la relación masa/carga de cada fragmento de la molécula y en el eje de las Y la abundancia de cada fragmento, coincidiendo cada uno de ellos con los espectros de masas de los compuestos identificados.



El análisis de la identificación de los distintos compuestos en las distintas muestras arrojó la detección de los ciclodipéptidos ciclo(Pro-Val) y ciclo(Pro-Leu) en 12 de los 16 aislados seleccionados de la colección y además se determinó la presencia del policétido 2,4-Diacetilfloroglucinol (DAPG) en sólo 5 del total de los extractos procedentes de los aislados. El extracto del aislado 3D8 fue el único en el que se encontraron los ciclodipéptidos además de los policétidos, en los restantes se encontraron sólo unos u otros compuestos. Por lo que se sugiere que la producción de estos metabolitos no está relacionada con el género y/o especie de los aislados, (Tabla 6).

**Tabla 6. Compuestos de interés identificados mediante el análisis por CG-EM.**

Aislado		Compuestos
1C11	<i>P. fluorescens</i>	ciclo(Pro-Val)
		ciclo(Pro-Leu)
AP42	<i>Pseudomonas sp.</i>	ciclo(Pro-Val)
		ciclo(Pro-Leu)
2 A9	<i>Rheinheimera sp.</i>	ciclo(Pro-Val)
		ciclo(Pro-Leu)
2C1	<i>Pseudomonas sp.</i>	ciclo(Pro-Val)
		ciclo(Pro-Leu)
2C5	<i>P. fluorescens</i>	ciclo(Pro-Val)
		ciclo(Pro-Leu)
2C8	<i>Pseudomonas sp.</i>	ciclo(Pro-Val)
		ciclo(Pro-Leu)
2E4	<i>Pseudomonas sp.</i>	ciclo(Pro-Val)
		ciclo(Pro-Leu)
3C8	<i>Pseudomonas sp.</i>	ciclo(Pro-Val)
		ciclo(Pro-Leu)
3E2	<i>Aeromonas sp.</i>	ciclo(Pro-Val)
		ciclo(Pro-Leu)
3E3	<i>Aeromonas sp.</i>	ciclo(Pro-Val)
		ciclo(Pro-Leu)
2A4	<i>Rheinheimera sp.</i>	ciclo(Pro-Val)
		ciclo(Pro-Leu)



**Tabla 6. Compuestos de interés identificados mediante el análisis por CG-EM (continuación).**

Aislado		Compuestos
3D8	<i>Pseudomonas sp.</i>	Ciclo(Pro-Val) / ciclo(Pro-Leu)
		1,3,5-Bencenotriol
		2,4-Diacetilfloroglucinol
ANP5	<i>Aeromonas veronii</i>	1,3,5-Bencenotriol
		2,4-Diacetilfloroglucinol
DNP9	<i>Aeromonas veronii</i>	1,3,5-Bencenotriol
		Acetilfloroglucinol
		2,4-Diacetilfloroglucinol
1D4	<i>P. aeruginosa</i>	1,3,5-Bencenotriol
		2,4-Diacetilfloroglucinol
1B6	<i>Rheinheimera sp.</i>	1,3,5-Bencenotriol
		2,4-Diacetilfloroglucinol

Con el objetivo de correlacionar los datos obtenidos en los análisis de los extractos por HPLC y CG-EM se realizó un análisis de componentes principales (PCA). Para lo cual, se utilizaron los datos obtenidos en el análisis de los extractos por HPLC, que corresponde al área bajo la curva de cada señal detectada a las longitudes de onda de 210 y 260 nm de los cromatogramas de los extractos procedentes de los aislados seleccionados. Además, se incluyeron como control negativo, los datos de los cromatogramas de los aislados bacterianos de la colección sin capacidad antagonica.

En el eje de las X se encuentra el factor 1 con un porcentaje de la varianza total de 44.65% y se indica el área bajo la curva de las señales de manera exponencial y en el eje de las Y se encuentra el factor 2 con un 35.84% de la varianza total. De la misma manera la graduación indica el área bajo la curva de la señal de forma exponencial.

En el gráfico de PCA con detección a 210 nm (Figura 15), que permite la detección del enlace peptídico, así como moléculas heterocíclicas, se observó la separación de los datos referentes a los aislados en pequeños grupos de acuerdo a dos únicos factores que contribuyen al 80.49% de la varianza total. La agrupación de los aislados con los datos del análisis por HPLC se correlacionó con la detección de los ciclodipéptidos y los policétidos por CG-EM, es decir, los aislados 3E2, 3E3, 2 A4, 3C8, 2E4, y 2 A9 encerrados en círculo azul concuerdan con la detección de los



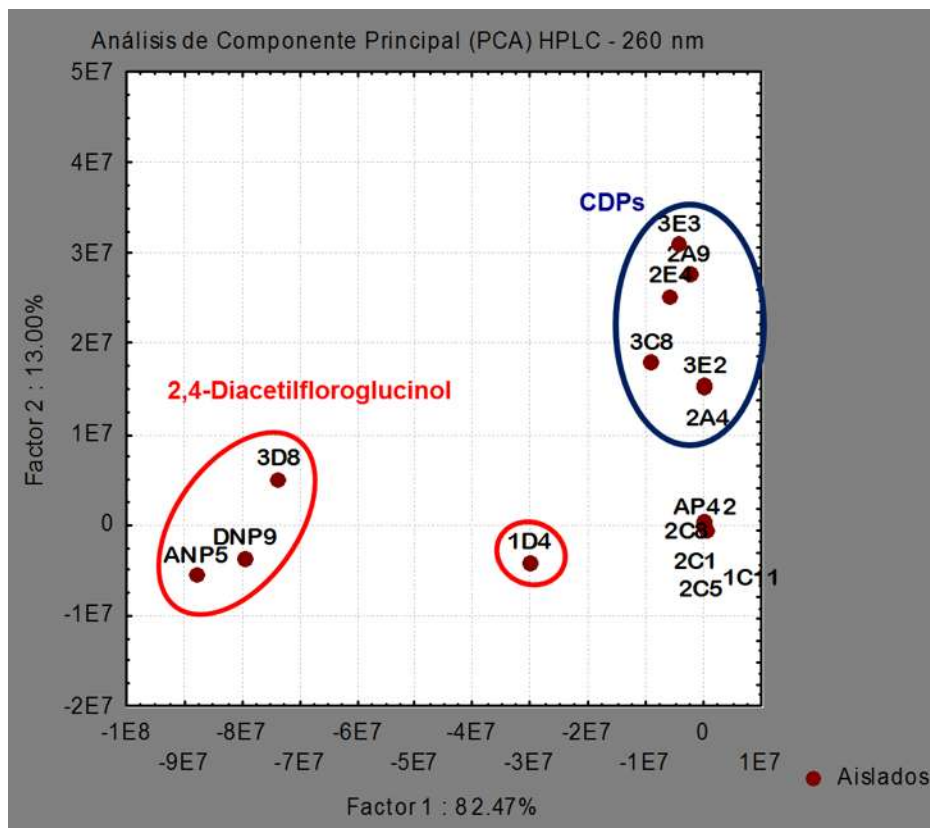


segundo factor con un 35.84% de la varianza total. Los aislados productores de ciclodipéptidos se encerraron en círculos azules y los aislados productores de 2,4-DAPG se encerraron en círculo rojo.

En el gráfico de PCA con detección a 260 nm por HPLC (Figura 16), que permite la detección de compuestos aromáticos, así como las cadenas laterales de los aminoácidos triptófano, fenilalanina y tirosina, los aislados se separaron en grupos que de la misma manera, se correlacionaron con la detección de los ciclodipéptidos (azul) y el policétido 2,4-DAPG (rojo). De la misma manera, se indican los 2 factores que contribuyen con mayor porcentaje de la covarianza total y en el eje de las X y en el de las Y se encuentran graduados de manera exponencial las áreas bajo la curva de las señales en HPLC, lo que indica que la separación de los aislados de un mismo grupo se debe a la diferencia de la intensidad de las señales responsables de la agrupación. En este caso el aislado 3D8, que produce tanto ciclodipéptidos como 2,4-DAPG y que se agrupó en el círculo rojo es también el que más se acerca en sentido vertical al grupo de los ciclodipéptidos, en sentido horizontal el aislado 1D4 (en círculo rojo) se separa del grupo y se acerca al punto de coordenadas (0,0) debido a una menor producción del 2,4-DAPG, esto se observa en el gráfico así como en los cromatogramas de HPLC.

Los datos obtenidos a partir del análisis de componentes principales basado en los resultados de los cromatogramas de los extractos por HPLC se observa que hay una correlación entre éstos y los compuestos detectados en los extractos de los aislados por CG-EM. Por lo tanto, los aislados bacterianos se pueden separar en grupos en el PCA debido a la producción de los ciclodipéptidos ciclo(Pro-Leu) y ciclo(Pro-Val) y el policétido 2,4-Diacetilfloroglucinol.





**Figura 16. Análisis de componentes principales (PCA) de los datos de HPLC con detección a 260 nm.** En el eje de las X se muestra la numeración exponencial que corresponde al área bajo la curva de las señales de los cromatogramas de HPLC y que corresponden al primer factor con un 82.47% de la varianza total de los datos. En el eje de las Y también se observan de manera exponencial el área bajo la curva de las señales y el segundo factor con un 13.00% de la varianza total. Los aislados productores de CDPs se agruparon con el análisis y se encerraron en azul, los aislados que producen 2,4-DAPG se agruparon y para distinguirlos se encerraron en rojo.

#### 4. Evaluación de la actividad biológica de los extractos de los aislados bacterianos.

Para determinar el papel biológico de los extractos que contienen los ciclodipéptidos ciclo(Pro-Val), ciclo(Pro-Leu) y el policétido 2,4-Diacetilfloroglucinol, dichos extractos se probaron mediante ensayos de difusión en placa y evaluar así su capacidad para inhibir el crecimiento de otros aislados bacterianos de la colección obtenida de la poza Jim's Pond. Además, con el objetivo de comparar el efecto de los extractos de los aislados sobre aislados externos al nicho ecológico





analizado, se utilizaron las bacterias *Pseudomonas cuatrociénegasensis* y *Bacillus coahuilensis* que fueron aisladas de una poza distinta llamada poza de desecación que se encuentra distante de la poza Jim´s Pond y que también pertenece al sistema del Churince.

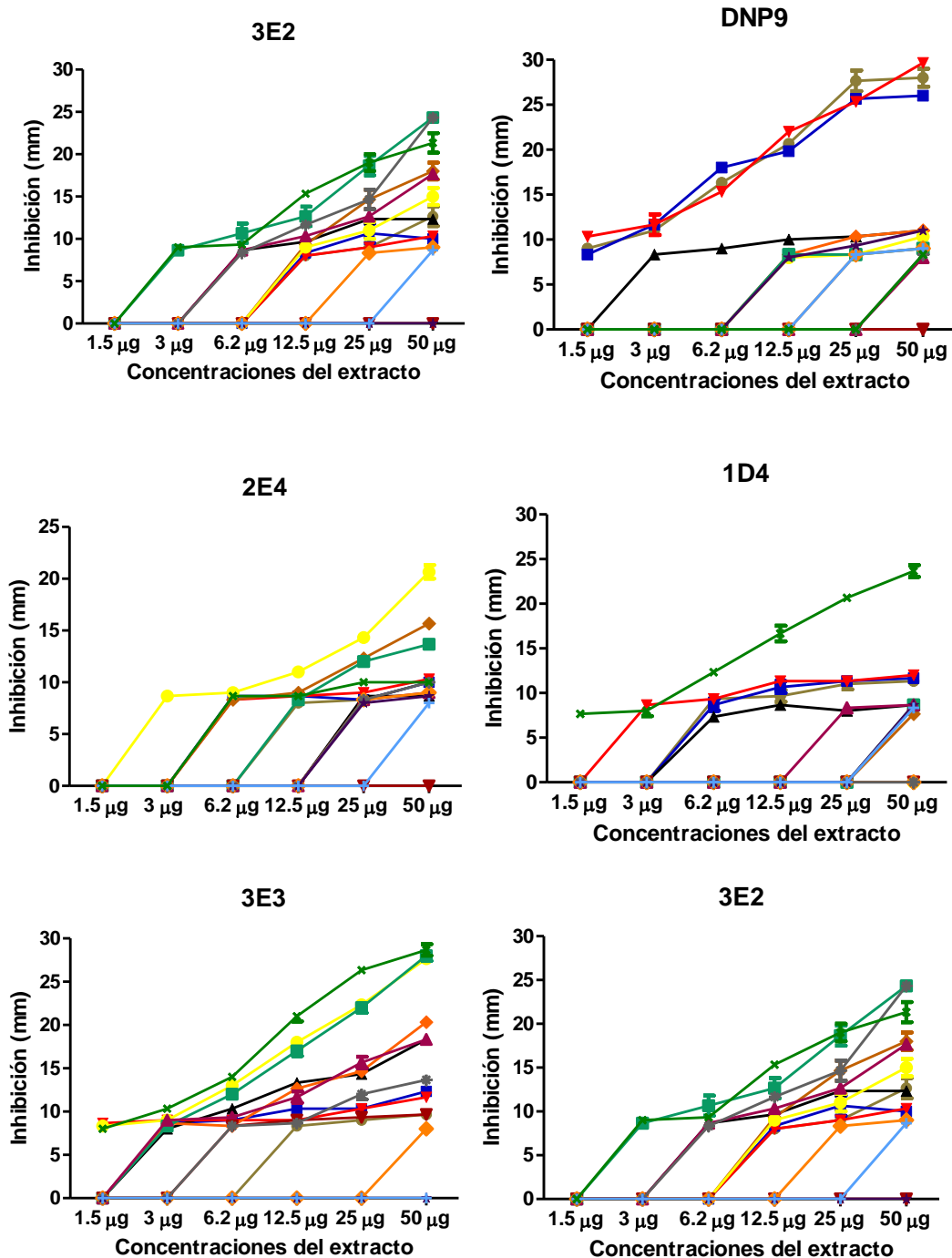
Se utilizaron concentraciones crecientes de los extractos de los sobrenadantes de cultivo en medio mínimo M9 analizados por HPLC y CG-EM disueltos en DMSO como vehículo, con el objetivo de obtener una curva dosis-efecto, las concentraciones utilizadas fueron 1.5, 3, 6, 12.5, 25 y 50µg/6µl. Como controles negativos se usaron extractos del medio mínimo M9 sin crecimiento bacteriano y el vehículo DMSO.

Se observó un efecto inhibitorio por parte de algunos de los extractos de los 16 aislados bacterianos seleccionados por su actividad antagónica. El efecto inhibitorio se identificó por la formación de un halo de inhibición del crecimiento bacteriano alrededor de los discos de papel filtro que contienen los extractos analizados (Figura 17). Los resultados indicaron que el diámetro de los halos de inhibición fue dependiente de la concentración del extracto utilizado en los ensayos (Figura 18).

La inhibición positiva o negativa de los aislados probados dependió del extracto utilizado, variando la sensibilidad o resistencia de cada aislado frente a los extractos analizados. De la misma manera que en los ensayos de interacción antagónica de los aislados bacterianos (Figura 9), se observó la resistencia o sensibilidad de algunos aislados frente a algunos de los extractos, manteniendo la misma tendencia de los aislados antagonistas y sus extractos a antagonizar y de los aislados sensibles a ser antagonizados por los antagonistas, coincidiendo con los datos iniciales de la matriz de interacciones. Las bacterias *P. cuatrociénegasensis* y *B. coahuilensis* mostraron sensibilidad a la inhibición por parte de la mayoría de los extractos (Figura 18). Algunos de los extractos presentaron un efecto más elevado respecto a otros para antagonizar a los aislados, mientras que otros presentaron en general muy baja actividad inhibitoria o de alta resistencia (Figura 18), datos que coinciden con los resultados de los análisis por HPLC, CG-EM y su correlación por medio del análisis de componentes principales, donde se observa un agrupamiento que se debe a la cantidad y contenido o no de ciclodipéptidos y el policétido en los extractos de los diferentes aislados.







**Figura 18. Ensayos de difusión en placa de los extractos de los aislados sobre aislados representativos de la colección.** En el eje de las X de cada una de las gráficas se muestran las concentraciones de los extractos utilizados, en el eje de las Y se muestra la inhibición observada en cada aislado por la formación de un halo de inhibición medido en mm, se observa el código de colores para cada aislado sobre los que se probaron los extractos. Los halos de inhibición observados fueron dependientes de la concentración de los extractos.  $n=3 \pm DE$ .



Además con el objetivo de dilucidar que extractos tienen mayor capacidad de inhibición sobre los aislados de la colección, se evaluó esta capacidad de inhibición de extractos de los aislados que contienen los ciclodipéptidos ciclo(Pro-Val) y ciclo(Pro-Leu) además de los extractos que contienen el policétido 2,4-DAPG sobre todos los aislados, (Tabla 7). El análisis de cada extracto se realizó mediante ensayos de difusión en placa, observándose que tanto los extractos que contienen los ciclodipéptidos como los que contienen el policétido fueron capaces de inhibir el crecimiento de varios de los aislados de la colección. La cantidad de aislados de la colección inhibidos por cada extracto fue dependiente de los compuestos que contiene cada extracto. Se probaron los extractos de los aislados 3D8 y 1D4 que contienen el policétido 2,4-DAPG y los extractos de los aislados 3E2 y 2E4. Existe una relación con la cantidad producida de éstos compuestos por parte de los diferentes aislados con su capacidad inhibitoria o antagónica, se sugiere que estos compuestos por lo tanto participan en el control poblacional bacteriano de los aislados obtenidos de la poza Jim's Pond en Cuatro Ciénegas, Coahuila.

**Tabla 7. Aislados de la colección inhibidos por extractos que contienen los ciclodipéptidos ciclo(Pro-Val) y ciclo(Pro-Leu) y el policétido 2,4-DAPG.**

<b>2,4-DAPG</b>		<b>Ciclodipéptidos</b>	
<b>Extracto 3D8 (29)</b>	<b>Extracto 1D4 (17)</b>	<b>Extracto 3E2 (12)</b>	<b>Extracto 2E4 (28)</b>
CP14, CP18, CP27, CP29, CP34, CP36, CP37, CP49, CNNP19, CNNP27, CNNP28, CNNP34, CNP39, AP10, AP19, ANP5, ANNP30, 1A5, 1A8, 1A9, 1A10, 1C9, 1C11, 2A3, 2A4, 2A8, 2C2, 2C8, 2C9.	CP14, CP18, CNNP19, CNNP27, CNNP28, CNNP34, AP10, AP19, 1A5, 1A8, 1A9, 1A10, 1C9, 2A3, 2A4, 2A8, 2C8.	CNNP19, CNNP28, AP10, AP42, 1A5, 1A8, 1A10, 1C9, 1C11, 2A3, 2A4, 2A8.	CP14, CP18, CP27, CP29, CP36, CP37, CNNP19, CNNP27, CNNP28, CNNP34, CNP39, AP10, AP42, AP19, ANP5, ANNP30, 1A5, 1A8, 1A9, 1A10, 1C9, 1C11, 2A3, 2A4, 2A8, 2C2, 2C8, 2C9.

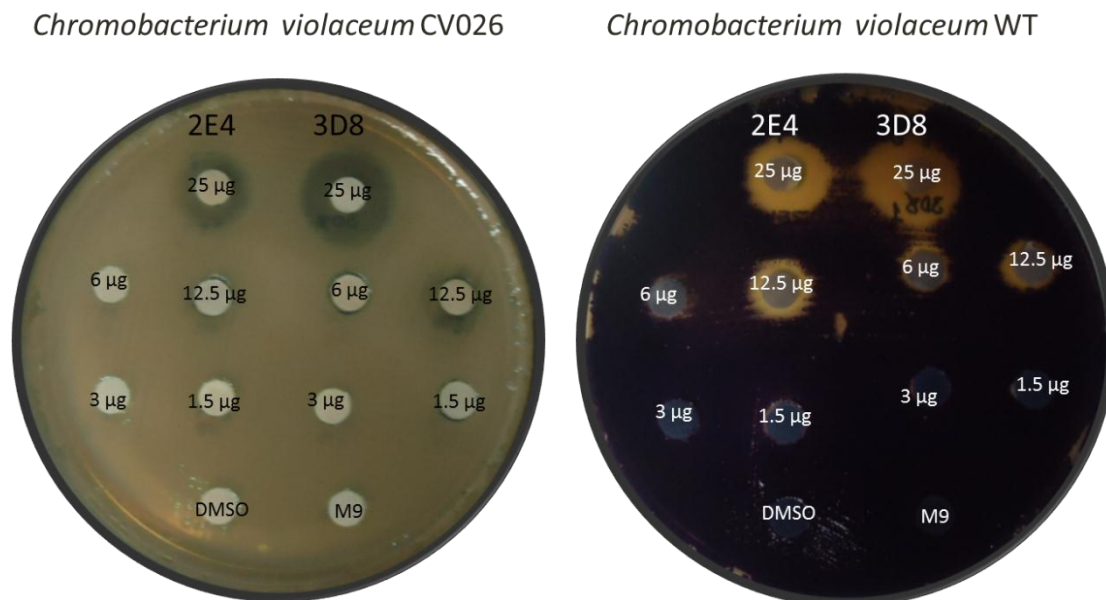


## 5. Determinación del mecanismo general de control poblacional de los extractos de los aislados bacterianos.

Con el objetivo de proponer un mecanismo a través del cual los compuestos, los ciclodipeptidos ciclo(Pro-Val) y ciclo(Pro-Leu) además del policétido 2,4-Diacetilfloroglucinol, producidos por las bacterias aisladas de la poza Jim's Pond del sistema de Churince localizado en el valle de Cuatro Ciénegas, en relación a su capacidad de inhibición. Se realizaron ensayos de difusión en placa de los extractos, utilizando la bacteria biosensora de homoserina lactonas aciladas (AHL) *Chromobacterium violaceum* CV026 la cual es incapaz de sintetizar AHL debido a una mutación en el gen *cvil* (que codifica para la sintasa de AHL) de su contraparte silvestre *C. violaceum* (WT), también utilizada en los ensayos. Este sistema biosensor nos permite diferenciar entre mecanismos de acción de compuestos en el contexto de la percepción de quorum. Con la finalidad de descartar un efecto tóxico de los extractos hacia las bacterias biosensoras y evitar así resultados erróneos en cuanto a la posibilidad de observar un efecto inhibitorio de la percepción de quorum, se utilizaron en el ensayo diferentes concentraciones de los extractos que van de 1.5 a 25 µg disueltas en 6µl del vehículo impregnadas en un disco de papel filtro que se colocó encima de un tapete de las bacterias *C. violaceum* CV026 y *C. violaceum* WT realizado por siembra masiva con un hisopo. Se utilizaron extractos del medio mínimo M9 así como el vehículo DMSO como controles negativos.

Los ensayos de difusión en placa de los extractos que contienen los ciclodipeptidos y el policétido (extractos de los aislados 2E4 y 3D8 respectivamente) en las bacterias *C. violaceum* WT y *C. violaceum* CV026 producen halos de inhibición de crecimiento dependientes de la concentración de los extractos con ambos tipos de compuestos (Figura 19). Lo anterior sugiere que el efecto se relaciona con la actividad antibacteriana de los compuestos y se descarta la posibilidad de que la inhibición sea debida a la inhibición de la percepción de quorum por parte de los ciclodipeptidos ciclo(Pro-Val) y ciclo(Pro-Leu).





**Figura 19. Ensayos de difusión en placa de extractos que contienen ciclo(Pro-Val) y ciclo(Pro-Leu) (2E4), así como 2,4-DAPG (3D8) con las bacterias *C. violaceum* WT y CV026.** Se observa la formación de halos de inhibición dependientes de la concentración en ambos extractos tanto en la bacteria *C. violaceum* WT como en la bacteria biosensora *C. violaceum* CV026. Se probaron las concentraciones de 1.5, 3, 6, 12.5 y 25 µg de cada extracto en ambas bacterias.

Mediante los resultados de este análisis se sugiere que los extractos procedentes de los aislados seleccionados por su capacidad de inhibición (contienen los ciclodipéptidos ciclo(Pro-Val) y ciclo(Pro-Leu) además del policétido 2,4-DAPG), inhiben el crecimiento de los biosensores mediante un mecanismo antibacteriano y que no tienen capacidad para inhibir la percepción de quorum en la bacteria *C. violaceum* WT ni inducir la formación de violaceína en la bacteria biosensora *C. violaceum* CV026.



## VII. DISCUSIÓN.

La cuenca de Cuatro Ciénegas en el estado de Coahuila es un valle que mide aproximadamente 1200 kilómetros cuadrados y se encuentra a 740 metros sobre el nivel del mar, se encuentra rodeado por altas montañas (> 3,000 m). Es una cuenca cerrada que presenta altos niveles de evaporación y que recibe aproximadamente 150 mm de precipitación anual. A pesar de su clima árido, el valle alberga un extenso sistema de arroyos y pozas de significativo interés ecológico. Otra característica remarcable de los sistemas acuáticos incluye los estromatolitos vivientes y otras comunidades microbianas que forman las bases de redes tróficas complejas (Souza y col., 2006). Desde esta perspectiva, la cuenca de Cuatro Ciénegas es ampliamente considerada como un oasis de biodiversidad en el desierto de Chihuahua. Aunque hay amplia evidencia de que los procariotes forman la base de las redes tróficas en este entorno único, en realidad se sabe muy poco acerca de la diversidad microbiana en este ecosistema. Además, la mayoría de los hábitats acuáticos en esta área son extremadamente oligotróficos debido al menos a los no detectables niveles de fósforo (Escalante y col., 2008). Anteriormente se han publicado estudios acerca de la diversidad procariótica en los hábitats acuáticos de Cuatro Ciénegas, (García-Pichel y col., 2002; Elser y col., 2005; Souza y col., 2006) dos de ellos se enfocaron en la diversidad encontrada en los tapetes microbianos y estromatolitos de diferentes sitios del área de estudio. Souza y colaboradores (2006) estudiaron la composición de las comunidades microbianas en varios sitios de muestreo dentro del valle y en áreas circundantes, los autores se refieren a niveles altos de diversidad microbiana e incluso nombran a Cuatro Ciénegas como un “oasis en el desierto” de vida microbiana. Tomando en cuenta los niveles de oligotrofismo de las aguas de Cuatro Ciénegas y que a menudo representan ambientes extremos acuáticos con altas concentraciones de magnesio, calcio, carbonatos y sulfatos, estos datos de diversidad bacteriana son sorprendentes (Souza y col., 2006). Además también recientemente se han publicado descubrimientos de dos especies endémicas de bacterias en aguas de Cuatro Ciénegas, *Pseudomonas cuatrocienegasensis* (Escalante y col., 2009) y *Bacillus coahuilensis* (Cerritos y col., 2008). En un estudio realizado por Toribio y col., (2011) encontraron que aislados de *Pseudomonas koreensis* tienen la capacidad para producir un biosurfactante, posiblemente un lipopéptido cíclico que tiene capacidad inhibitoria de crecimiento contra *Exiguobacterium aurantiacum* m5-66 y *Bacillus subtilis* ATCC6633, capacidad que le permite diferenciarse de la cepa originalmente conocida en Corea, y que muy posiblemente utiliza para eliminar la competencia por nutrientes en un ambiente de oligotrofismo extremo. Datos recientes han empezado a explicar las interacciones que llevan a cabo las comunidades bacterianas de los diferentes sitios en Cuatro Ciénegas, uno de ellos



describe, usando análisis de redes, las redes de interacción de *Bacillus* del sedimento acuático de una poza oligotrófica (Pérez-Gutiérrez y col., 2013), en este estudio observaron un comportamiento jerárquico de las interacciones a manera de una cadena alimenticia, en donde una bacteria antagonista predomina e inhibe a otra, que a la vez inhibe a otras de rango inferior. Aguirre-von-Wobeser (2014) y colaboradores hicieron un estudio de las interacciones antagónicas de aislados bacterianos que consistieron de *Pseudomonas*, *Halomonas*, *Shewanella*, *Rheinheimera* y *Aeromonas*, que a diferencia del anterior, no observaron un comportamiento jerárquico de las interacciones, y suponen que al ser géneros y especies distintas, puede explicarse este comportamiento. En el estudio se concluye llamando a las interacciones antagónicas encontradas como “pequeño mundo” porque dos aislados cualquiera pueden llegar a estar conectados por un pequeño número de interacciones. La red fue determinada por los emisores, implicando que los aislados antagonistas tienen una mayor influencia sobre su estructura que sobre los sensibles.

Hasta el momento no se ha publicado ningún estudio que explique cuáles son los compuestos responsables del comportamiento antagónico por parte de las bacterias aisladas de Cuatro Ciénegas, en nuestro trabajo utilizamos una colección de aislados bacterianos obtenidos de la poza Jim's Pond que pertenece al sistema de Churince y que consistió principalmente de *Pseudomonas*, *Aeromonas*, *Halomonas* y *Rheinheimera*, que fue donada por la Dra. Valeria Souza Saldívar. Al realizar los ensayos de interacción observamos un patrón de comportamiento muy similar al modelo matemático de estudio de comunidades microbianas denominado “pequeño mundo”, en el que miembros aleatorios de una comunidad pueden estar unidos por lo menos mediante interacciones débiles. Se encontraron aislados altamente antagónicos contra los demás de la colección y otros muy sensibles a este antagonismo, en general se observó una alta resistencia al antagonismo en los aislados antagónicos que puede ser explicada si los mismos mecanismos usados para resistir a su propia toxicidad son utilizados para resistir el antagonismo de otros aislados (Michel-Briand, 2002). Los perfiles de antagonismo fueron diferentes para todos los aislados, es decir, los diferentes aislados antagónicos mostraron variaciones en el número de aislados que afectaron, lo que refleja variaciones en las capacidades antagonistas y de resistencia de cada uno de los aislados individuales, sugiriendo además la existencia de múltiples compuestos responsables de la actividad antagónica o por diferentes mecanismos. En nuestro estudio utilizamos dos medios de cultivo: Luria-Bertani y medio mínimo M9 para determinar las interacciones antagónicas, las interacciones antagónicas presentaron el mismo patrón en ambos medios y con la misma intensidad. Con estos ensayos de interacción pudimos observar el potencial antagónico de cada uno de los aislados de la colección.





Basados en los resultados de los ensayos de interacción seleccionamos los aislados con mayor capacidad antagónica buscando la mayor representatividad entre género y especies entre los aislados de la colección, los extractos realizados a los mismos y analizados por HPLC revelaron patrones distintos de señales en los distintos extractos, pudiendo formar pequeños grupos, en las dos longitudes de onda utilizadas en el análisis (210 y 260 nm). Se observaron señales intensas en la mayoría de los aislados, lo que sugirió la presencia de compuestos con posibles enlaces peptídicos en su estructura, así como compuestos aromáticos o con estructuras similares a las bases nitrogenadas. El análisis por HPLC, por lo tanto, sugiere la presencia de compuestos en los extractos, los cuales pudieran ser los responsables de la actividad antagónica, sin embargo no proporciona la certeza científica de la estructura molecular de los compuestos. El análisis de los extractos por Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas reveló la presencia de los ciclodipéptidos ciclo(Pro-Val) y ciclo(Pro-Leu) en la mayoría de los aislados además del policétido 2,4-Diacetilfloroglucinol en algunos de los aislados analizados. Estos datos concuerdan con los datos obtenidos previamente por el análisis por HPLC. Con los datos de las áreas bajo la curva de todas las señales de los análisis de los extractos por HPLC se realizó el análisis de componentes (PCA) y se observó una correlación entre los datos arrojados también por CG-EM, ya que con los datos del análisis por HPLC se observó la formación de grupos que corresponden a la separación de los extractos de los aislados en los que detectó a los ciclodipéptidos y en otro grupo a los aislados que producen el policétido, quedando claro que los compuestos fueron detectados con ambas metodologías.

Los ciclodipéptidos y sus derivados, las dicetopiperazinas son los péptidos cíclicos más pequeños que existen, comúnmente sintetizados a partir de aminoácidos por una gran variedad de organismos (Carvalho y col., 2012), la capacidad de los microorganismos para producir dicetopiperazinas está ampliamente distribuida, algunos datos publicados muestran que aproximadamente un 90% de las bacterias Gram-negativas los producen (Carvalho y col., 2012), han sido aislados también de bacterias Gram-positivas, hongos y organismos marinos. A los ciclodipéptidos o dicetopiperazinas se les han asignado actividades biológicas importantes, tales como antibacterianas, antifúngicas, anticancerígenas (Kano y col. 1999). Se ha reportado que algunos ciclodipéptidos son capaces de activar o antagonizar los sistemas de percepción de quórum mediados por LuxR en bacterias, fenómeno usado por las bacterias como sistema de comunicación y percibir y responder a factores ambientales mediante la producción y reconocimiento subsecuente de pequeñas moléculas llamadas autoinductores, por ejemplo las *N*-acil homoserina lactonas (AHL) para bacterias Gram-negativas y oligopéptidos para bacterias Gram-positivas, el sistema de percepción de quorum es usado para sincronizar la expresión genética y regular numerosos procesos que están involucrados en



comportamiento comunitario y virulencia. (Hentzer, M., y col. 2005; Zhu, S., y col. 2015). Es por esto que se considera que los CDPs influyen en la comunicación célula-célula alterando la expresión de genes como los involucrados en la virulencia bacteriana. En *Pseudomonas putida* WCS358 se encontraron 4 dicetopiperazinas, entre ellas ciclo(L-Pro-L-Leu), este CDP fue capaz de activar la bacteria biosensora de AHL *Agrobacterium tumefaciens* NT1 (pDCI41E33) (Wang y col. 2010; Degrassi, y col. 2002). Holden (1999) mostró que el ciclodipéptido ciclo(L-Pro-L-Val) puede activar la percepción de quorum demostrado por la producción de violaceína en la cepa mutante de *Chromobacterium violaceum* (CV026). Además el ciclodipéptido ciclo(L-Pro-L-Leu) extraído de *Marinobacter* sp. SK-3 redujo la luminiscencia dependiente de la percepción de quorum en la bacteria reportera *E. coli* pSB401 inducida por AHLs (Raeid y col., 2013). El ciclodipéptido ciclo(L-Pro-L-Val) producido por la arquea *Haloterrigena hispanica* fue capaz de inducir la percepción de quorum en biosensores bacterianos, sugiriendo la capacidad de las arqueas para interactuar con bacterias productoras de AHL en comunidades mezcladas (Raeid col., 2013).

Las dicetopiperazinas están entre péptidos antibióticos más numerosos encontrados naturalmente, y son señalados por tener actividad antibacteriana con distintos niveles de potencia (Borthwick, 2012). El ciclodipéptido ciclo(L-Pro-L-Leu), también llamado gancidin W, ha sido reconocido por inhibir el crecimiento de *Enterococcus faecalis* resistentes a vancomicina. Ciclo(L-Pro-L-Leu) también mostró actividad citostática contra líneas celulares de leucemia. La combinación de ciclo(L-Pro-L-Leu) con ciclo(L-Phe-L-Pro) produjo un mejor efecto inhibitorio contra *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Micrococcus luteus*, *Candida albicans* y *Cryptococcus neoformans*. De la fermentación del caldo de cultivo de *Aspergillus fumigatus* se han obtenido los ciclodipéptidos ciclo(L-Pro-L-Val), ciclo(L-Pro-L-Leu) y ciclo(L-Pro-L-Phe) teniendo actividad inhibitoria de crecimiento antibacteriana contra *Staphylococcus aureus* y *Micrococcus luteus* (Carvalho y col., 2012).

La producción de ciclodipéptidos por los aislados bacterianos originarios de la poza Jim's Pond se correlaciona entonces con los datos encontrados en la literatura, y se sugiere que podrían estar involucrados en la actividad antagónica mostrada en los ensayos de interacción y de esta manera competir por los nutrientes en el ambiente oligotrófico en el que habitan. Sin embargo no en todos los extractos de los aislados analizados se detectaron los ciclodipéptidos mencionados, de los 16 aislados seleccionados por su capacidad de inhibición los ciclodipéptidos se produjeron en 12 (Tabla 6) y en 5 aislados se detectaron los policétidos, floroglucinol (PG), acetil-floroglucinol (MAPG) y 2,4-diacetilfloroglucinol (DAPG), el aislado 3D8 (*Pseudomonas* sp.) fue el único en el que se detectaron los ciclodipéptidos y además el policétido DAPG. El floroglucinol (1,3,5-bencenotriol o 1,3,5-



trihidroxibenceno) y sus derivados son componentes fenólicos y son una de las clases principales de metabolitos secundarios, hasta ahora han sido aislados más de 700 derivados de floroglucinol de diferentes fuentes como plantas, organismos marinos y microorganismos. Los productos derivados de floroglucinol poseen amplio espectro antibacteriano, antiviral, antifúngico, antihelmíntico y propiedades fitotóxicas (Yang y col., 2012). En el reino bacteriano las Pseudomonadaceas son las únicas fuentes naturales de floroglucinol y sus derivados. Las *Pseudomonas* fluorescentes juegan un papel importante en el control biológico de patógenos de plantas a través de estos compuestos (Validov, S., y col., 2005). Estudios recientes han mostrado que estas bacterias producen 2,4-diacetilfloroglucinol, un compuesto con actividad antibiótica que no contiene nitrógeno perteneciente a una clase de compuestos llamados policétidos, los policétidos son metabolitos secundarios biosintetizados a través de la condensación de monómeros tales como malonil-CoA y acetil-CoA, en esta clase de compuestos también se encuentran antibióticos como la eritromicina (Yang, F., y col. 2012). La biosíntesis de compuestos de floroglucinol emplea policétido sintetas (PKS) tipo III. Después de llevar a cabo la ciclación y formar floroglucinol, este puede ser acetilado en la posición 2 para formar MAPG y después nuevamente acetilado en la posición 4 para formar DAPG, datos que concuerdan con los datos obtenidos en el análisis de los extractos que producen los policétidos por CG-EM, ya que se encontraron tanto en DAPG como sus dos precursores MAPG y PG pudiendo ser estos, por los antecedentes que se muestran, los compuestos responsables de la actividad antagónica. Para comprobarlo, se hicieron ensayos de difusión en placa con los extractos de los aislados seleccionados y analizados por HPLC y CG-EM sobre aislados de la misma colección, los resultados mostraron que los extractos obtenidos tienen capacidad inhibitoria de crecimiento tal y como en los ensayos de interacción antagónica y conservando la misma tendencia a antagonizar a ciertos aislados y a que algunos de los aislados presentaran resistencia, es decir, se observó el mismo perfil de antagonismo, a las concentraciones utilizadas en los ensayos (1.5, 3, 6, 12.5, 25 y 50 µg/6 µl) se puede observar una tendencia dosis-efecto de los extractos a los cuales se les midió el halo de inhibición producido en el aislado probado por efecto de los compuestos contenidos en los extractos, con esto se concluye que los extractos de los aislados con capacidad antagónica contienen los compuestos responsables del antagonismo, y estos a su vez, muy probablemente podrían ser los ciclodipéptidos ciclo(Pro-Val) y ciclo(Pro-Leu) y el policétido DAPG.

Como se muestra en datos ya reportados anteriormente, los ciclodipéptidos ciclo(Pro-Val) y ciclo(Pro-Leu) tienen capacidad de activar o antagonizar el sistema de percepción de quorum en bacterias, (Wang y col., 2010; Degrassi y col. 2002; Raeid y col. 2013), así como de actuar como antibacterianos (Carvalho y col., 2012; Borthwick, 2012) lo que nos llevó a necesidad de distinguir cual es el mecanismo



utilizado por extractos que contienen los ciclodipéptidos, para lo cual utilizamos un biosensor de AHL comúnmente utilizado que nos permitirá verificar claramente si los extractos tienen actividad antibacteriana o son capaces de inhibir la percepción de quorum y llegar así a determinar a través de que medio se obtiene la inhibición de crecimiento, *Chromobacterium violaceum*, una bacteria Gram-negativa de agua y suelo que produce el pigmento antibacteriano púrpura violaceina. *C. violaceum* regula la producción de violaceina por medio de la vía de la percepción de quorum a través de Cvil/R que son las proteínas encargadas de la síntesis y la respuesta a las AHL (McClellan y col. 1997). McClellan y colaboradores construyeron *C. violaceum* CV026, una mutante por transposición en el gen cvil (responsable de la síntesis de AHL) con nula producción de AHL, la exposición de CV026 a AHLs exógenas, las cuales son capaces de interactuar con CviR, resulta en una producción rápida del pigmento púrpura violaceina. Con ensayos de difusión en placa con los extractos que contienen los CDPs (2E4) así como los extractos con el policétido DAPG (3D8, como control de efecto antibacteriano) a diferentes concentraciones (1.5, 3, 6, 12.5, y 25 µg/6 µl) para descartar un efecto tóxico de los extractos de los aislados bacterianos y utilizando las bacterias *C. violaceum* WT y CV026 como las bacterias a probar se observaron halos traslúcidos de inhibición de crecimiento en ambas bacterias y con todos los extractos analizados en las concentraciones de 12.5 y 25 µg, en CV026 no se observa ningún halo con pigmentación púrpura, lo que descarta un efecto activador de la percepción de quorum al menos en esta bacteria biosensora, en *C. violaceum* WT no se observó un halo de inhibición de la pigmentación violeta con crecimiento bacteriano (colonias blancas) por tanto también es descartado un efecto antagónico de las AHL por parte de los compuestos contenidos en los extractos. Por lo tanto, de manera uniforme, en los ensayos con extractos con ambos tipos de compuestos se observó un efecto antibacteriano.

Este estudio realizó ensayos de interacción antagónica entre una colección de aislados bacterianos de la poza Jim's pond localizada en el valle de Cuatro Ciénegas, se analizaron las interacciones antagónicas de los aislados de manera controlada en el laboratorio. Utilizamos bacterias con un buen crecimiento en las mismas condiciones de cultivo como un requisito para poder valorar las interacciones antagónicas entre los competidores. Varios modelos ecológicos han tratado de explicar la biodiversidad y el comportamiento antagónico de las comunidades microbianas, entre ellos "bottom-up" (Czarán y col. 2002), donde describen que comunidades antagónicas, sensibles y resistentes pueden coexistir en un mismo hábitat si las bacterias resistentes crecen más lento que las sensibles y si las antagonistas más lento que la resistente, además de RSP que dice que las interacciones sólo pueden darse en coexistencia si hay estructura física en el ambiente por ejemplo la presencia de sustrato sólido, en contraposición a un cultivo



líquido mezclado (Hibbing y col., 2010). Existen otros modelos como el llamado multitoxicidad, que consiste de cepas con varios mecanismos antagónicos, mientras que el denominado hiperinmunidad donde la mayoría de las cepas en coexistencia en un mismo hábitat tienen sólo un mecanismo antagónico pero son resistentes a la mayoría de las cepas antagónicas en la comunidad. Los datos arrojados por nuestro estudio son parcialmente consistentes con el modelo de multitoxicidad ya que los perfiles de antagonismo fueron diferentes para todos los aislados sugiriendo la existencia de múltiples mecanismos de antagonismo. Los mecanismos podrían ser viejos, de tal manera que la resistencia a ellos pudo haber tenido tiempo para distribuirse a una gran fracción de la comunidad, de acuerdo a esto, algunas cepas podrían evolucionar nuevos mecanismos de antagonismo, pero su efectividad decrece a medida que el tiempo transcurre ya que se desarrolla la resistencia, que posiblemente se transmite a través de transferencia horizontal de genes o por presión selectiva en la comunidad, ya que esta presión selectiva promueve el esparcimiento de la resistencia a la mayoría de las cepas. Debido al costo de producir compuestos de antagonismo en un ambiente extremadamente oligotrófico como al que pertenece nuestro sitio de estudio, la mayoría de las cepas pierden la capacidad antagónica pero mantienen los genes de resistencia creando un estado de hiperinmunidad que también podría parcialmente explicar nuestros resultados. Esta dinámica impone una constante presión selectiva a los miembros de la comunidad para evolucionar nuevos mecanismos antagónicos y resistir a ellos. Aunque ya se han hecho estudios de las redes de interacciones con aislados bacterianos de estas pozas, a nuestro conocimiento éste es el primer estudio que busca dilucidar los compuestos responsables de la actividad antagónica entre los aislados bacterianos originarios de este “oasis en el desierto” de vida microbiana.



## VIII. CONCLUSIÓN

La producción de los ciclodipéptidos ciclo(Pro-Leu) y ciclo(Pro-Val) y el policétido 2,4-Diacetilfloroglucinol contenidos en los extractos bacterianos están involucrados en el control poblacional bacteriano en aislados de pozas de Cuatro Ciénegas, Coahuila, mediante un mecanismo antibacteriano.



## IX. REFERENCIAS.

- Aguirre-von-Wobeser, E., Soberón-Chávez, G., Eguiarte, E. L., Ponce-Soto, Y. G., Vázquez-Rosas-Landa, M., Souza, V. (2014). Two-role model of an interaction network of free-living  $\gamma$ -proteobacteria from an oligotrophic environment. *Environ. Microbiol.* 16:1366-1377.
- Alcaraz, L.D., Olmedo, G., Bonilla, G., Cerritos, R., Hernández, G., Cruz, A., Ramírez, E., Putonti, C., Jiménez, B., Martínez, E., López, V., Arvizu, J.L., Ayala, F., Razo, F., Caballero, J., Siefert, J., Eguiarte, L., Vielle, J.P., Martínez, O., Souza, V., Herrera-Estrella, A., and Herrera-Estrella, L. (2008). The genome of *Bacillus coahuilensis* reveals adaptations essential for survival in the relic of an ancient marine environment. *Proc Natl Acad Sci USA* 105:5803–5808.
- Belin, P., Moutiez, M., Lautru, S., Seguin, J., Pernodet, J., and Gondry, M. (2012). The nonribosomal synthesis of diketopiperazines in tRNA-dependent cyclodipeptide synthase pathways. *Nat. Prod. Rep.* 29: 961– 979.
- Binbin, G., Shan, H., Xiaojun, Y., Lixin, Z. (2013). Tentative biosynthetic pathways of some microbial diketopiperazines. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 97: 8439- 8453.
- Borthwick, D. Alan. (2012). 2,5-Diketopiperazines: Synthesis, Reactions, Medicinal chemistry, and Bioactive Natural Products. *Chem. Rev.* 112: 3641-3716.
- Burkholder P.R., Pfister, R.M., and Leitz, F.H. (1966). Production of a pyrrole antibiotic by a marine bacterium. *Appl. Microbiol.* 14: 649-653.
- Carvalho, M. P. de, Abraham, W.-R. (2012). Antimicrobial and biofilm inhibiting diketopiperazines. *Current Medicinal Chemistry.* 19: 3564 – 3577.
- Cerritos, R., Olmedo, G., Escalante A. E., Souza, V. (2008). *Bacillus coahuilensis* sp. nov. a new moderately halophilic species from different



pozas in the Cuatro Ciénegas Valley in Coahuila, México. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 58:919-923.

- Chandan, P. (1995). Bioactive cyclic dipeptides. *Peptides*. 16: 151-164
- Cole, G.A. (1984). Crustacea from the bolson of Cuatro Cienegas, Coahuila, Mexico. *J Arizona-Nevada Aca Sci* 19: 3–12.
- Contreras-Balderas, S. (2004). Ecosystems and water species in Cuatro Cienegas. Under the Desert: The Mysterious Waters of Cuatro Cienegas (Badino G, Bernabei T, Vito AD, Giulivo I & Savino G, eds), pp. 98–105. *La Venta-Esplorazioni*
- Czárán, T. L., and Hoekstra, R. F., (2003). Killer – sensitive coexistence in metapopulations of micro-organisms. *Proc. Biol. Sci.* 270: 1373 – 1378.
- Degrassi, G., Aguilar, C., Bosco, M., Zahariev, S., Pongor, S., Venturi, V. (2002). Plant growth-promoting *Pseudomonas putida* WCS358 produces and secretes four cyclic dipeptides: cross-talk with quorum sensing bacterial sensors. *Current Microbiology*. 45: 250-254.
- Dinger, E. (2001). Aquatic Invertebrates of Cuatro Cienegas, Coahuila, Mexico and Effects of Fish on Stromatolite Invertebrate Assemblages. *MS Thesis, Northern Arizona University, USA.*
- Elser, J.J., Schampel, J.H., García-Pichel, F., Wade, B.D., Souza, V., Eguiarte, L., Escalante, A. & Farmer, J.D. (2005). Effects of phosphorous enrichment and grazing snails on modern stromatolitic microbial communities. *Freshw Biol* 50: 1808–1825.
- Escalante, A. E., Caballero, M. J., Martínez, A. L., Rodríguez, A. V., González, G. A., Toribio, J. J., Souza, V. (2009). *Pseudomonas cuatrocienasensis* sp. nov., isolated from an evaporating lagoon in the Cuatro Ciénegas valley in Coahuila, México. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 59, 1416-1420.





- Escalante, A.E., Eguiarte, L.E., Espinosa-Asuar, L., Forney, L.J., Noguez, A.M., Souza, V. (2008). Diversity of aquatic prokaryotic communities in the Cuatro Cienegas basin. *FEMS Microbiol. Ecol.* 65, 50–60.
- García-Pichel, F., Wade, B.D. & Farmer, J.D. (2002). Jet-suspended, calcite-ballasted cyanobacterial waterwarts in a desert spring. *J Phycol* 38: 420–428. Geografiche, Instituto Coahuilense de Ecología, *Edizioni Tintoretto* (TV).
- Hentzer, M., Givskov, M. (2005). Pharmacological inhibition of quorum sensing for the treatment of chronic bacterial infections. *J. Clin. Invest.* 112: 1300-1307.
- Hershler, R. (1985). Systematic revision of the Hydrobidae (Gastropoda: Rissoaceae) of the Cuatro Cienegas basin, Coahuila, Mexico. *Malacologia* 2: 31–123.
- Hibbing, M. E., Fuqua, C., Parsek, M. R., Peterson, S. B. (2010). Bacterial competition: survival and thriving in the microbial jungle. *Nat. Rev. Microbiol.* 8: 15 – 25.
- Hultberg, M., Bergstrand, K.-J., Khalil, S., Alsanius, B. (2008). Characterization of biosurfactant-producing strains of fluorescent *Pseudomonads* in a soilless cultivation system. *Ant. Van Leeu.* 94, 329–334.
- Toribio, J., Escalante, A. E., Caballero-Mellado, J., González-González, A., Zavala, S., Souza, V. y Soberón-Chávez, G. (2011). Characterization of a novel biosurfactant producing *Pseudomonas koreensis* lineage that is endemic to Cuatro Ciénegas Basin, *Syst. Appl. Microbiol.*, doi:10.1016/j.syapm.2011.01.007
- Kamiya T., Maeno S., Hashimoto M., Mine Y. (1972). Bicyclomycin, a new antibiotic. II. Structural elucidation and acyl derivatives. *J. Antibiot.* 25: 576-581
- Kanoh, K., Kohno, S., Katada, J., Hayashi, Y., Muramatsu, M., Uno, I. (1999). Antitumor activity of phenylahistin in vitro and in vivo. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 63:1130-1133.



- McClean, K. H., Winson, M. K., Fish, L. (1997). Quorum sensing and *Chromobacterium violaceum*: exploitation of violacein production and inhibition for the detection of *N*-acylhomoserine lactones. *Microbiology* 143: 3703-3711.
- Michel-Briand, Y. & Baysse, C. (2002). The pyocins of *Pseudomonas aeruginosa*. *Biochimie*. 84: 499-510.
- Minckley, W.L. (1969). Environments of the Bolson of Cuatro Cienegas, Coahuila, Mexico, with special reference to the aquatic biota. *Univ Texas El Paso, Sci Series 2*: 1–65.
- Minckley, W.L. (1994). A bibliography for natural history of the Cuatro Cienegas basin and environs, Coahuila, Mexico. *Proc Des Fishes Counc* 25: 47–64.
- Morgan, A. W., Wenliang, W., Christelle, M. R., Federico, C., Beasley, D., E. Heinrichs, P., Dunman, M., Nathan A. M. (2010). *Staphylococcus aureus* nonribosomal peptide secondary metabolites regulate virulence. *Science*. 329: 294.
- Moutiez, M., Schmitt, E., Seguin, J., Thai, R., Favry, E., Belin, P., Mechulam, Y. and Gondry, Muriel. (2014). Unravelling the mechanism of non-ribosomal peptide synthesis by cyclodipeptide synthases. *Nature comm.* 5: 5141.
- Muriel, G., Ludovic, S., Pascal, B. (2009). Cyclodipeptide synthases are a family of tRNA-dependent peptide bond-forming enzymes. *Nature*. Vol. 5, No. 6. p. 414-420.
- Ortiz-Castro, R., Díaz-Pérez, C., Martínez-Trujillo, M., del Río, Campos-García, J. and López-Bucio, J. (2011). Transkingdom signaling based on bacterial cyclodipeptides with auxin activity in plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 108 (17): 7253-7259.



- Pérez-Gutiérrez, R.A., López-Ramírez, V., Islas, A., Alcaraz, L.D., Hernández-González, I., Olivera, B.C. (2013). Antagonism influences assembly of a *Bacillus* guild in a local community and is depicted as a food-chain network. *ISME J.* 7: 487-497.
- Perzborn M., Syldatk C. and Rudat J. (2013). Enzymatical and microbial degradation of cyclic dipeptides (diketopiperazines). *AMB Express* 3: 51
- Raeid, M. M. A., Dobretsov, S., Al-Fori, M., Gunasekera, S. P., Sudesh, K., Paul, V. J. (2013). Quorum-sensing inhibitory compounds from extremophilic microorganisms isolated from a hypersaline cyanobacterial mat. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 40: 759-772.
- Rodríguez-Verdugo, A., Souza V., Eguiarte, L.E., and Escalante A. E. (2012). Diversity across seasons of culturable *Pseudomonas* from a desiccation lagoon in Cuatro Ciénegas, México. *Int. J. Microbiol.*
- Schmidt, K.P. & Owens, D.W. (1944). Amphibians and reptiles of northern Coahuila Mexico. *Field Col Mus Nat, Zool Ser* 29: 97–115.
- Souza, V., Espinosa-Asuar, L., Escalante, A.E., Eguiarte, L.E., Farmer, J., Forney, L., Lloret, L., Rodríguez-Martínez, J.M., Soberón, X., Dirzo, R., Elser, J.J. (2006). An endangered oasis of aquatic microbial biodiversity in the Chihuahuan desert. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 103, 6565–6570.
- Ström, K., Sjögren, J., Broberg, A. and J. Schnürer. (2002). *Lactobacillus plantarum* MiLAB 393 produces the antifungal cyclic dipeptides cyclo (L-Phe-L-Pro) and cyclo(L-Phe-trans-4-OH-L-Pro) and 3-phenyllactic acid. *Appl. Environ. Microbiol.* 68:4322-4327.
- Taylor, D.W. & Minckley, W.L. (1966). New world for biologists. *Pac Discov* 19: 18–22.
- Validov, S., Mavrodi, O., De La Fuente, L., Boronin, A., Weller, D., Thomashow, L., Mavrodi, D. (2005). Antagonistic activity among 2,4-



diacetylphloroglucinol-producing fluorescent *Pseudomonas* spp. *FEMS Microbiology Letters* 242: 249-256.

- Vázquez-Rivera, D., González O., Guzmán-Rodríguez J., Díaz-Pérez A. L., Ochoa-Zarzosa, A., López-Bucio, J., Meza-Carmen, V., and Campos-García J. (2014). Cytotoxicity of cyclodipeptides from *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 leads to apoptosis in human cancer cell lines. *BioMed. Research. International* Article ID 197608
- Wang, J. H., Quan, C. S., Qi, X. H., Xin, L., Fan, S. D. (2010). Determination of diketopiperazines of *Burkholderia cepacia* CF-66 by gas chromatography-mass spectrometry. *Anal. Bioanal. Chem.* 396: 1773-1779.
- Williams, D.E., Bombuwala, K., Lobkovsky, E., De Silva, D. E., Karunaratne, V., Allen, T. M., Clardy, J., Andersen, R. J. (1998). Ambewelamides A and B, antineoplastic epidithiopiperazinediones isolated from the lichen *Usnea* sp. *Tetrahedron Lett.* 39:9579-9582.
- Winsborough, B. M., Seeler, J.-S., Gulobic, S., Folk, R. L. and Manguire, B., Jr. (1994). In *Phanerozoic Stromatolites II*, eds. Bertrand Sarfati, J. & Monty, C. (Kluwer, Amsterdam), pp. 71-100.
- Xiancui, L., Dobretsov, S., Xu, Y., Xiao, X., Hung, O. S. and Qian, P. Y. (2006). Antifouling diketopiperazines produced by a deep-sea bacterium, *Streptomyces fungicidicus*. *Biofouling*, 22: 3, 187 —194,
- Yang, F. & Cao Y., (2012). Biosynthesis of phloroglucinol compounds in microorganisms – review. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 93: 487-495.
- Zhu, S., Wu, H., Zeng, M., Liu, Z., Ying, W. (2015). The involvement of bacterial quorum sensing in the spoilage of refrigerated *Litopenaeus vannamei*. *Int. J. Food Micro.* 192: 26 – 32.



