



Phylogenomic and secondary metabolism exploration of actinobacteria isolated from sediments of Laguna Ojo de Liebre, Mexico

Exploración filogenómica y de metabolismo secundario de actinobacterias aisladas de sedimentos de la Laguna Ojo de Liebre, México

César O. Carreón-Gaxiola¹, Mónica Torres-Beltrán¹, Juan A. Ugalde², Natalie Millán-Aguiñaga^{1*}

¹Universidad Autónoma de Baja California, Facultad de Ciencias Marinas, Ensenada, Baja California, Mexico.

²Centro de Bioinformática y Biología Integrativa, Facultad de Ciencias de la Vida, Universidad Andrés Bello, Santiago de Chile, Chile.

*Corresponding author

E-mail address: nmillan@uabc.edu.mx (N. Millán-Aguiñaga)

Article history:

Received: 2 October 2024 / Received in revised form: 29 November 2024 / Accepted: 13 December 2024 / Published online: 6 January 2025.

<https://doi.org/10.29267/mxjb.2025.10.1.1>

ABSTRACT

The Ojo de Liebre Lagoon Complex Biosphere Reserve, is an essential habitat for migratory species such as the gray whale and various birds. This unique hypersaline environment is underexplored concerning its microbial diversity, particularly regarding actinobacteria, which are among the most prolific sources of bioactive compounds found in marine ecosystems. 12 genomes of actinobacteria isolated from marine sediments of Laguna Ojo de Liebre (LOL) in B.C.S., Mexico. were analyzed. The genomes were classified into 3 genera; *Actinomadura*, *Nocardiopsis* and *Micromonospora*. Genomic mining revealed the presence of 314 Biosynthetic Gene Groups (BGCs) associated with secondary metabolism. The main BGCs categories found were terpenes, type I polyketides (T1PKS), non-ribosomal peptide synthetases (NRPS) and ribosomally synthesized post-translationally modified peptides (RiPPs). In addition, the patterns of Gene Cluster Families (GCFs) were observed, obtaining common categories among the genomes. Only 4 GCFs were assigned with production to known compounds (<1%). No GCFs were assigned to pathways responsible to produce known compounds, implying that the detected clusters could be responsible to produce several novel compounds. Also, the phylogenomic analysis suggests the presence of five

potential new actinobacteria species belonging to the genera *Micromonospora* and *Nocardiopsis*. Overall, the genomes of actinobacteria isolated from LOL sediments showed unknown secondary metabolites, highlighting their biotechnological potential in the production of uncharacterized compounds.

Keywords: phylogenomics, genome mining, secondary metabolites, biosynthetic gene clusters, gene cluster family.

RESUMEN

La Reserva de la Biósfera Complejo Lagunar Ojo de Liebre, es un hábitat esencial para especies migratorias como la ballena gris y diversas aves. Este único entorno hipersalino está subexplorado en cuanto a su diversidad microbiana, especialmente en lo que respecta a las actinobacterias, que son una de las fuentes más prolíficas de compuestos bioactivos encontrados en los ecosistemas marinos. En esta investigación se analizaron 12 genomas de actinobacterias aisladas de sedimento marino de la Laguna Ojo de Liebre (LOL) en B.C.S., México. Los genomas se clasificaron en 3 géneros; *Actinomadura*, *Nocardiopsis* y *Micromonospora*. La minería genómica reveló la presencia de 314 Grupos de Genes Biosintéticos (BGCs, por sus siglas en inglés) asociados al metabolismo secundario. Las principales categorías de BGCs encontradas fueron terpenos, policétidos tipo I (T1PKS), péptido sintetasas no ribosomal (NRPS) y péptidos modificados postraduccionalmente y sintetizados ribosomalmente (RiPPS). Además, se observaron los patrones de Familias de Grupos de Genes (GCFs por sus siglas en inglés), obteniendo categorías comunes entre los genomas y solamente 4 GCFs se asignaron a la producción de compuestos conocidos (<1%). Ningún GCF se asignó a rutas responsables de la producción de compuestos conocidos, lo que implica que las agrupaciones detectadas podrían ser responsables de la producción de nuevos compuestos. La información filogenómica generada sugiere la presencia de cinco cepas candidatas a nuevas especies de actinobacteria del género *Micromonospora* y *Nocardiopsis*. Los genomas de las actinobacterias aisladas de los sedimentos de LOL mostraron metabolitos secundarios desconocidos, lo que resalta su potencial biotecnológico en la producción de compuestos no caracterizados.

Palabras clave: filogenómica, minería genómica, metabolitos secundarios, grupo de genes biosintéticos, familia de grupos de genes.

1. INTRODUCCIÓN

El filo Actinomycetota es uno de los grupos más abundantes y diversos de bacterias Gram positivas en nuestro planeta (He *et al.*, 2023; Barka *et al.*, 2016). Está conformado generalmente por especies aerobias, y algunos géneros presentan la capacidad de formar esporas (Barka *et al.*, 2016; Li *et al.*, 2016; Silva *et al.* 2022). Actinomycetota caracteriza por presentar genomas de <0.5 hasta 15.0 Mbp con alto contenido de G+C (Seshadri *et al.*, 2022). El género *Streptomyces* ha sido muy estudiado y por ello, Hui y colaboradores (2021) han clasificado a las actinobacterias en dos subgrupos, aquellas que pertenecen al género *Streptomyces* y aquellas que no pertenecen a este género, y que se denominan "actinobacterias raras" (Hui *et al.*, 2021). Estas últimas, a pesar de ser poco estudiadas y su baja frecuencia de aislamiento con respecto a *Streptomyces*, han cobrado importancia en el estudio de la producción de compuestos bioactivos como: antibióticos (ej. actinomicina, kanamicina, estreptomycin, cloranfenicol), antitumorales (doxorubicina y

daunorubicina), antifúngicos (kitamicina), bioherbicidas (spinosad), antiparasitarios (avermectina) y agentes inmunosupresivos (rapamicina) (Barka *et al.*, 2016; Weber *et al.*, 2015). En particular, aquellas bacterias aisladas de ambientes extremos, las cuales se han asociado con la producción de una variedad de actividades biológicas (Hu *et al.*, 2020). La secuenciación de ácidos nucleicos puede fortalecer la investigación de las capacidades metabólicas de las actinobacterias de ambientes extremos, no sólo con el propósito de caracterizarlas para su identificación taxonómica, sino para conocer a los genes responsables de la producción de metabolitos secundarios (MS) (Garavito *et al.*, 2017; van Bergeijk *et al.*, 2020).

A casi 3 décadas de completar la secuenciación del primer genoma bacteriano, se han secuenciado y publicado en NCBI más de 330 millones de borradores y genomas completos de bacterias y arqueas (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/refseq/statistics/>). En el grupo de las actinobacterias hay 58 mil genomas que se encuentran disponibles en bases de datos públicas, de los cuales destacan los géneros *Streptomyces*, *Mycobacterium*, *Micromonospora* y *Actinoplanes*. Sin embargo, el filo Actinomycetota se encuentra representado por menos del 10% del total de genomas publicados en bases de datos (ej. NCBI y GOLD) a la fecha (Kalkreuter *et al.*, 2020; Mukherjee *et al.*, 2023; Seshadri *et al.*, 2022; Zhang *et al.*, 2020), lo que representa una valiosa oportunidad para enfocar esfuerzos en la secuenciación y análisis de genomas de actinobacterias que contribuyan al conocimiento del metabolismo secundario.

Una de las principales ventajas que tiene la secuenciación completa de genomas es contar con todos los genes para poder realizar análisis filogenómicos más confiables para la clasificación taxonómica. Esto contrasta con el uso de solo un par de genes ribosomales o de copia única, como por ejemplo, 16s/23s ARNr, *gyrB*, *dnaA*; que se han utilizado para la identificación y clasificación a nivel de género (Nouiou *et al.*, 2018). La tasa de evolución individual no ha permitido en ocasiones diferenciar filogenéticamente entre especies cercanas (Lalucat *et al.*, 2020). El análisis Multilocus de Secuencia (MLSA) involucra el uso simultáneo de múltiples genes constitutivos y ha sido una alternativa más confiable para la caracterización taxonómica a nivel de especie (Adamek *et al.*, 2018; Alanjary *et al.*, 2019; Lalucat *et al.*, 2020). Es por ello que el empleo del genoma completo en la construcción de filogenias permite una visión más completa y precisa de la evolución de los organismos (Chun *et al.*, 2018; Kim *et al.*, 2022). En este contexto es posible realizar análisis taxonómicos robustos para determinar las similitudes en genomas completos como: la identidad de nucleótidos promedio (ANI) y la hibridación digital ADN-ADN (dDDH) (Muller and Epstein, 2012; Raina *et al.*, 2019). Se ha hecho una transición natural hacia el uso de este tipo de herramientas bioinformáticas, debido a que son capaces de hacer predicciones más rápidas y precisas en comparación con técnicas como la hibridación que es un método laborioso y que requiere de equipos especializados y de mayor costo (ej. >95% de ANI corresponde al 70% de DDH) (Goris *et al.*, 2007; Muller and Epstein, 2012). Es por ello que diversos grupos de investigación han utilizado análisis filogenómicos para la delimitación de nuevas especies bacterianas (Chun *et al.*, 2018; Millán-Aguíñaga *et al.*, 2017; Parks *et al.*, 2021).

Otra ventaja de disponer del genoma completo de un microorganismo es la capacidad de explorar la diversidad de genes funcionales. Por ejemplo, la minería genómica permite la identificación de grupos de genes biosintéticos (Biosynthetic Gene Clusters, BGCs), lo que resulta fundamental para predecir la presencia de metabolitos secundarios (MS) con potencial biotecnológico (van Bergeijk *et al.*, 2020). Los BGCs se encuentran organizados

en grupos de genes que se encuentran agrupados en los genomas de los microorganismos, los cuales codifican la maquinaria enzimática necesaria para la síntesis de MS. Comúnmente los BGCs se clasifican en función de la clase de compuestos que producen como: policétidos sintetasas (PKS), sintetasas peptídicas no ribosómicas (NRPS), péptidos sintetizados ribosomalmente y modificados postraduccionalmente (RiPPs), terpenos, sacáridos, etc. (Arulprakasam and Dharumadurai, 2021; Naughton *et al.*, 2017; Medema *et al.*, 2014; Wang *et al.*, 2023).

Dos de las herramientas bioinformáticas más empleadas en la minería genómica de microorganismos son antiSMASH y BiG-SCAPE, las cuales se han empleado en la identificación de una gran cantidad de nuevos compuestos con actividad antibacteriana, antitumoral, antiinflamatoria, fungicida y antiviral (Manikkam *et al.*, 2019; Zhang *et al.*, 2020). Así mismo, existe la necesidad de caracterizar los BGCs con el fin de evaluar la diversidad y los mecanismos que llevan a su diversificación (Dat *et al.*, 2022; Siro *et al.*, 2022). Una opción es agrupar rutas biosintéticas que produzcan compuestos similares en familias de grupos de genes (Gene Cluster Family, GCF) mediante redes de similitud que permitan conducir a la priorización de nuevos BGCs (Adamek *et al.*, 2018; Navarro-Muñoz *et al.*, 2020). De esta manera se busca evitar el redescubrimiento de MS en especies de actinobacterias ya conocidas.

La producción de MS en actinobacterias se ha visto relacionada a varios factores, pero principalmente con el ambiente que colonizan. Los ambientes pueden tener diferentes condiciones, incluyendo aquellas que se consideran extremas o poco favorables para la sobrevivencia (altas o bajas temperaturas, salinidad, alcalinidad, etc.) como ocurre en lagunas hipersalinas, desiertos, regiones polares y las profundidades del océano (Hui *et al.*, 2021; Millán-Aguíñaga *et al.*, 2019; Shivilata and Satyanarayana, 2015; Soldatou *et al.*, 2021). El interés por el descubrimiento de metabolitos secundarios novedosos ha llevado a un enfoque creciente en el aislamiento e identificación de actinobacterias raras de ambientes extremos (Hui *et al.*, 2021; Jagannathan *et al.*, 2021; Millán-Aguíñaga *et al.*, 2019; Shivilata y Satyanarayana, 2015; Soldatou *et al.*, 2021), las cuales han desarrollado adaptaciones únicas que han resultado en su capacidad de producir nuevos metabolitos secundarios (Qin *et al.*, 2019), como la diketopiperazina con actividad antibacteriana aislada de *Nocardiosis* sp. SCA30 y las angliciclinas kumemicinones A-G de *Actinomadura* sp. KD439, ambas provenientes de sedimentos marinos en India (Siddharth *et al.*, 2021; Zhang *et al.*, 2019; Zhang *et al.*, 2021).

En México existen estudios que relacionan el aislamiento de actinobacterias raras de ambientes extremos e inexplorados con el perfil del metabolismo secundario y su potencial biotecnológico (Cardoso-Martínez *et al.*, 2015; Torres-Beltrán *et al.*, 2012; Zamora-Quintero *et al.*, 2022). Trabajos como el de Fernández-López *et al.* en 2022 realizados en las profundidades del Golfo de México, lograron identificar más de 2000 secuencias de genes candidatos PKS I en metagenomas que incluyen diferentes filos (entre ellos Actinobacteria); sugiriendo que los sedimentos marinos de esta región son una fuente rica y diversa de este tipo de genes que podrían ser explorados en la búsqueda de nuevas rutas que codifican a nuevos MS. Zamora-Quintero *et al.* (2022) a partir de muestras de sedimento de la laguna hipersalina Ojo de Liebre en México identificó distintos géneros de actinobacterias, incluyendo *Actinomadura*, *Nocardiosis*, *Micromonospora*, *Plantactisnospora* y *Streptomyces*. En particular, los géneros *Micromonospora* y *Actinomadura* presentaron actividad anticancerígena que revela el potencial de posibles nuevas rutas biosintéticas.

Por lo que el presente trabajo, se enfoca en el análisis filogenómico y de minería genómica de 12 genomas aislados de dicho estudio que presentaron actividad anticancerígena.

2. METODOLOGÍA

2.1. Selección de cepas de actinobacterias, extracción de ADN y secuenciación

Del estudio de Zamora et al., 2022, se seleccionaron 12 cepas de actinobacterias con actividad anticancerígena para su secuenciación genómica. La extracción se realizó utilizando el método de fenol-cloroformo utilizado en Ziemert *et al.*, 2014. El ADN extraído se envió al Centro Genómico de la Universidad de California, San Diego (IGM-UCSD) para su secuenciación utilizando la plataforma Illumina HiSeq 4000 (2x100 pb).

2.2. Análisis bioinformático de los genomas de actinobacterias

La calidad de las secuencias de los 12 genomas fue analizada mediante el programa FastQC (<http://www.bioinformatics.bbsrc.ac.uk/projects/fastqc>). Las lecturas de mala calidad y los adaptadores fueron removidos utilizando el programa BBDuk, utilizando las modificaciones de calidad de Phred igual a 20, un número de kmers igual a 23 y un mínimo de 11 kmers, con un máximo de 1 desajuste (Bushnell, 2014). El ensamble *de novo* fue realizado utilizando Shovill (Seemann, 2017) y su calidad fue verificada con el programa CheckM (Parks *et al.*, 2015). La anotación funcional se hizo con el programa Prokka (mincontiglen= 200) (Seemann, 2019).

2.3. Análisis filogenómico

Para la asignación taxonómica de los genomas se realizaron diferentes aproximaciones: se realizó una clasificación utilizando la Genome Taxonomy Database (GTDB), a través del GTDB toolkit (GTDB-tk) v1.7.0 (Chaumeil *et al.*, 2019). Se empleó la base de datos EZBiocloud (Yoon *et al.*, 2017) para identificar las cepas tipo que han sido descritas y que cuentan con mayor porcentaje de similitud basado en el gen ribosomal 16S rARN. En esta selección se incluyeron 229 cepas tipo y de los genomas se extrajo el gen 16S ARNr utilizando el programa Barnnap (Seemann, 2014). Posteriormente se generó un alineamiento con las secuencias extraídas utilizando el programa MAFFT (Katoh *et al.*, 2013) y el árbol filogenético se generó utilizando el método máxima verosimilitud con el programa IQtree v1.6.12 (Minh *et al.*, 2020), utilizando 1000 réplicas y el parámetro ModelFinder (Kalyaanamoorthy *et al.*, 2017) para conocer el mejor modelo de sustitución nucleotídica (GTR+F+R8). Otra aproximación fue realizar un análisis multilocus de secuencia (MLSA) basado en la concatenación de 100 genes conservados utilizando el programa AutoMLST (Alanjary *et al.*, 2019). Para hacer la selección de los genomas de referencia para el MLSA, se consideraron dos criterios: 1) la similitud con base en el árbol filogenético del gen 16S ARNr y de GTDB-tk y 2) disponibilidad del genoma completo en las bases de datos. Se incluyeron un total de 52 genomas (39 genomas de cepa tipo con mayor similitud, 12 genomas de estudio y grupo externo). Se utilizó el programa IQtree v1.6.12 (Minh *et al.*, 2020) para generar el árbol filogenético utilizando el método de máxima verosimilitud con 1000 réplicas y el mejor modelo de sustitución fue utilizado con base en ModelFinder (TVM+F+R10).

La última aproximación fue utilizar el índice promedio de nucleótidos (ANI) e Hibridación digital DNA-DNA (dDDH). El ANI se calculó utilizando el programa en línea de comandos FastANI (Jain *et al.*, 2018), mientras que la hibridación digital DNA-DNA fue calculada con

la herramienta GGDC (<http://ggdc.dsmz.de>) utilizando el método BLAST+ (Meier-Kolthoff *et al.*, 2013).

2.4. Minería genómica

Para predecir los BGCs en los 12 genomas se realizó un análisis de minería genómica utilizando el programa Antibiotics and Secondary Metabolite Analysis Shell (antiSMASH) versión 6.0 (Blin *et al.*, 2021). Se incluyeron los parámetros extendidos de MIBiG cluster comparison, Cluster Pfam analysis y ClusterBlast, que permiten identificar BGCs similares y comparar los BGCs con las bases de datos de Pfam (Mistry *et al.*, 2021), MIBiG (Terlouw *et al.*, 2023) y antiSMASH (Blin *et al.*, 2021).

Para evitar una sobre estimación en el número de BGCs, se realizó una revisión manual de los resultados de antiSMASH. Cuando no fue posible la asignación de clases de BGCs se realizaron los siguientes pasos: 1) se revisó que los BGCs no se encontraran fragmentados, 2) se buscó que los genes centrales se encontraran presentes en los BGCs para cada clase, 3) para los BGCs que no fueron asignados a una clase específica, se utilizó un criterio de similitud >50% para clasificarlos y 4) aquellos BGCs que no cumplieron con los criterios anteriores fueron asignados en la categoría de "Otros". Además, se consideraron BGCs únicos a aquellos que pertenecen a una clase específica pero no presentaron relación con la predicción de moléculas reportadas en la base de datos de antiSMASH. Con los resultados obtenidos se construyó una matriz de presencia de BGCs por genoma y se visualizó utilizando el programa Circos (Krzywinski, *et al.*, 2009).

2.5. Comparación de rutas biosintéticas

El agrupamiento en familias de BGCs entre los genomas se llevó a cabo utilizando el programa BiG-SCAPE, con el modo de alineación del subcluster común más largo (glocal) (Navarro-Muñoz *et al.*, 2020). Las GCFs se ordenaron en una matriz de ausencia/presencia para visualizar los patrones de distribución, utilizando la paquetería ggplot2 (Wickham, 2016) en Rstudio (Racine, 2012).

2.6. Números de acceso

Las secuencias de los genomas se encuentran depositadas en NCBI con la siguiente información de proyecto BioProjectID PRJNA1161731, con los números de acceso de SAMN43789094 a SAMN43789105.

3. RESULTADOS

En el presente estudio se analizaron 12 genomas de actinobacterias aisladas de sedimento marino de la Laguna Ojo de Liebre (LOL) en B.C.S., México. Los tamaños de los genomas oscilaron entre 6.1 a 9.2 Mbp, los contigs entre 134 a 445 y con porcentaje de completitud mayor al 98.95%. El porcentaje de GC estuvo en un rango de 64 a 72%, con un rango de genes de codificación (CDS) entre 5680 a 8638 (Tabla 1).

Tabla 1. Características generales de los 12 genomas de actinobacterias aisladas de sedimento marino.

Table 1. General characteristics of the 12 actinobacterial genomes isolated from marine sediments.

ID-genomas	Género	Contigs	%GC	Genes	CDS	Tamaño de genoma (Mb)	Compleitud (%)
LOL-011	<i>Actinomadura</i>	445	64	8638	8505	9.2	100
LOL-016	<i>Actinomadura</i>	229	70	8621	8488	9.2	100
LOL-012	<i>Nocardiopsis</i>	159	70	4699	4610	5.1	100
LOL-024	<i>Micromonospora</i>	244	69	5712	5620	6.1	100
LOL-025	<i>Micromonospora</i>	169	72	6370	6222	7.2	100
LOL-013	<i>Micromonospora</i>	136	70	5680	5551	6.2	99.47
LOL-014	<i>Micromonospora</i>	134	69	5735	5599	6.2	99.47
LOL-015	<i>Micromonospora</i>	248	69	5856	5717	6.3	99.47
LOL-021	<i>Micromonospora</i>	201	68	6220	6128	6.8	98.95
LOL-023	<i>Micromonospora</i>	233	69	6305	6155	6.8	99.47
LOL-027	<i>Micromonospora</i>	164	69	5730	5571	6.2	99.47
LOL-028	<i>Micromonospora</i>	177	69	5715	5555	6.2	99.47

3.1. Identificación filogenética de los genomas

Los resultados de la identificación filogenética con el análisis del gen 16S rRNA, mostraron que los 12 genomas se agrupan con 3 géneros: *Actinomadura* (2 genomas), *Nocardiopsis* (1 genoma) y *Micromonospora* (9 genomas), con un alto porcentaje de similitud (>99%) respecto a las cepas tipo más cercanas. Particularmente, los genomas afiliados al género *Micromonospora* mostraron similitudes del 99.93% en el gen 16S ARNr con *Micromonospora spongicola* S3-1, 99.72% con *Micromonospora phaseoli* CGMCC y 99.79% *Micromonospora citrea* DSM. En el caso de los genomas afiliados al género *Actinomadura* tuvieron un porcentaje de similitud del 99.93% con *Actinomadura cremea* JCM, y para el género *Nocardiopsis* se mostró un porcentaje de similitud del 99.73% con *Nocardiopsis fildesensis* GW9-2. El árbol filogenético del gen 16S ARNr agrupó los 9 genomas de *Micromonospora* en 3 distintos clados; donde los genomas de LOL-013, LOL-014, LOL-015, LOL-021, LOL-023, LOL-027 y LOL-028 forman un clado entre ellas y se agrupan con los genomas más cercanos de *M. spongicola*, *M. caldifontis* y *M. zhanjiangensis*. Por otro lado, LOL-024 se encuentra en un clado con *M. phaseoli* y agrupada con *M. qiuiiae*; mientras que el genoma de LOL-25 se encuentra en un clado con *M. chaiyaphumensis* y *M. citrea*. Los genomas de *Actinomadura* LOL-011 y LOL-016 se encuentran formando un clado entre ellas agrupadas con la cepa *A. cremea*, mientras que el genoma de *Nocardiopsis* LOL-012 se encuentra formando un clado con *N. fildesensis* y *N. algeriensis* (Fig. S1). Cabe mencionar que los resultados obtenidos por GTDB-tk también

clasifican a 9 de los genomas como cercanos al género *Micromonospora*, 1 genoma al género *Nocardiosis* y 2 genomas al género *Spirillospora*, es por ello que se agregó este género en los árboles filogenéticos para futuras comparaciones con el género *Actinomadura*.

Utilizando la aproximación de análisis multilocus en los genomas, se obtuvo un árbol filogenético con topología similar al gen 16S ARNr pero con mayor valor de soporte en los clados de los genomas de estudio (soporte de 100%) (Fig. 1, Fig. S1). Se observa la división en 3 subclados (a, b y c) en el género *Micromonospora*. El subclado "a" está conformado por 7 genomas (LOL-013, 014, 015, 021, 023, 027 y 028) con el genoma de referencia más cercano *M. pattaloongensis*. Los clados "b" y "c" se encontraron constituidos por un genoma cada uno, siendo los genomas de referencia más cercanos *M. phaseoli* (LOL-024; subclado b) y *M. echinosfusca* (LOL-025; subclado c), respectivamente (Fig. 1). Por otro lado, los genomas del grupo de las *Actinomadura* formaron un clado agrupado con el genoma de referencia *A. cremea* con un valor de soporte de 100%, mientras que el genoma perteneciente al género *Nocardiosis* se encontró formando un clado con el genoma de referencia *Nocardiosis* sp. CNT-312 agrupadas con el genoma de referencia *Nocardiosis lucentensis* (Fig. 1) con un valor de soporte de 100%.

En cuanto a la aproximación filogenómica de la métrica ANI se observó que para el género *Micromonospora* los valores oscilaron entre 80% a 93%, por debajo del valor de corte de delimitación de especies (95%). En particular el clado "a" de los genomas de *Micromonospora* se observa una separación de tres especies basado en valor de corte por debajo del 95% de ANI comparado con los genomas de cepa tipo más cercanas; esto también se observa para el clado "b" y "c", con valores de ANI por debajo del 95% comparado con los genomas más cercanos (Fig. 2). En comparación, los valores ANI para los géneros *Nocardiosis* y *Actinomadura* se encontraron igual o por encima del valor de corte entre un 95% a 97%, respectivamente (Tabla S1). La aproximación de dDDH digital mostró valores por debajo del valor de corte (70%), que corresponde a la delimitación de especies en los genomas de *Micromonospora* y *Nocardiosis* con valores de 27.64% y 61.30%, respectivamente. En el caso del género *Actinomadura* mayores al 70% con respecto al genoma más cercano (Tabla S1).

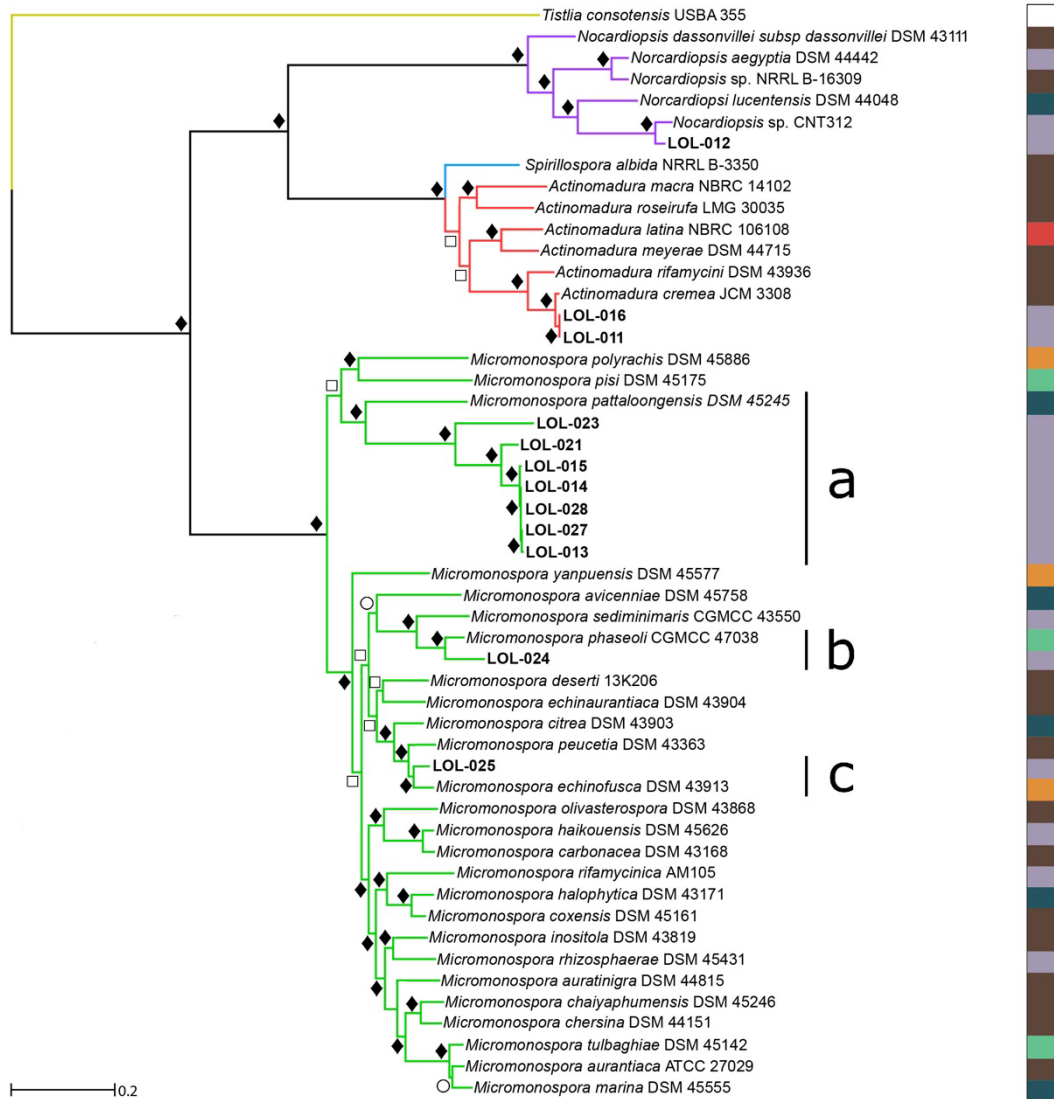


Fig. 1. Árbol filogenético de máxima verosimilitud basado en 100 genes constitutivos utilizando la herramienta autoMLST. Los clados se encuentran coloreado por su respectivo código de color: Grupo externo (amarillo), *Nocardioopsis* (morado), *Actinomadura* (rojo), *Spirillospora albida* (azul) y *Micromonospora* (verde). Se muestra definido el conjunto de subclados de *Micromonospora* (a, b y c). Los rombos negros (◆) indican los valores de soporte al 100%, los cuadrados (◻) indican valores de soporte de 80-99% y los círculos (○) indican valores de soporte de 70-79%. Los colores de la barra derecha indican los hábitats de origen de los genomas; café (suelo), gris (sedimento), rojo (clínico), naranja (animal), verde (planta) y azul (acuático).

Fig. 1. Maximum likelihood phylogenetic tree constructed with the autoMLST tool. Clades are colored by their respective color: outgroup/yellow, *Nocardioopsis*/purple, *Actinomadura*/red, *Spirillospora albida*/blue, and *Micromonospora*/green. Black diamonds (◆) indicate 100% bootstrap support values, squares (◻) indicate bootstrap support values of 80-99% and circles (○) indicate bootstrap support values of 70-79%. The colors on the right bar indicate the habitats of origin of the genomes; brown/soil, gray/sediment, red/clinical sample, orange/animal, green/plant and blue/aquatic.

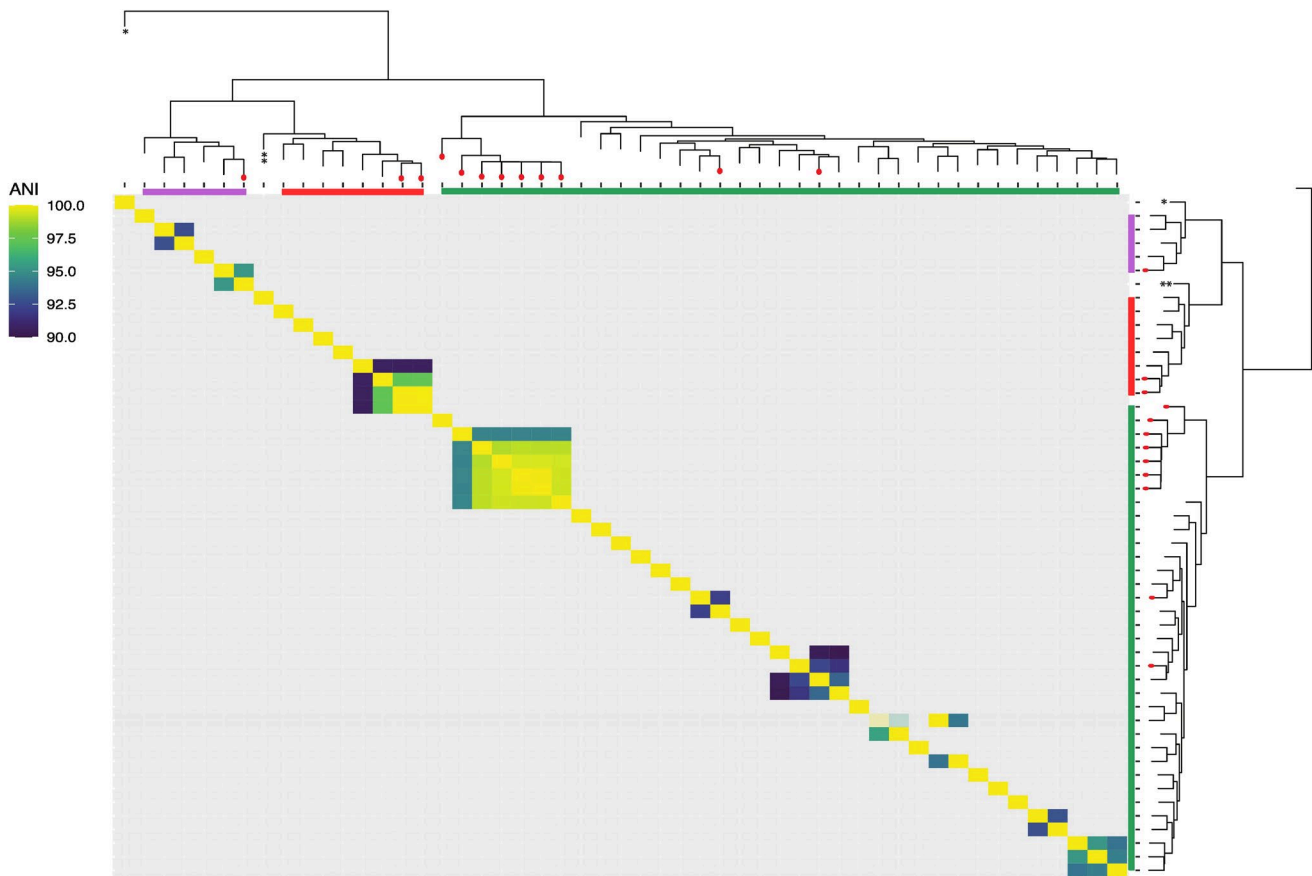


Fig. 2. Mapa de calor de las comparaciones de los valores por arriba del 90% de ANI de los genomas En ambos ejes se utiliza el árbol MLSA para visualizar las comparaciones. En el árbol se muestra el clado de *Nocardioopsis* de color morado, *Actinomadura* en rojo y *Micromonospora* en verde. En círculos rojos se muestran los genomas de estudio.

Fig. 2. Heatmap of ANI values above 90% between the MLSA phylogeny genomes comparison. In the phylogenetic tree the *Nocardioopsis* Clade is shown in purple, *Actinomadura* in red and *Micromonospora* in green. In red circles the genomes from this study are marked.

3.2. Minería genómica de rutas de genes biosintéticos

Los análisis de antiSMASH mostraron la presencia de un total de 314 BGCs en los 12 genomas de estudio. Para los genomas del género *Micromonospora* se identificaron un máximo de 30 BGCs (LOL-025), para los genomas del género *Actinomadura* se identificaron 29 BGCs (LOL-011 y LOL-016) y para el género *Nocardioopsis* 22 BGCs. Además, de acuerdo con la longitud de la región de los BGCs identificados se estimó que hasta un 8.9% de los genomas evaluados se encuentra asociado al metabolismo secundario. Se observó que los géneros que presentaron mayor número de clases de BGCs fueron *Actinomadura* y *Micromonospora*, con 13 y 12 clases respectivamente.

Las principales clases de BGCs compartidas entre genomas corresponden a: terpenos, policétidos tipo I (T1PKS), péptidos sintetizados no ribosomalmente (NRPS) y péptidos modificados postraduccionalmente y sintetizados ribosomalmente (RiPPs); así como los terpenos, T1PKS, NRPS, RiPPs-like y terpenos fueron los de mayor abundancia entre los genomas con un promedio de tres BGCs para cada clase (Fig. 3). En particular, el genoma

de *Micromonospora* LOL-025 contó con la mayor cantidad de BGCs (12) relacionados con la categoría de NRPS (Fig. 3). Además, la categoría T1PKS se observó en 11 de los genomas analizados, solo LOL-024 no contó con ningún BGC de esta categoría. Por otro lado, las categorías con menor abundancia de BGCs fueron: Rantipéptidos, Furano, Tioamitido, Tiopéptido, Aminoglucósido (amglyccycl) y Lasso péptido (Fig. 4). Particularmente, la categoría de Amglyccycl y Thiopeptide-LAP solo se encontraron presentes en genomas del género *Micromonospora* y en el caso de los genomas del género *Actinomadura* se observaron únicamente Thioamitides y Cofactor-Redox. Cabe mencionar que la categoría de Lasso péptido fue compartida entre los géneros de *Actinomadura* y *Nocardiopsis*; mientras que las categorías de Rantipeptido y Furano contaron con un solo BGC en *Micromonospora* (LOL-021) y *Nocardiopsis*, respectivamente.

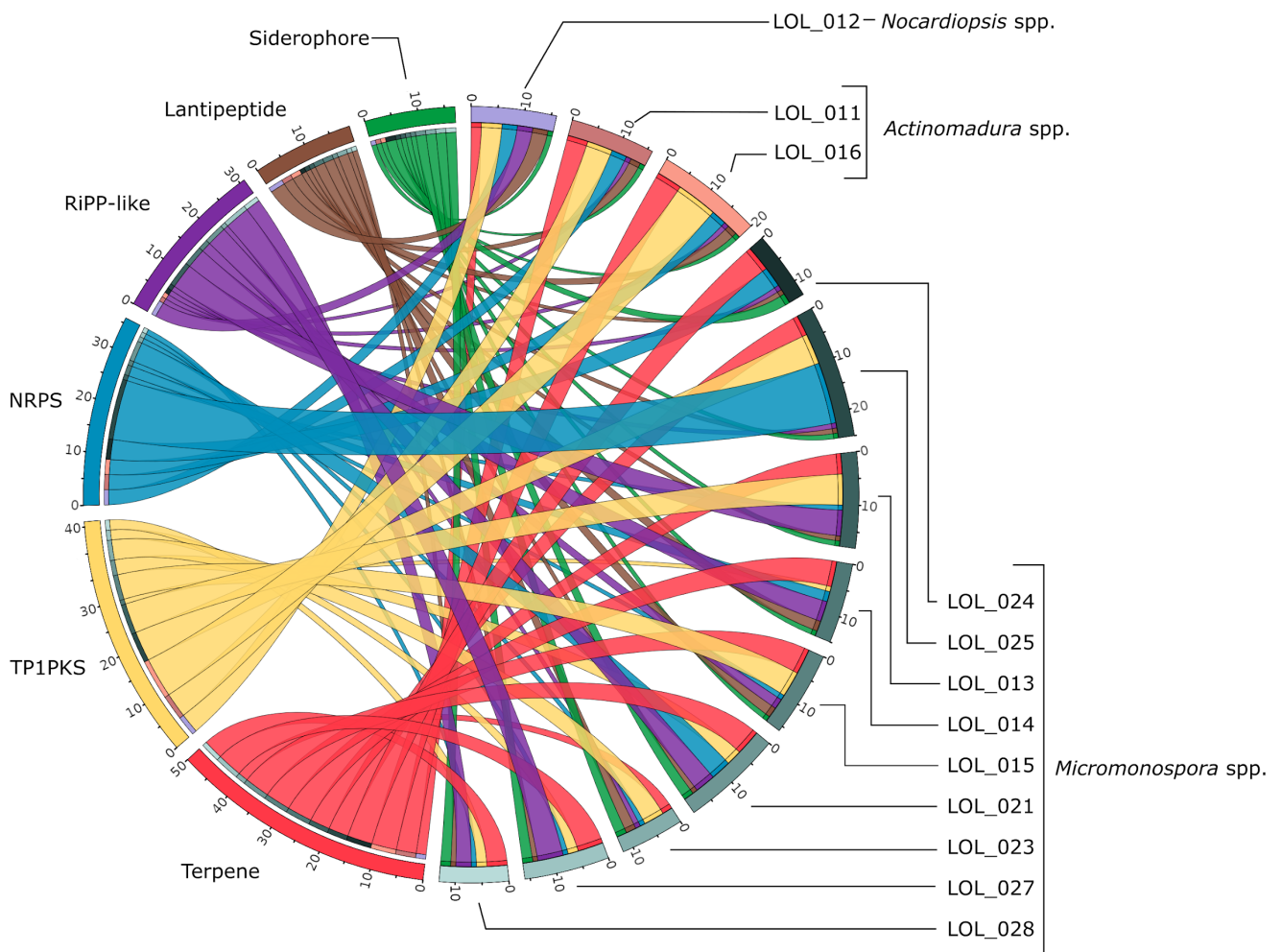


Fig. 3. Diversidad de BGC en los 12 genomas de estudio, ordenado por mayor abundancia de ruta metabólica. El color de los listones representa el tipo de ruta metabólica y la anchura representa el número de BGC de cada ruta metabólica.

Fig. 3. BGC diversity of the 12 genomes ordered by the highest metabolic pathway abundance in the 12 actinomycete strains. The color of the bands represents the type of metabolic pathway and the width represents the number of BGCs in each metabolic pathway in each genome.

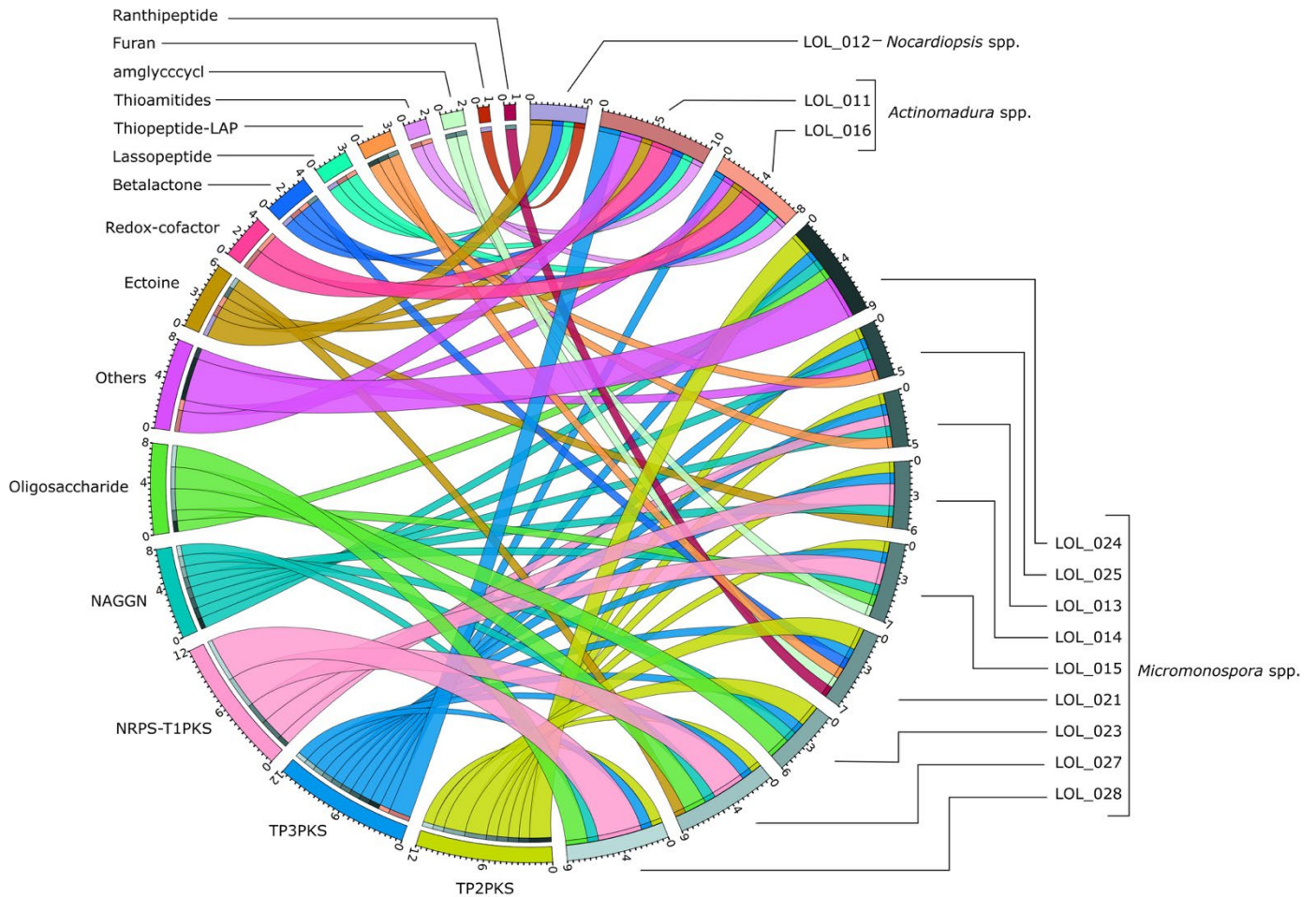


Fig. 4. Diversidad de BGC en los 12 genomas de estudio, ordenado por menor abundancia. El color de los listones representa el tipo de ruta metabólica y la anchura representa el número de BGC de cada ruta metabólica.

Fig. 4. BGC diversity of the 12 genomes ordered by the lowest abundance. The color of the bands represents the type of metabolic pathway and the width represents the number of BGCs in each metabolic pathway.

Respecto a los resultados de redes de similitud utilizando BiG-SCAPE mostraron la agrupación de los BGCs en GCFs en donde se identificaron un total de 1074 entre todos los genomas analizados del árbol MLSA (235 GCF entre los 12 genomas). Se dividieron en 8 diferentes categorías: híbridos de PKS-NRP (65), NRPS (260), PKS (139), Terpenos (113), RiPPs (151), PKS-I (150), Sacáridos (27) y otros (169). La categoría NRPS fue la que mostró la mayoría (80%) de GCFs identificados entre los géneros. En cuanto a los GCFs formados entre géneros, no se observó la formación de ninguna familia. Sin embargo, entre genomas del mismo género sí se observaron agrupaciones. En particular, el género *Micromonospora* mostró la mayor agrupación de familias entre los BGCs analizados, correspondiente a un 6.7% del total de GCFs observadas. Por su parte, para el genoma LOL-028, perteneciente al subclado “a” de *Micromonospora*, se observó que todos sus BGCs formaron GCFs exclusivamente con los genomas de este subclado, lo que resalta la similitud y especificidad genética existente dentro de este subclado.

En general, se identificaron 3 GCF con coincidencias en la base de datos de MIBiG dentro las categorías de Otros y Otros-PKS. Específicamente, el GCF de la categoría de Otros se encontró integrado por los genomas LOL-024, LOL-025, *M. chersina* y *M. sediminaris* con relación al BGC de Desferrioxamine E de *Streptomyces* sp. (ID38640) (Sosio *et al.*, 2018). En la clase de Otros-PKS se encontró un GCF conformado únicamente por LOL-023 relacionado al BGC de Saquayamaycin Z aislado de *Micromonospora* sp. Tu 6368 (Erb *et al.*, 2009). Los genomas de LOL-023 y LOL-025 se encontraron relacionados con un GCF 431 (Awakawa *et al.*, 2011) y agrupado con otras 11 especies de *Micromonospora* (*M. auratinigra*, *M. inositol*, *M. olivasterospora*, *M. rhizosphaerae*, *M. halophytica*, *M. coxensis*, *M. marina*, *M. echinaurantiaca*, *M. yangpuensis*, *M. polyrhachis*, *M. pisi*).

Para los genomas de *Actinomadura* LOL-011 y LOL-016, todos sus BGCs formaron únicamente GCFs entre ellos; particularmente en la categoría de Híbridos de NRPS-PKS se encontró una coincidencia en las bases de datos con el compuesto Maduropeptin formando un GCF con la cepa de referencia *Actinomadura madurae*. Por su parte, en el genoma *Nocardiopsis* LOL-012, ningún GCF tuvo relación de similitud con lo conocido en las bases de datos, ni tampoco tuvo GCF compartidos con otros géneros. A pesar de esto, formó familias principalmente con el genoma de referencia *Nocardiopsis* sp. CNT-312, con el que compartió 13 familias, en las categorías de NRPS (4), RiPPs (3), PKS (2), Terpeno (1) y Otras (3). Además, solamente compartió un GCF en la categoría de “Otros” con los genomas de referencia *N. dassonvillei*, *N. aegyptia*, *N. sp.* NRRL B-16309, *N. lucentensis* y *N. sp.* CNT-312.

En cuanto a la comparación de los patrones de distribución de los GCFs entre genomas de cada uno de los géneros (Fig. 5), se utilizó la distribución de filogenia del árbol de MLSA. Particularmente, se observó que los genomas del subclado “a” tuvieron la formación de un GCF en la categoría de Terpenos, exceptuando a LOL-023. Particularmente, en este subclado el genoma LOL-023 al igual que *M. pattaloongensis* no contaron con GCF en la categoría Otros-PKS. De manera similar, LOL-014 y LOL-013 no presentaron ningún GCF relacionado con la clase de Sacáridos. Con respecto al subclado “b” se observaron los contrastes en los patrones de distribución. Específicamente, se observó que LOL-024 carece de GCF en la categoría de PKS. Cabe señalar que LOL-024 presenta GCFs exclusivos en comparación con *M. phaseoli*, específicamente en las clases de Sacáridos (1) y RiPPs (7). También, en el subclado “c” se observaron discrepancias, por ejemplo únicamente en la clase RiPPs, LOL-025 exhibió la presencia de 3 GCFs que no se encontraban en su homólogo más cercano, *M. echinofusca*.

Con relación al clado de *Actinomadura*, los patrones de distribución de GCF fueron iguales entre LOL-011 y LOL-016, compartiendo todos sus GCFs (32). Mientras que respecto a su homólogo más cercano (*A. cremae*), solo comparte 15 GCF. Los patrones de distribución en los genomas de *Nocardiopsis* no formaron un GCF relacionado con la clase Sacáridos, excepto *N. dassonvillei*. Mientras que los genomas de *Nocardiopsis* sp. NRRL B.16309, *Nocardiopsis* sp. CNT-312 y LOL-012 no contaron con GCFs de las clases Híbridos PKS/NRPS. Asimismo, el genoma LOL-012 contó con un GCF en la clase Otros PKS que su homólogo más cercano *Nocardiopsis* sp. CNT-312.

Adicionalmente, se comparó entre GCFs de los géneros con respecto a otros genomas presentes en el estudio. Se observó la presencia de tres grupos, cada uno representativo de un género específico. Puntualmente, en el género *Nocardioopsis*, se determinó que con la especie filogenéticamente más cercana comparte un 13% de GCF, marcando la máxima correlación en este grupo. En el caso del género *Actinomadura*, se destacó una asociación completa entre los genomas LOL-011 y LOL-016, alcanzando un 100% de coincidencia en sus GCFs. Adicionalmente, ambos genomas compartieron GCFs con el genoma *A. cremea* en un 32%.

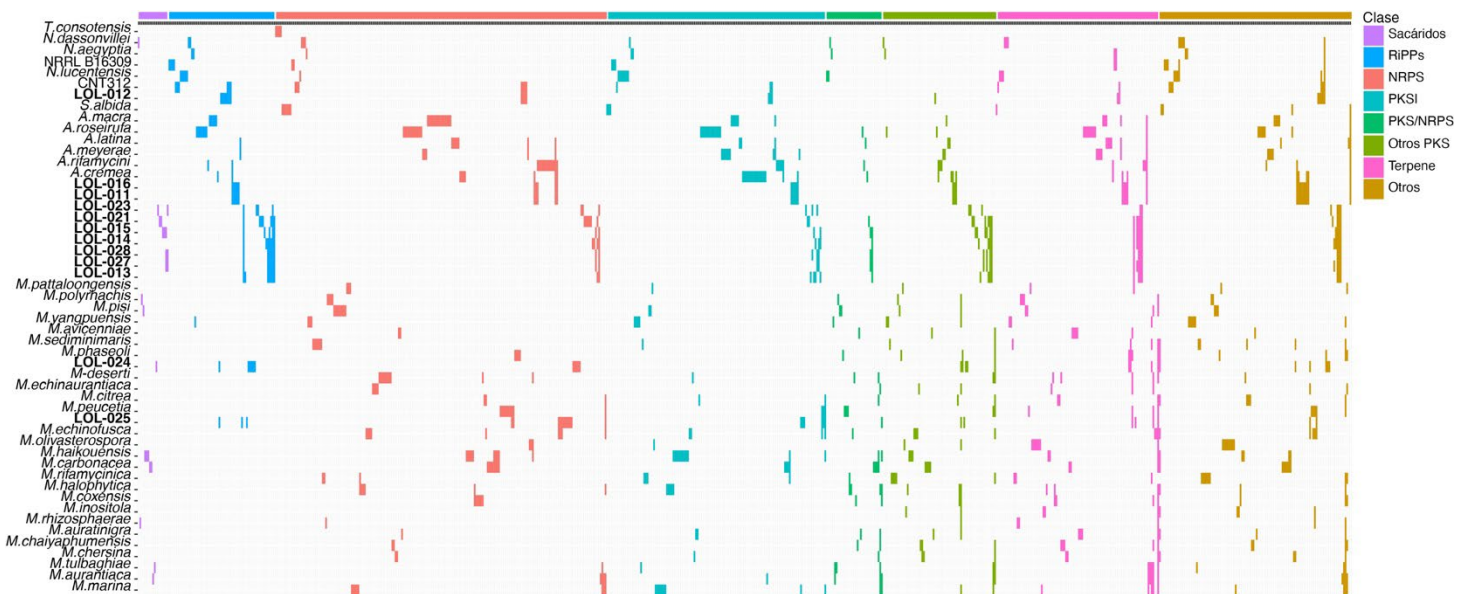


Fig. 5. Presencia/ausencia de GCFs en los géneros *Micromonospora*, *Actinomadura*, *Nocardioopsis*. Las columnas en la matriz corresponden a la clase dadas por BiGSCAPE y las filas a los genomas organizados con base en filogenia de MSLA. La ausencia de cada clase se muestra en blanco y la presencia de cada clase se encuentra coloreada de acuerdo con el código de color que se muestra en la imagen

Fig. 5. Presence/absence of GCFs in the genera *Micromonospora*, *Actinomadura*, *Nocardioopsis*. The columns in the matrix correspond to the class given by BiGSCAPE and the rows to the genomes organized based on MSLA phylogeny. The absence of each class is shown in white, and the presence of each class is colored according to the color key shown.

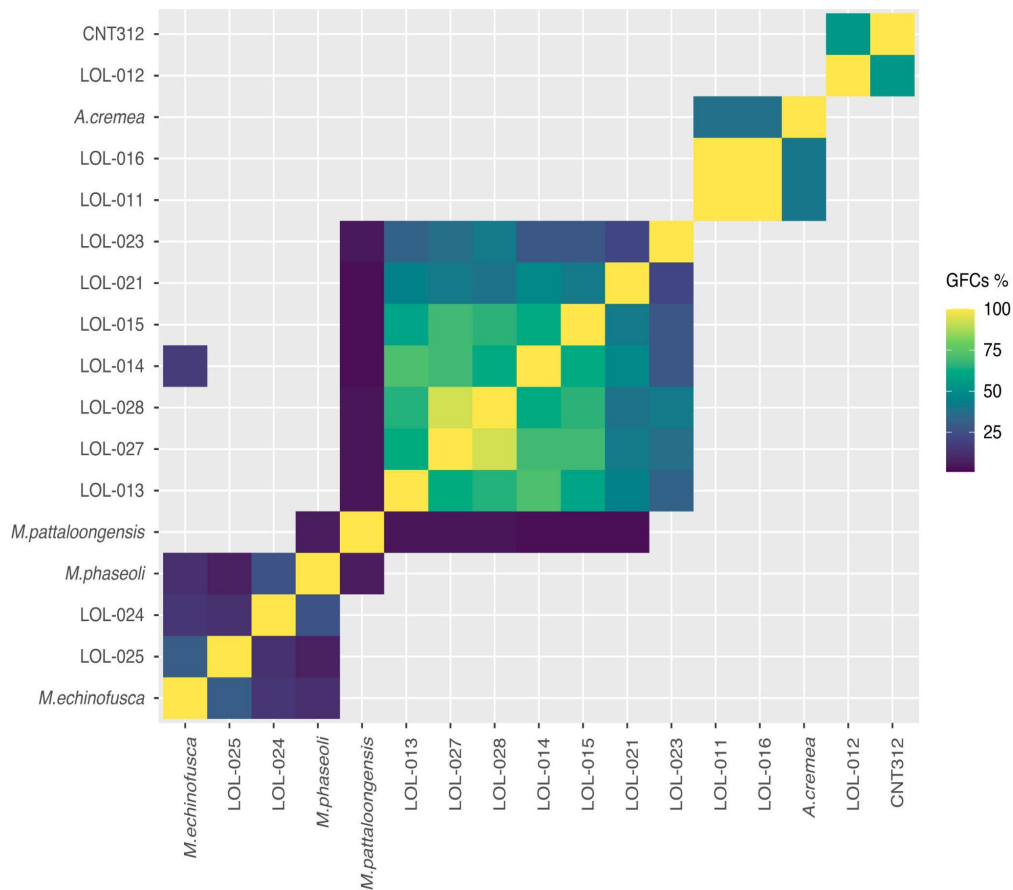


Fig. 6. Mapa de calor de comparaciones de GFCs entre géneros de actinobacterias. Los genomas están ordenados en ambos ejes de acuerdo con el orden del árbol MLSA. La escala de 1-100 representa el porcentaje de GFCs compartidos. En donde las comparaciones son igual a 0 se muestran en gris.

Fig. 6. Heat map image of GCF comparisons between actinobacterial genera. Genomes are sorted on both axes according to MLSA order. The scale of 1-100 represents the percentage of shared GFCs. Where comparisons are equal to 0 they are shown in gray.

Con respecto al género *Micromonospora*, se observó que el porcentaje de GFCs compartidos fue superior al 50% entre los genomas más cercanos (LOL-015, LOL-014, LOL-028, LOL-027 y LOL-013). Sin embargo, al incorporar al análisis a LOL-021, un genoma más distante con respecto al grupo anteriormente mencionado, el porcentaje se redujo a un 36% de GCF compartidos y al agregar a LOL-023 el porcentaje también se redujo a un 21% de GCF compartidos. Además, la comparación del subclado “a” con respecto al genoma de referencia filogenéticamente más cercano de *M. pattaloongensis*, solamente se compartieron un 3% de GCF. Por otro lado, el subclado “b” y “c” compartieron entre ellas un 13%, y con sus genomas de referencia más cercanos *M. phaseoli* y *M. echinofusca* un 26% y un 30%, respectivamente. Lo anterior sugiere que existe una cierta diversidad genética en la que entre mayor sea la distancia filogenética que existe entre genomas, comparten menos GCF. Por lo que, esto enriquece nuestra comprensión de las relaciones genómicas dentro de los géneros estudiados, ofreciendo una visión detallada de las similitudes y posibles diferencias funcionales entre los genomas.

4. DISCUSIÓN

La secuenciación y análisis de genomas se ha convertido en una herramienta de gran uso para la clasificación taxonómica y filogenética de bacterias, para poder comprender las relaciones evolutivas y su diversidad genética. García-López *et al.* (2019) y Lalucat *et al.* (2020) resaltan la importancia de estas clasificaciones para aclarar las relaciones taxonómicas y reorganizar las especies dentro de los géneros utilizando genomas. Específicamente, estas clasificaciones resultan cruciales para asignaciones taxonómicas precisas, siendo particularmente relevantes en el caso del descubrimiento de nuevas especies bacterianas (von Meijenfeldt *et al.*, 2019). En este estudio el análisis inicial de identificación del gen 16S ARNr y los análisis filogenómicos demostraron ser herramientas útiles durante la clasificación taxonómica y filogenética de los genomas de este estudio, utilizando las cepas tipo más cercanas filogenéticamente en el gen 16S ARNr. Por ejemplo, esto permitió la diferenciación de los genomas LOL-011 y LOL-016 entre los géneros *Spirillospora* y *Actinomadura*, que anteriormente se ha reportado la estrecha relación que existe entre ellos. Por lo que estudios genómicos son necesarios para aclarar este tipo de relaciones (Nouioui *et al.*, 2018; Zhang *et al.*, 2001) y resultan esenciales para una comunicación efectiva de los resultados científicos, y también contribuyen de manera significativa a la robustez y claridad del marco taxonómico en la investigación bacteriana (Parks *et al.*, 2019).

Estudios del gen 16S ARNr han puesto en evidencia las limitaciones de este método en la designación a nivel de especies debido a su alto grado de conservación; a pesar de este grado de similitud, diferenciaciones nucleotídicas del gen 16S rARN han revelado, que una sola base en regiones variables puede revelar nuevas especies (Cho *et al.*, 2020; Mateo-Estrada *et al.*, 2019; Millán-Aguíñaga *et al.*, 2017). Por lo que es necesario utilizar análisis complementarios como multilocus, ANI, y dDDH para determinar a mayor precisión la identificación de actinobacterias, así como otras bacterias (Baig *et al.*, 2021; Mohamad Naim *et al.*, 2022). Por ejemplo, anteriormente se consideraba 98.7% de similitud en el gen 16S ARN, como valor de corte para delimitar especies (Stackebrandt and Eberts, 2006). Actualmente, esta regla se ha modificado y no es aplicable a todos los géneros (ej. *Salinispora*, *Micromonospora* y *Bacillus*), ya que basta con cambios de un solo nucleótido en su secuencia para asignar nuevas especies (Román-Ponce *et al.*, 2020; Pinto-Almeida *et al.*, 2021; Said Hassane *et al.*, 2020). En los 12 genomas de este estudio se tuvieron valores >99% de similitud en el gen 16S ARNr, por lo que análisis complementarios como el MLSA aunadas a métricas como ANI y dDDH, resultaron esenciales para realizar una correcta delimitación de las especies (Alanjary *et al.*, 2019; Lalucat *et al.*, 2020). Los genomas de estudio sugieren con base en los análisis de MLSA, ANI y dDDH (ANI <80% y dDDH ~21%) que los 9 genomas de *Micromonospora*, pueden representar 5 cepas candidatas a nuevas especies. Por lo que sugerimos es necesario realizar análisis fenotípicos detallados incluyendo evaluaciones quimiotaxonómicas y fisiológicas, además de una reconstrucción filogenética del núcleo de los genomas y para poder concluir si en efecto se pudieran proponer nuevas especies.

En el caso de los genomas de *Actinomadura* y *Nocardiopsis*, éstos se encontraron por encima de los valores de corte de ANI y dDDH en la delimitación de las especies con respecto a sus genomas de referencia más cercanos de *Actinomadura cremea* (Preobrazhenskaia *et al.*, 1975) y *Nocardiopsis luncentensis* (Yassin *et al.*, 1993). Se logró confirmar mediante los resultados filogenómicos que ambos genomas del género *Actinomadura* se agrupan con la especie *Actinomadura cremea*, lo que se asignó

previamente por Zamora *et al.* (2022) utilizando solo el gen 16S ARNr. En lo que respecta al genoma afiliado al género *Nocardiopsis*, los resultados de ANI (>95%) mostraron que la cepa *Nocardiopsis* sp. CNT-312 (Schorn *et al.*, 2016) fue la especie más cercana filogenéticamente al nivel jerárquico de especie; sin embargo, el análisis de dDDH con un valor de 61.30, sugiere delimitarla como nueva especie. Este tipo de resultados, donde los valores de corte de dDDH y ANI están por debajo o se encuentra muy cercano del valor límite, ha sido reportado en recientes estudios en genomas de actinobacterias como *Micromonospora* y *Rhodococcus* (Abdel-Mageed *et al.*, 2021; Riesco *et al.*, 2018; Thomson *et al.*, 2020). Es importante hacer mención que las diferencias reportadas en los índices también se pueden deber al método utilizado para su cálculo. Por lo que se debe de tomar en consideración este tipo de diferencias a la hora de reportar una posible diferenciación genética entre genomas a nivel de especie. Además, dada la amplia diversidad genética y evolutiva de las bacterias, se recomienda considerar la historia evolutiva de los taxones (Palmer *et al.*, 2020; Riesco *et al.*, 2018; Thomson *et al.*, 2020). Debido a lo antes mencionado y a los resultados filogenéticos de este estudio, sería adecuado realizar más estudios entre el genoma de *Nocardiopsis* sp. (LOL-012) y *Nocardiopsis* sp. (CNT-312).

Con minería genómica fue posible obtener los perfiles genómicos asociados a metabolismo secundario que nos permite predecir el tipo de compuesto que las cepas de estudio podrían tener la capacidad de producir y que además pudieran tener propiedades bioactivas (Gregory *et al.*, 2019). Para el género *Micromonospora* se han reportado una gran diversidad BGCs. Por ejemplo, recientemente Yang *et al.* (2021) para cepas de *Micromonospora* aisladas de una esponja marina (*Craniella* sp.) reportaron un total de 22 BGCs en la cepa *M. craniellae* LHW63014^T, en comparación al máximo de 30 BGCs observados en este estudio para el mismo género. Se ha observado que las bacterias simbiotas tienen un tamaño de genoma reducido debido a que han modificado principalmente sus rutas metabólicas para complementar algunas particularidades de la ecología y fisiología del huésped, lo que podría explicar la diferencia entre los genomas de este estudio (Moran and Wernegreen, 2000; Rio *et al.*, 2003). Por otra parte, el número de BGCs en los géneros *Actinomadura* y *Nocardiopsis* observados es mayor al reportado en aislados de ambientes distintos al marino donde el número tiende a ser menor *i.e.* ambientes terrestres (Tarantini *et al.*, 2021; Xu *et al.*, 2018). Esto en gran medida se puede deber a diferentes factores como el tamaño del genoma, transferencia horizontal, contenido de BGC y especificidad de BGCs (Seshadri *et al.*, 2022). Las actinobacterias marinas tienden a tener una mayor diversidad y número de BGCs en comparación con las terrestres (Li *et al.*, 2023; Silva *et al.*, 2017), esto podría deberse a la competencia por recursos en ambientes marinos que impulsa la evolución de una mayor variedad de productos naturales para la defensa y la comunicación intermicrobiana (Liu and Kakeya, 2020; Tuttle *et al.*, 2019; van der Lee and Medema, 2016). Esto es relevante para comprender la biología y ecología detrás de la producción de metabolitos secundarios aún en especies del mismo género, y por lo tanto los factores que promueven su producción y su potencial para desarrollar nuevos fármacos (van Bergeijk *et al.*, 2020).

Una de las categorías de metabolismo secundario observadas con mayor abundancia fue la de los terpenos, la cual se encontró presente en todos los genomas de este estudio. La mayoría de los terpenos observados se encuentran relacionados a los genomas de *Micromonospora*; coincidiendo con lo reportado por Carro *et al.* (2018) donde reportan que la mayoría de los BGCs presentes son terpenos (82 BGCs) en 40 genomas de *Micromonospora* aisladas de diferentes ambientes. Sin embargo, en este estudio no observamos similitud con alguna familia o compuesto específico. Se conoce que los

terpenos tienen diversas funciones, entre ellas la formación de pigmentos en bacterias (Xie and Elsheikh, 2021). La pigmentación observada en las colonias de bacterias en nuestro estudio proporciona información relevante sobre las características fenotípicas de las cepas (Caruso *et al.* 2022; Gomes *et al.* 2022). La variación en la intensidad y el color de las pigmentaciones puede indicar la producción de metabolitos específicos o la adaptación a ciertos ambientes. Por ejemplo, las colonias con una pigmentación intensa rojo-amarillo podrían sugerir la presencia de carotenoides, compuestos conocidos por sus propiedades antioxidantes (Aruldass *et al.*, 2018; Dawoud *et al.*, 2020; El-Tarabily *et al.*, 2021). Además, la pigmentación oscura en algunas colonias podría indicar la producción de compuestos como melanina, que a menudo están relacionados con la protección contra el estrés ambiental (Pavan *et al.*, 2019). Estos hallazgos concuerdan con observaciones previas en otros estudios que han identificado la relación entre la pigmentación y la adaptación de las bacterias a su entorno (Dieser *et al.*, 2010; Fong *et al.*, 2001; Singh *et al.*, 2017). Uno de los carotenoides más estudiados es la astaxantina, un pigmento rojo reportado en bacterias marinas (Liu *et al.*, 2020) y que se ha reportado que cuenta con una fuerte actividad antioxidante (neutralizando las especies reactivas de oxígeno (ROS)), antiinflamatoria y antiapoptótica (Asker *et al.*, 2018; Brotosudarmo *et al.*, 2020; Hassan *et al.*, 2021). En el contexto de la producción de carotenoides en actinobacterias marinas, Sandmann (2021) destaca la notable diversidad de carotenoides sintetizados por este grupo, incluyendo aquellos con una longitud de cadena C50, grupos terminales aromáticos y ceto-carotenoides. De igual manera, subraya la capacidad de las actinobacterias marinas para sintetizar carotenoides con estructuras químicas variadas (e.g. pigmentos), lo cual puede influir en sus propiedades biológicas y potenciales aplicaciones. Sin embargo, para las cepas aisladas de LOL aún existe un amplio espacio para la exploración y caracterización de los terpenos que potencialmente pueden producir y respecto a su función en la célula y en el ecosistema marino.

Los PKS y NRPS fueron las siguientes dos clases de grupos de genes biosintéticos que fueron observados con mayor abundancia en los genomas de este estudio. Este tipo de clases se han reportado asociados a una gran cantidad de los antibióticos y antifúngicos conocidos (Cragg and Newman, 2013). Se han reportado recientemente la presencia de estas clases de BGCs, en particular PKS-I y NRPS, con diferentes actividades en los géneros *Streptomyces*, *Micrococcus*, *Brachy bacterium*, *Micromonospora* y *Saccharomonospora* aislados de diferentes hábitats, entre ellos ambientes marinos e hipersalinos (Shayesteh *et al.*, 2020; Anggelina *et al.*, 2021; Ramírez-Durán *et al.*, 2021). En particular, este estudio sugiere que las actinobacterias marinas tienen la capacidad de sintetizar biosintéticamente clústeres de PKS y NRPS, lo que implica un potencial para la producción de nuevos compuestos bioactivos. Se debe tener en cuenta que, aunque los compuestos producidos pueden no mostrar actividad directa contra otras bacterias, en el medio ambiente pueden presentar propiedades biológicas alternativas de beneficio para las células que los producen. Por ejemplo, al examinar los genomas del género *Micromonospora*, identificamos que los genomas LOL-024 y LOL-025 presentan grupos de PKS tipo-III, pertenecientes a la producción de Alkyl-O-dihydro geranyl methoxy hydroquinona; un tipo de lípido fenólico prenilado que se cree por otros tipos de alkylquinonas que pueda estar relacionado con la rigidez de la membrana celular. Además de otros BGCs de Sideróforos como la desferrioxamina E y moléculas osmoprotectores como ectoína y N-acetilglutaminilglutamina amida (NAGGN).

En particular, la presencia de ectoína en todos los genomas del género *Actinomadura* y *Nocardiosis* confirman lo reportado por Arulpraskasam y Dharumadurai (2021), en donde

señalan que el grupo de genes de síntesis de la ectoína se encuentra conservado en todos los géneros de actinobacterias, excepto en el género *Micromonospora*, lo cual se confirma en este estudio. Es importante mencionar que se ha reportado que la ausencia de ectoína se ha correlacionado con la presencia de NAGGN en *Micromonospora*, como también lo observamos. Los genes de ectoína y NAGGN tienen una función osmoprotectora, la cual es importante para contrarrestar y mantener el equilibrio osmótico en su entorno (Arulpraskasam and Dharumadurai, 2021; Abdel-Mageed *et al.*, 2021). Con base en lo anterior, consideramos que la presencia de estos grupos de genes en los genomas de cepas LOL juegan un papel clave en la síntesis de compuestos osmoprotectores, que resultan relevantes en ambientes con altas salinidades como la Laguna Ojo de Liebre.

A pesar de la abundancia de GCFs detectados en la formación de redes de similitud, resultó que su porcentaje de homología fue significativamente bajo, registrando menos del 1% en comparación con aquellos ya documentados en las bases de datos de referencia. Esto sugiere que las actinobacterias cuyos GCFs exhiben bajos niveles de homología con aquellos conocidos poseen un potencial elevado para la producción de compuestos novedosos con actividad biológica (Hifnawy *et al.*, 2020; Soldatou *et al.*, 2021). Cabe mencionar que las cepas de este estudio han reportado actividad biológica contra diferentes líneas celulares de cáncer (Zamora *et al.*, 2022), y los análisis de masas de estos extractos revelaron una escasa similitud con las masas de compuestos previamente consignados en la literatura científica (Zamora *et al.*, 2022). Estos resultados fortalecen la hipótesis de que las actinobacterias con GCFs poco homólogos ofrecen un reservorio prometedor para la identificación de nuevos compuestos bioactivos.

Los dos genomas del género *Actinomadura* que se analizaron en este estudio (LOL-011 y LOL-016) tuvieron entre ellos un 100% de similitud en sus patrones de distribución de GCF; así como alta similitud con el genoma de referencia más cercano (*A. cremea*). Estos análisis apoyan la afiliación quimiotaxonómica de nuestras cepas a esta misma especie. Una familia de genes ya estudiada y conocida que estos genomas poseen es la del híbrido de PKS-NRP, que produce el compuesto Maduropeptina. Este compuesto fue inicialmente aislado de la cepa *A. madurae* ATCC 39144 y descrito por Van Lanen *et al.* en 2007, y pertenece a la familia de antibióticos antitumorales de la enedina. Su estructura incluye una proteína transportadora (MDP) y un cromóforo, propuesto que se compone de cuatro enzimas: MdpB, MdpB1, MdpB2 y MdpB3 (Ling *et al.*, 2010). Debido al alto grado de similitud con esta ruta metabólica en nuestros genomas, podemos inferir que también la especie *A. cremea*, tiene el potencial de producir dicho compuesto; lo que sugiere que las cepas correspondientes a los genomas estudiados tienen el potencial de producir al menos un compuesto con propiedades antibióticas y antitumorales.

Por otra parte, los patrones de distribución del genoma LOL-012 con respecto a su genoma filogenéticamente más cercano, *Nocardiosis sp* CNT-312, presentaron cinco diferencias en categorías como RiPPs, PKS, Terpenos y Otros lo que representa que comparten un 54% en sus comparaciones de GCFs. Lo cual nos puede indicar un valor alto de similitud y apoya la hipótesis de que representan la misma especie. Sin embargo, a pesar de tener altos niveles de similitud con respecto a los GCFs observados, será necesario realizar más estudios para considerar clasificar como una nueva especie. El potencial del genoma de *Nocardiosis* LOL-012 reveló grupos de genes relacionados con la producción de compuestos con propiedades antimicrobianas, dado que este género ha sido reconocido por su capacidad sobresaliente en la producción de tales compuestos (Bennur *et al.*, 2015).

5. CONCLUSIÓN

El análisis genómico realizado permitió evaluar las relaciones filogenéticas y el potencial biosintético de las cepas de actinobacterias aisladas de los sedimentos de la Laguna Ojo de Liebre. La combinación de herramientas como la comparación de las secuencias del gen 16S ARNr, junto con los análisis de MLSA, ANI y dDDH, facilitó una identificación robusta y, en algunos casos, permitió proponer nuevas especies, como resultó con las cepas del género *Micromonospora*. Además, la minería genómica reveló una notable diversidad de genes biosintéticos, particularmente aquellos relacionados con la producción de terpenos, PKS y NRPS, lo que sugiere un considerable potencial de estas actinobacterias para la síntesis de compuestos bioactivos con aplicaciones biotecnológicas, especialmente terapéuticas. Los resultados de este estudio refuerzan la idea de que las actinobacterias provenientes de ambientes extremos, como la Laguna Ojo de Liebre, representan una fuente prometedora de metabolitos. Sin embargo, se resalta la necesidad de realizar estudios fenotípicos adicionales que permitan confirmar la delimitación de especies y explorar con mayor profundidad el potencial de estas bacterias en el desarrollo de nuevos fármacos.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos al gobierno Mexicano por su apoyo a través de una subvención por PRODEP-SEP (UABC-PTC-676), y al CONAHCYT con la beca de Doctorado del CVU 553310 y el financiamiento otorgado para el proyecto de Ciencia de Frontera CF-2023-G-690 otorgadas para llevar a cabo esta investigación científica. A la Universidad Autónoma de Baja California por financiar esta investigación a través de la 22a Convocatoria Interna con el proyecto 401-1-C-35-22. Agradecemos el apoyo de la beca para Mujeres en la Ciencia L'Oreal-UNESCO-Academia Mexicana de Ciencias 2021. A la Exportadora de Sal S.A. por su apoyo y logística en Guerrero Negro, B.C.S., para la recolección de muestras de sedimento.

CONTRIBUCIÓN DE LOS AUTORES

Cesar O. Carreón-Gaxiola realizó el trabajo experimental bioinformático, analizó los datos, generó figuras, tablas y redactó el manuscrito. Mónica Torres-Beltrán, generó figuras, analizó los datos y edición del manuscrito. Juan A. Ugalde realizó limpieza por calidades de lecturas y ensamble de genomas. Natalie Millán-Aguíñaga planificó los experimentos, proporcionó la idea inicial del proyecto, supervisó la investigación, analizó los datos y redactó el manuscrito. Todos los autores leyeron y aprobaron la versión final del manuscrito.

CONFLICTO DE INTERESES

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

REFERENCIAS

Abdel-Mageed, W. M., Al-Wahaibi, L. H., Lehri, B., Al-Saleem, M. S. M., Goodfellow, M., Kusuma, A. B., Nouioui, I., Soleh, H., Pathom-Aree, W., Jaspars, M., Karlyshev, A. V., 2021. Biotechnological and ecological potential of *Micromonospora provocator* sp. nov., a gifted strain isolated from the challenger deep of the Mariana trench. *Mar. Drugs*. 19(5), 243. <https://doi.org/10.3390/md19050243>

- Abdel-Razek, A. S., El-Naggar, M. E., Allam, A., Morsy, O. M., Othman, S. I., 2020. Microbial natural products in drug discovery. *Processes*. 8(4), 470. <https://doi.org/10.3390/pr8040470>
- Adamek, M., Alanjary, M., Sales-Ortells, H., Goodfellow, M., Bull, A. T., Winkler, A., Wibberg, D., Kalinowski, J., Ziemert, N., 2018. Comparative genomics reveals phylogenetic distribution patterns of secondary metabolites in *Amycolatopsis* species. *BMC Genomics*. 19 (1), 426. <https://doi.org/10.1186/s12864-018-4809-4>
- Alanjary, M., Steinke, K., Ziemert, N., 2019. AutoMLST: An automated web server for generating multi-locus species trees highlighting natural product potential. *Nucleic Acids Res.* 47 (W1), W276-W282. <https://doi.org/10.1093/nar/gkz282>
- Amin, D. H., Abdallah, N. A., Abolmaaty, A., Tolba, S., Wellington, E. M. H., 2020. Microbiological and molecular insights on rare Actinobacteria harboring bioactive prospective. *Bull. Natl. Res. Cent.* 44 (1), 5. <https://doi.org/10.1186/s42269-019-0266-8>
- Angelina, A. C., Pringgenies, D., Setyati, W. A., 2021. Presence of biosynthetic gene clusters (NRPS/PKS) in actinomycetes of mangrove sediment in Semarang and Karimunjawa, Indonesia. *Environ. Nat. Resour. J.* 19 (5), 391-401. <https://doi.org/10.32526/ennrj/19/202100050>
- Aruldass, C. A., Dufossé, L., Ahmad, W. A., 2018. Current perspective of yellowish-orange pigments from microorganisms- a review. *J. Clean. Prod.* 180, 168-182. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2018.01.093>
- Arulprakasam, K. R., Dharumadurai, D., 2021. Genome mining of biosynthetic gene clusters intended for secondary metabolites conservation in actinobacteria. *Microb. Pathog.* 161, 105252. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2021.105252>
- Asker, D., Awad, T. S., Beppu, T., Ueda, K., 2018. Rapid and selective screening method for isolation and identification of carotenoid-producing bacteria. In: Barreiro, C., Barredo, J.L. (Eds.), *Microbial Carotenoids*. vol. 1852. Springer, New York, pp. 143-170. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8742-9_9
- Awakawa, T., Fujita, N., Hayakawa, M., Ohnishi, Y., Horinouchi, S., 2011. Characterization of the biosynthesis gene cluster for alkyl-O-dihydrogeranyl-methoxyhydroquinones in *Actinoplanes missouriensis*. *Chembiochem.* 12(3), 439-448. <https://doi.org/10.1002/cbic.201000628>
- Baig, U., Dahanukar, N., Shintre, N., Holkar, K., Pund, A., Lele, U., Gujarathi, T., Patel, K., Jakati, A., Singh, R., Vidwans, H., Tamhane, V., Deshpande, N., Watve, M., 2021. Phylogenetic diversity and activity screening of cultivable Actinobacteria isolated from marine sponges and associated environments from the western coast of India. *Access Microbiol.* 3(9). <https://doi.org/10.1099/acmi.0.000242>
- Barka, E. A., Vatsa, P., Sanchez, L., Gaveau-Vaillant, N., Jacquard, C., Klenk, H. P., Clément, C., Ouhdouch, Y., Van Wezel, G. P., 2016. Taxonomy, physiology, and natural products of Actinobacteria. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 80(1), 1-43. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00019-15>

- Ben Khedher, M., Ghedira, K., Rolain, J. M., Ruimy, R., Croce, O., 2022. Application and challenge of 3rd generation sequencing for Clinical Bacterial Studies. *Int. J. Mol. Sci.* 23(3), 1395. <https://doi.org/10.3390/ijms23031395>
- Bennur, T., Kumar, A. R., Zinjarde, S., Javdekar, V., 2015. *Nocardiosis* species: incidence, ecological roles and adaptations. *Microbiol. Res.* 174, 33-47. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2015.03.010>
- Blin, K., Shaw, S., Kloosterman, A. M., Charlop-Powers, Z., van Wezel, G. P., Medema, M. H., Weber, T., 2021. antiSMASH 6.0: Improving cluster detection and comparison capabilities. *Nucleic Acids Res.* 49(W1), W29-W35. <https://doi.org/10.1093/nar/gkab335>
- Bowmer, K. H., Padovan, A., Oliver, R. L., Korth, W., Ganf, G. G., 1992. Physiology of geosmin production by *Anabaena circinalis* Isolated from the Murrumbidgee river, Australia. *Water Sci. Technol.* 25 (2), 259-267. <https://doi.org/10.2166/wst.1992.0060>
- Brotosudarmo, T. H. P., Limantara, L., Setiyono, E., Heriyanto., 2020. Structures of astaxanthin and their consequences for therapeutic application. *Int. J. Food Sci.* 1-16. <https://doi.org/10.1155/2020/2156582>
- Bushnell, B., 2020. BBDuk, California, Estados Unidos, <https://igi.doe.gov/data-and-tools/software-tools/bbtools/bb-tools-user-guide/bbduk-guide/> (consultado agosto 7, 2021)
- Cardoso-Martínez, F., Becerril-Espinosa, A., Barrila-Ortíz, C., Torres-Beltrán, M., Ocampo-Alvarez, H., Iñiguez-Martínez, A. M., Soria-Mercado, I. E., 2015. Antibacterial and cytotoxic bioactivity of marine Actinobacteria from Loreto Bay national park, Mexico. *Hidrobiológica.* 25 (2), 223-229. <https://hidrobiologica.izt.uam.mx/index.php/revHidro/article/view/479>
- Carranco Jáuregui, M. E., Calvo Carrillo, M., Pérez-Gil Romo, F., 2011. Carotenoides y su función antioxidante: Revisión. *Arch. Latinoam. Nutr.* 61 (3), 233-241. <http://www.alanrevista.org/ediciones/2011/3/art-1/>
- Carro, L., Nouioui, I., Sangal, V., Meier-Kolthoff, J. P., Trujillo, M. E., Montero-Calasanz, M. D. C., Sahin, N., Smith, D. L., Kim, K. E., Peluso, P., Deshpande, S., Woyke, T., Shapiro, N., Kyrpides, N. C., Klenk, H. P., Göker, M., Goodfellow, M., 2018. Genome-based classification of micromonosporae with a focus on their biotechnological and ecological potential. *Sci. Rep.* 8(1), 525. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-17392-0>
- Caruso G., Dell'Acqua O., Caruso R., Azzaro M., 2022. Phenotypic characterization of bacterial isolates from marine waters and plastisphere communities of the Ross Sea (Antarctica). *J. Clin. Microbiol. Biochem. Technol.* 8 (1), 001-009. <https://dx.doi.org/10.17352/jcmbt.000048>
- Chaumeil, P. A., Mussig, A. J., Hugenholtz, P., Parks, D. H., 2020. GTDB-Tk: A toolkit to classify genomes with the genome taxonomy database. *Bioinformatics.* 36(6), 1925-1927. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btz848>
- Cho, S. T., Kung, H. J., Huang, W., Hogenhout, S. A., Kuo, C. H., 2020. Species boundaries and molecular markers for the classification of 16Srl phytoplasmas inferred by genome analysis. *Front. Microbiol.* 11, 1531. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01531>

Chun, J., Oren, A., Ventosa, A., Christensen, H., Arahall, D. R., Da Costa, M. S., Rooney, A. P., Yi, H., Xu, X.-W., De Meyer, S., Trujillo, M. E., 2018. Proposed minimal standards for the use of genome data for the taxonomy of prokaryotes. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 68 (1), 461-466. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.002516>

Cragg, G. M., Newman, D. J., 2013. Natural products: A continuing source of novel drug leads. *Biochim. Biophys. Acta – Gen. Subj.* 1830 (6), 3670-3695. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2013.02.008>

Dat, T. T. H., Steinert, G., Cuc, N. T. K., Cuong, P. V., Smidt, H., Sipkema, D., 2022. Diversity of bacterial secondary metabolite biosynthetic gene clusters in three vietnamese sponges. *Mar. Drugs*, 21(1), 29. <https://doi.org/10.3390/md21010029>

Dawoud, T. M., Alharbi, N. S., Theruvinthalakal, A. M., Thekkangil, A., Kadaikunnan, S., Khaled, J. M., Almanaa, T. N., Sankar, K., Innasimuthu, G. M., Alanzi, K. F., Rajaram, S. K., 2020. Characterization and antifungal activity of the yellow pigment produced by a *Bacillus* sp. DBS4 isolated from the lichen *Dirinaria agealita*. *Saudi J. Biol. Sci.* 27(5), 1403-1411. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2019.11.031>

Edelvio, D. B. G., Leo, R. L. D., Rita, D. C. M. D. M., 2018. Actinomycetes bioactive compounds: Biological control of fungi and phytopathogenic insect. *Afr. J. Biotechnol.* 17 (17), 552-559. <https://doi.org/10.5897/AJB2017.16323>

El-Tarabily, K. A., Sham, A., Elbadawi, A. A., Hassan, A. H., Alhosani, B. K. K., El-Esawi, M. A., AlKhajeh, A. S., AbuQamar, S. F., 2021. A Consortium of rhizosphere-competent Actinobacteria exhibiting multiple plant growth-promoting traits improves the growth of *Avicennia marina* in the United Arab Emirates. *Front. Mar. Sci.* 8, 715123. <https://doi.org/10.3389/fmars.2021.715123>

Erb, A., Luzhetskyy, A., Hardter, U., Bechthold, A., 2009. Cloning and sequencing of the biosynthetic gene cluster for saquayamycin z and galtamycin b and the elucidation of the assembly of their saccharide chains. *Chembiochem.* 10 (8), 1392-1401. <https://doi.org/10.1002/cbic.200900054>

Fong, N. J. C., Burgess, M. L., Barrow, K. D., Glenn, D. R., 2001. Carotenoid accumulation in the psychrotrophic bacterium *Arthrobacter agilis* in response to thermal and salt stress. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 56 (5-6), 750-756. <https://doi.org/10.1007/s002530100739>

Garavito, A., González-Muñoz, A., Mosquera-Rendón, J., Catalina, A., Álvarez-Yela, D. L. Á., Cristancho-Ardila, M. A., 2017. Latin American biodiversity and perspectives to study it using 'omics' technologies/Biodiversidad latinoamericana y sus perspectivas de estudio con tecnologías 'ómicas'. *Mex. J. Biotechnol.* 2 (2), 98-129. <https://doi.org/10.29267/mxjb.2017.2.2.98>

García-López, M., Meier-Kolthoff, J. P., Tindall, B. J., Gronow, S., Woyke, T., Kyrpides, N. C., Göker, M., 2019. Analysis of 1,000 type-strain genomes improves taxonomic classification of Bacteroidetes. *Front. Microbiol.* 10, 2083. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02083>

- Glaeser, S. P., Kämpfer, P., 2015. Multilocus sequence analysis (MLSA) in prokaryotic taxonomy. *Syst. Appl. Microbiol.* 38 (4), 237-245. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2015.03.007>
- Gomes, R. P., Oliveira, T. R., Gama, A. R., Alves, K. R., Santos, R. K., Vieira, J. D. G., Pires, D., Carneiro, L. C., 2022. Phenotypic plasticity and characterization of *Chromobacterium* isolates from aquatic environment. *Res. Soc. Dev.* 11 (15). <https://doi.org/10.33448/rsd-v11i15.36821>
- Goris, J., Konstantinidis, K. T., Klappenbach, J. A., Coenye, T., Vandamme, P., Tiedje, J. M., 2007. DNA–DNA hybridization values and their relationship to whole-genome sequence similarities. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 57 (1), 81-91. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.64483-0>
- Gregory, K., Salvador, L. A., Akbar, S., Adaikpoh, B. I., Stevens, D. C., 2019. Survey of biosynthetic gene clusters from sequenced *Myxobacteria* reveals unexplored biosynthetic potential. *Microorganisms*, 7 (6), 181. <https://doi.org/10.3390/microorganisms7060181>
- Hassan, W. M., 2022. Microbial pigments: Sources and applications in the marine environment. *Egypt. J. Aquat. Biol. Fish.* 26 (1), 99-124. <https://doi.org/10.21608/ejabf.2022.215163>
- He, Z., Wang, Y., Bai, X., Chu, M., Yi, Y., Zhu, J., Gu, M., Jiang, L., Zhang, Z., 2023. Bacterial community composition and isolation of Actinobacteria from the soil of flaming mountain in Xinjiang, China. *Microorganisms*. 11(2), 489. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11020489>
- Hifnawy, M. S., Fouda, M. M., Sayed, A. M., Mohammed, R., Hassan, H. M., AbouZid, S. F., Rateb, M. E., Keller, A., Adamek, M., Ziemert, N., Abdelmohsen, U. R., 2020. The genus *Micromonospora* as a model microorganism for bioactive natural product discovery. *RSC Adv.* 10(35), 20939-20959. <https://doi.org/10.1039/D0RA04025H>
- Hu, D., Sun, C., Jin, T., Fan, G., Mok, K. M., Li, K., Lee, S. M. Y., 2020. Exploring the potential of antibiotic production from rare Actinobacteria by whole-genome sequencing and guided MS/MS analysis. *Front. Microbiol.* 11, 1540. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01540>
- Hui, M. L. Y., Tan, L. T. H., Letchumanan, V., He, Y. W., Fang, C. M., Chan, K. G., Law, J. W. F., Lee, L. H., 2021. The extremophilic actinobacteria: from microbes to medicine. *Antibiotics*. 10(6), 682. <https://doi.org/10.3390/antibiotics10060682>
- Jagannathan, S. V., Manemann, E. M., Rowe, S. E., Callender, M. C., Soto, W., 2021. Marine actinomycetes, new sources of biotechnological products. *Mar. Drugs*. 19(7), 365. <https://doi.org/10.3390/md19070365>
- Jain, C., Rodriguez-R, L. M., Phillippy, A. M., Konstantinidis, K. T., Aluru, S., 2018. High throughput ANI analysis of 90K prokaryotic genomes reveals clear species boundaries. *Nat. Commun.* 9(1), 5114. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-07641-9>

- Jakubiec-Krzesniak, K., Rajnisz-Mateusiak, A., Guspiel, A., Ziemska, J., Solecka, J., 2018. Secondary metabolites of actinomycetes and their antibacterial, antifungal and antiviral properties. *Pol. J. Microbiol.* 67(3), 259-272. <https://doi.org/10.21307/pjm-2018-048>
- Kalkreuter, E., Pan, G., Cepeda, A. J., Shen, B., 2020. Targeting bacterial genomes for natural product discovery. *Trends Pharmacol. Sci.* 41(1), 13-26. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2019.11.002>
- Katoh, K., Standley, D. M., 2013. MAFFT Multiple Sequence Alignment Software Version 7: improvements in performance and usability. *Mol. Biol. Evol.* 30(4), 772-780. <https://doi.org/10.1093/molbev/mst010>
- Kim, M., Lee, K. E., Cha, I. T., Park, S. J., 2022. *Photobacterium halophilum* sp. nov. and a salt-loving bacterium isolated from marine sediment. *Diversity.* 14(3), 188. <https://doi.org/10.3390/d14030188>
- Krzywinski, M., Schein, J., Birol, I., Connors, J., Gascoyne, R., Horsman, D., Jones, S. J., Marra, M. A., 2009. Circos: An information aesthetic for comparative genomics. *Genome Res.* 19(9), 1639-1645. <https://doi.org/10.1101/gr.092759.109>
- Lalucat, J., Mulet, M., Gomila, M., García-Valdés, E., 2020. Genomics in bacterial taxonomy: Impact on the genus *Pseudomonas*. *Genes.* 11(2), 139. <https://doi.org/10.3390/genes11020139>
- LeBlanc, N., Charles, T. C., 2022. Bacterial genome reductions: Tools, applications, and challenges. *Front. Genome Ed.* 4, 957289. <https://doi.org/10.3389/fgged.2022.957289>
- Li, Q., Chen, X., Jiang, Y., Jiang, C., 2016. Morphological identification of actinobacteria. In: Dharumadurai, D., Yi, J. (Eds.), *Actinobacteria-basics and biotechnological applications*, IntechOpen, Reino Unido, pp. 59-86. <https://dx.doi.org/10.5772/61461>
- Li, S., Jiang, Y. J., Ma, Z., Wang, N., 2023. Complete genome sequence of *Streptomyces* sp. HNA39, a new cyclizidine producer isolated from a South China Sea sediment. *Mar. Genomics*, 70, 101033. <https://doi.org/10.1016/j.margen.2023.101033>
- Ling, J., Horsman, G. P., Huang, S.-X., Luo, Y., Lin, S., Shen, B., 2010. Eneidyne antitumor antibiotic maduropeptin biosynthesis featuring a c-methyltransferase that acts on a CoA-tethered aromatic substrate. *J. Am. Chem. Soc.* 132(36), 12534-12536. <https://doi.org/10.1021/ja1050814>
- Liu, C., Kakeya, H., 2020. Cryptic chemical communication: Secondary metabolic responses revealed by microbial co-culture. *Chem. Asian J.* 15(3), 327-337. <https://doi.org/10.1002/asia.201901505>
- Liu, H., Zhang, C., Zhang, X., Tan, K., Zhang, H., Cheng, D., Ye, T., Li, S., Ma, H., Zheng, H., 2020. A novel carotenoids-producing marine bacterium from noble scallop *Chlamys nobilis* and antioxidant activities of its carotenoid compositions. *Food Chem.* 320, 126629. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.126629>
- Manikkam, R., Pati, P., Thangavel, S., Venugopal, G., Joseph, J., Ramasamy, B., Dastager, S. G., 2019. Distribution and bioprospecting potential of actinobacteria from Indian

mangrove ecosystems. In: In: Satyanarayana, T., Johri, B., Das, S. (Eds.), *Microbial Diversity in Ecosystem Sustainability and Biotechnological Applications*. vol.1. Springer, Singapore, pp. 319-353. https://doi.org/10.1007/978-981-13-8315-1_11

Mateo-Estrada, V., Graña-Miraglia, L., López-Leal, G., Castillo-Ramírez, S., 2019. Phylogenomics reveals clear cases of misclassification and genus-wide phylogenetic markers for *Acinetobacter*. *Genome Biol. Evol.* 11(9), 2531-2541. <https://doi.org/10.1093/gbe/evz178>

Medema, M. H., Cimermancic, P., Sali, A., Takano, E., Fischbach, M. A., 2014. A systematic computational analysis of biosynthetic gene cluster evolution: lessons for engineering biosynthesis. *PLOS Comput. Biol.* 10 (12):e1004016. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1004016>

Millán-Aguiñaga, N., Chavarria, K. L., Ugalde, J. A., Letzel, A. C., Rouse, G. W., Jensen, P. R., 2017. Phylogenomic insight into *Salinispora* (Bacteria, Actinobacteria) species designations. *Sci. Rep.* 7(1), 3564. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-02845-3>

Millán-Aguiñaga, N., Soldatou, S., Brozio, S., Munnoch, J. T., Howe, J., Hoskisson, P. A., Duncan, K. R., 2019. Awakening ancient polar Actinobacteria: Diversity, evolution and specialized metabolite potential. *Microbiology.* 165(11), 1169-1180. <https://doi.org/10.1099/mic.0.000845>

Minh, B. Q., Schmidt, H. A., Chernomor, O., Schrempf, D., Woodhams, M. D., Von Haeseler, A., Lanfear, R., 2020. IQ-TREE 2: New models and efficient methods for phylogenetic inference in the genomic era. *Mol. Biol. Evol.* 37(5), 1530-1534. <https://doi.org/10.1093/molbev/msaa015>

Mistry, J., Chuguransky, S., Williams, L., Qureshi, M., Salazar, G. A., Sonnhammer, E. L. L., Tosatto, S. C. E., Paladin, L., Raj, S., Richardson, L. J., Finn, R. D., Bateman, A., 2021. Pfam: The protein families database in 2021. *Nucleic Acids Res.* 49(D1), D412-D419. <https://doi.org/10.1093/nar/gkaa913>

Mohamad Naim, N. A. I., Tajul Anuar, N. R., Ahmad, L. W. Z., Kambol, R., Syed Mohamad, S. A., Aris, F., Zakaria, N. A., Mohamed Yunus, N., 2022. In silico study of the effectiveness of 16S rRNA gene as a universal genetic marker to identify closely related *Burkholderia* spp. in panicle blight of rice. *Sci. Lett. J.* 16(1), 102. <https://doi.org/10.24191/sl.v16i1.15582>

Moran, N. A., Wernegreen, J. J., 2000. Lifestyle evolution in symbiotic bacteria: Insights from genomics. *Trends Ecol. Evol.* 15(8), 321-326. [https://doi.org/10.1016/S0169-5347\(00\)01902-9](https://doi.org/10.1016/S0169-5347(00)01902-9)

Mukherjee, S., Stamatis, D., Li, C. T., Ovchinnikova, G., Bertsch, J., Sundaramurthi, J. C., Kandimalla, M., Nicolopoulos, P. A., Favognano, A., Chen I. C., Kyrpides, C. K., Reddy, T. B. K., 2023. Twenty-five years of Genomes OnLine Database (GOLD): data updates and new features in v. 9. *Nucleic Acids Res.* 51 (D1), D957-D963. <https://doi.org/10.1093/nar/gkac974>

Mukhia, S., Kumar, A., Kumari, P., Kumar, R., Kumar, S., 2022. Multilocus sequence based identification and adaptational strategies of *Pseudomonas* sp. From the supraglacial site of

Muller Jr, P. A., Epstein, S. S., 2012. In silico genome-genome hybridization values accurately and precisely predict empirical DNA-DNA hybridization values for classifying prokaryotes. arXiv, 1202.5211. <https://doi.org/10.48550/arXiv.1202.5211>

Naughton, L. M., Romano, S., O'Gara, F., Dobson, A. D. W., 2017. Identification of secondary metabolite gene clusters in the *Pseudovibrio* genus reveals encouraging biosynthetic potential toward the production of novel bioactive compounds. Front. Microbiol. 8, 1494. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01494>

Navarro-Muñoz, J. C., Selem-Mojica, N., Mallowney, M. W., Kautsar, S. A., Tryon, J. H., Parkinson, E. I., De Los Santos, E. L. C., Yeong, M., Cruz-Morales, P., Abubucker, S., Roeters, A., Lokhorst, W., Fernandez-Guerra, A., Cappelini, L. T. D., Goering, A. W., Thomson, R. J., Metcalf, W. W., Kelleher, N. L., Barona-Gomez, F., Medema, M. H., 2020. A computational framework to explore large-scale biosynthetic diversity. Nat. Chem. Biol. 16(1), 60-68. <https://doi.org/10.1038/s41589-019-0400-9>

Nouioui, I., Carro, L., García-López, M., Meier-Kolthoff, J. P., Woyke, T., Kyrpides, N. C., Pukall, R., Klenk, H.-P., Goodfellow, M., Göker, M., 2018. Genome-based taxonomic classification of the phylum Actinobacteria. Front. Microbiol. 9, 2007. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02007>

Palmer, M., Steenkamp, E. T., Blom, J., Hedlund, B. P., Venter, S. N., 2020. All ANIs are not created equal: Implications for prokaryotic species boundaries and integration of ANIs into polyphasic taxonomy. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 70(4), 2937-2948. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.004124>

Parks, D. H., Chuvochina, M., Rinke, C., Mussig, A. J., Chaumeil, P.-A., Hugenholtz, P., 2022. GTDB: An ongoing census of bacterial and archaeal diversity through a phylogenetically consistent, rank normalized and complete genome-based taxonomy. Nucleic Acids Res. 50(D1), D785-D794. <https://doi.org/10.1093/nar/gkab776>

Parks, D. H., Imelfort, M., Skennerton, C. T., Hugenholtz, P., Tyson, G. W., 2015. CheckM: Assessing the quality of microbial genomes recovered from isolates, single cells, and metagenomes. Genome Res. 25(7), 1043-1055. <https://doi.org/10.1101/gr.186072.114>

Parks, D.H., Chuvochina, M., Chaumeil, P., Rinke, C., Mussig, A.J., Hugenholtz, P., 2019. Selection of representative genomes for 24,706 bacterial and archaeal species clusters provide a complete genome-based taxonomy. BioRxiv. <https://doi.org/10.1101/771964>

Patin, N. V., Duncan, K. R., Dorrestein, P. C., Jensen, P. R., 2016. Competitive strategies differentiate closely related species of marine actinobacteria. ISME J. 10(2), 478-490. <https://doi.org/10.1038/ismej.2015.128>

Pavan, M. E., López, N. I., Pettinari, M. J., 2020. Melanin biosynthesis in bacteria, regulation and production perspectives. Appl. Microbiol. Biotechnol. 104(4), 1357-1370. <https://doi.org/10.1007/s00253-019-10245-y>

Pinto-Almeida, A., Bauermeister, A., Luppino, L., Grilo, I. R., Oliveira, J., Sousa, J. R., Petras, D., Rodrigues, C. F., Prieto-Davó, A., Tasdemir, D., Sobral, R. G., Gaudêncio, S. P., 2021. The diversity, metabolomics profiling, and the pharmacological potential of Actinomycetes isolated from the Estremadura spur pockmarks (Portugal). *Mar. Drugs*. 20(1), 21. <https://doi.org/10.3390/md20010021>

Preobrazhenskaia, T. P., Lavrova, N. V., Ukholina, R. S., Nechaeva, N. P., 1975. Isolation of new species of the genus *Actinomadura* on selective media with streptomycin and bruneomycin. *Antibiotiki*. 20(5), 404–409. PMID: 1225188.

Qin, S., Li, W. J., Klenk, H. P., Hozzein, W. N., Ahmed, I., 2019. Actinobacteria in special and extreme habitats: diversity, function roles and environmental adaptations. *Front. Microbiol.* 10, 944. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00944>

Racine, J. S., 2012. RStudio: A platform-independent IDE for R and sweave: Software review. *J. Appl. Econometrics*. 27 (1), 167-172. <https://doi.org/10.1002/jae.1278>

Raina, V., Nayak, T., Ray, L., Kumari, K., Suar, M., 2019. A polyphasic taxonomic approach for designation and description of novel microbial species. In: Das, S., Dash, H.R. (Eds.), *Microbial Diversity in the Genomic Era*. Academic Press, Reino Unido, pp. 137-152. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814849-5.00009-5>

Ramírez-Durán, N., De La Haba, R. R., Vera-Gargallo, B., Sánchez-Porro, C., Alonso-Carmona, S., Sandoval-Trujillo, H., Ventosa, A., 2021. Taxogenomic and comparative genomic analysis of the genus *Saccharomonospora* focused on the identification of biosynthetic clusters PKS and NRPS. *Front. Microbiol.* 12, 603791. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.603791>

Riesco, R., Carro, L., Román-Ponce, B., Prieto, C., Blom, J., Klenk, H.-P., Normand, P., Trujillo, M. E., 2018. Defining the species *Micromonospora saelicesensis* and *Micromonospora noduli* under the framework of genomics. *Front. Microbiol.* 9, 1360. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01360>

Rio, R. V. M., Lefevre, C., Heddi, A., Aksoy, S., 2003. Comparative genomics of insect-symbiotic bacteria: Influence of host environment on microbial genome composition. *Appl. Environ. Microbiol.* 69 (11), 6825-6832. <https://doi.org/10.1128/AEM.69.11.6825-6832.2003>

Roda-Garcia, J. J., Haro-Moreno, J. M., López-Pérez, M., 2023. Evolutionary pathways for deep-sea adaptation in marine planktonic Actinobacteriota. *Front. Microbiol.* 14, 1159270. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1159270>

Said Hassane, C., Fouillaud, M., Le Goff, G., Sklirou, A. D., Boyer, J. B., Trougakos, I. P., Jerabek, M., Bignon, J., De Voogd, N. J., Ouazzani, J., Gauvin-Bialecki, A., Dufossé, L., 2020. Microorganisms associated with the marine sponge *Scopalina hapalia*: A reservoir of bioactive molecules to slow down the aging process. *Microorganisms*. 8 (9), 1262. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8091262>

Sandmann, G., 2021. Carotenoid biosynthesis in the phylum Actinobacteria. In: Misawa, N. (Ed.), *Carotenoids, advances in experimental medicine and biology*. Springer Nature, Singapore, pp. 175–181. https://doi.org/10.1007/978-981-15-7360-6_14

Satyanarayana, T., Johri, B. N., Das, S. K., 2019. Microbial diversity in ecosystem sustainability and biotechnological applications. In: Satyanarayana, T., Johri, B. N., Das, S. K. (Eds.), *Microbial diversity in normal and extreme environments*. vol.1. Springer, Singapore. <https://link.springer.com/book/10.1007/978-981-13-8315-1>

Schorn, M. A., Alanjary, M. M., Aguinaldo, K., Korobeynikov, A., Podell, S., Patin, N., Lincecum, T., Jensen, P. R., Ziemert, N., Moore, B. S., 2016. Sequencing rare marine actinomycete genomes reveals high density of unique natural product biosynthetic gene clusters. *Microbiology*. 162 (12), 2075-2086. <https://doi.org/10.1099/mic.0.000386>

Seemann T., 2017. Shovill: Faster SPAdes assembly of Illumina reads. <https://github.com/tseemann/shovill> (consultado agosto 14, 2019).

Seemann, T., 2014. Prokka: Rapid prokaryotic genome annotation. *Bioinformatics*. 30 (14), 2068-2069. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu153>

Seshadri, R., Roux, S., Huber, K. J., Wu, D., Yu, S., Udway, D., Call, L., Nayfach, S., Hahnke, R. L., Pukall, R., White, J. R., Varghese, N. J., Webb, C., Palaniappan, K., Reimer, L. C., Sardà, J., Bertsch, J., Mukherjee, S., Reddy, T. B. K., Hajek P. P., Huntemann, M., Chen, A. I., Spunde, A., Clum, A., Shapiro, N., Wu, Z. Y., Zhao, Z., Zhou, Y., Evtushenko, L., Thijs, S., Stevens, V., Elie-fradosh, E. A., Mouncey, N. J., Yoshikuni, Y., Whitman, W. B., Klenk, H. P., Woyke, T., Göker, M., Krypides, N. C., Ivanova, N. N., 2022. Expanding the genomic encyclopedia of Actinobacteria with 824 isolate reference genomes. *Cell Genom.* 2 (12), 100213. <https://doi.org/10.1016/j.xgen.2022.100213>

Shayesteh, F., Binti Zakaria, N. S., Usup, G., Ahmad, A., 2020. Evaluation of antimicrobial potentiality and type-I polyketide synthase and nonribosomal peptide synthetase biosynthetic genes from some marine actinomycetes. *J. Microb. World.* 13 (1), 77-86. https://journals.iau.ir/article_673527_7c1075d060cc09ddfa3e1ffab0e82da4.pdf

Shivlata, L., Satyanarayana, T., 2015. Thermophilic and alkaliphilic Actinobacteria: Biology and potential applications. *Front. Microbiol.* 6, 1014. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.01014>

Siddharth, S., Parida, S., Muniraj, N., Hercules, S., Lim, D., Nagalingam, A., Wang, C., Gyorffy, B., Daniel, J. M., Sharma, D., 2021. Concomitant activation of GLI1 and Notch1 contributes to racial disparity of human triple negative breast cancer progression. *eLife*. 10, e70729. <https://doi.org/10.7554/eLife.70729>

Silva, A., Guimarães, L., Ferreira, E., Torres, M. D. C., Da Silva, A., Branco, P., Oliveira, F. A., Silva, G., Wilke, D., Silveira, E., Pessoa, O. D., Jimenez, P., Costa-Lotufo, L., 2016. Bioprospecting anticancer compounds from the marine-derived Actinobacteria *Actinomadura* sp. collected at the Saint Peter and Saint Paul Archipelago (Brazil). *J. Braz. Chem. Soc.* 28, 465-474 <https://doi.org/10.21577/0103-5053.20160297>

Silva, G. D. C., Kitano, I. T., Ribeiro, I. A. D. F., Lacava, P. T., 2022. The potential use of actinomycetes as microbial inoculants and biopesticides in agriculture. *Front. Soil Sci.* 2, 833181. <https://doi.org/10.3389/fsoil.2022.833181>

Singh, A., Krishnan, K. P., Prabakaran, D., Sinha, R. K., 2017. Lipid membrane modulation and pigmentation: A cryoprotection mechanism in Arctic pigmented bacteria. *J. Basic Microbiol.* 57 (9), 770-780. <https://doi.org/10.1002/jobm.201700182>

Siro, G., Pipite, A., Christi, K., Srinivasan, S., Subramani, R., 2022. Marine Actinomycetes associated with stony corals: A potential hotspot for specialized metabolites. *Microorganisms.* 10 (7), 1349. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10071349>

Soldatou, S., Eldjárn, G. H., Ramsay, A., Van Der Hoof, J. J. J., Hughes, A. H., Rogers, S., Duncan, K. R., 2021. Comparative metabologenomics analysis of polar Actinomycetes. *Mar. Drugs.* 19 (2), 103. <https://doi.org/10.3390/md19020103>

Sosio, M., Gaspari, E., Iorio, M., Pessina, S., Medema, M. H., Bernasconi, A., Simone, M., Maffioli, S. I., Ebricht, R. H., Donadio, S., 2018. Analysis of the pseudouridimycin biosynthetic pathway provides insights into the formation of c-nucleoside antibiotics. *Cell Chem. Biol.* 25 (5), 540-549.e4. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2018.02.008>

Stackebrandt, E. Ebers, J., 2006. Taxonomic parameters revisited: tarnished gold standards. *Microbiol. Today*, 33, 152.

Stephens, R. S., Myers, G., Eppinger, M., Bavoil, P. M., 2009. Divergence without difference: Phylogenetics and taxonomy of *Chlamydia* resolved. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 55 (2), 115-119. <https://doi.org/10.1111/j.1574-695X.2008.00516.x>

Tarantini, F. S., Brunati, M., Taravella, A., Carrano, L., Parenti, F., Hong, K. W., Williams, P., Chan, K. G., Heeb, S., Chan, W. C., 2021. *Actinomadura graeca* sp. nov.: A novel producer of the macrocyclic antibiotic zelvomycin. *PLOS ONE.* 16 (11), e0260413. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0260413>

Terlouw, B. R., Blin, K., Navarro-Muñoz, J. C., Avalon, N.E., Chevrette, M. G., Egbert, S., Lee, S., Meijer, D., Recchia, M. J. J., Reitz, Z. L., van Santen, J. A., Selem-Mojica, N., Tørring, T., Zaroubi, L., Alanjary, M., Aleti, G., Aguilar, C., Al-Salihi, S. A. A., Augustijn, H. E., Avelar-Rivas, J. A., Avitia-Domínguez, L. A., Barona-Gómez, F., Bernaldo-Agüero, J., Bielinski, V. A., Biermann, F., Booth, T. J., Carrion-Bravo, V.J., Castelo-Branco, R., Chagas, F. O., Cruz-Morales, P., Du, C., Duncan KR, Gavriilidou A, Gayard D, Gutiérrez-García K, Haslinger K, Helfrich EJN, van der Hoof, J. J. J., Jati, A. P., Kalkreuter, E., Kalyvas, N., Kang, K. B., Kautsar, S., Kim, W., Kunjapur, A. M., Li, Y. X., Lin, G. M., Loureiro, C., Louwen, J. J. R., Louwen, N. L. L., Lund, G., Parra, J., Philmus, B., Pourmohsenin, B., Pronk, L. J. U., Rego, A., Rex, D. A. B., Robinson, S., Rosas-Becerra, L.R., Roxborough, E.T., Schorn, M.A., Scobie, D.J., Singh, K.S., Sokolova, N., Tang, X., Udway, D., Vigneshwari, A., Vind, K., Vromans, S. P. J. M., Waschulin, V., Williams, S. E., Winter, J. M., Witte, T. E., Xie, H., Yang, D., Yu, J., Zdouc, M., Zhong, Z., Collemare, J., Linington, R.G., Weber, T., Medema, M.H., 2023. MIBiG 3.0: a community-driven effort to annotate experimentally validated biosynthetic gene clusters. *Nucleic Acids Res.* 51 (D1), D603-D610, <https://doi.org/10.1093/nar/gkac1049>

Thompson, D., Cognat, V., Goodfellow, M., Koechler, S., Heintz, D., Carapito, C., Van Dorselaer, A., Mahmoud, H., Sangal, V., Ismail, W., 2020. Phylogenomic classification and

biosynthetic potential of the fossil fuel-biodesulfurizing *Rhodococcus* strain IGTS8. *Front. Microbiol.* 11, 1417. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01417>

Torres-Beltrán, M., Cardoso-Martínez, F., Millán-Aguiñaga, N., Becerril-Espinosa, A., Soria-Mercado, I., 2012. Evaluation of the Gulf of California as a potential source of bioactive marine actinobacteria. *Cienc, Mar.* 38 (4), 609-624. <https://doi.org/10.7773/cm.v38i4.2131>

Traxler, M. F., Kolter, R., 2015. Natural products in soil microbe interactions and evolution. *Nat. Prod. Rep.* 32 (7), 956–970. <https://doi:10.1039/c5np00013k>

Tuttle, R. N., Demko, A. M., Patin, N. V., Kapon, C. A., Donia, M. S., Dorrestein, P., Jensen, P. R., 2019. Detection of natural products and their producers in ocean sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* 85 (8), e02830-18. <https://doi.org/10.1128/AEM.02830-18>

Van Bergeijk, D. A., Terlouw, B. R., Medema, M. H., Van Wezel, G. P., 2020. Ecology and genomics of Actinobacteria: New concepts for natural product discovery. *Nat. Rev. Microbiol.* 18(10), 546-558. <https://doi.org/10.1038/s41579-020-0379-y>

Van Der Lee, T. A. J., Medema, M. H., 2016. Computational strategies for genome-based natural product discovery and engineering in fungi. *Fungal Genet. Biol.* 89, 29-36. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2016.01.006>

Van Lanen, S. G., Oh, T., Liu, W., Wendt-Pienkowski, E., Shen, B., 2007. Characterization of the maduropeptin biosynthetic gene cluster from *Actinomadura madurae* ATCC 39144 supporting a unifying paradigm for enediyne biosynthesis. *J. Am. Chem. Soc.* 129(43), 13082-13094. <https://doi.org/10.1021/ja073275o>

Von Meijenfeldt, F. B., Arkhipova, K., Cambuy, D. D., Coutinho, F. H., Dutilh, B. E., 2019. Robust taxonomic classification of uncharted microbial sequences and bins with CAT and BAT. *Genome Biol.* 20, 217. <https://doi.org/10.1186/s13059-019-1817-x>

Wang, J. T., Shi, T. T., Ding, L., Xie, J., Zhao, P. J., 2023. Multifunctional Enzymes in Microbial Secondary Metabolic Processes. *Catalysts.* 13 (3), 581. <https://doi.org/10.3390/catal13030581>

Wang, Z., Xu, Y., Shao, J., Wang, J., Li, R., 2011. Genes associated with 2-methylisoborneol biosynthesis in Cyanobacteria: Isolation, characterization, and expression in response to light. *PLOS ONE.* 6 (4), e18665. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0018665>

Weber, T., Charusanti, P., Musiol-Kroll, E. M., Jiang, X., Tong, Y., Kim, H. U., Lee, S. Y., 2015. Metabolic engineering of antibiotic factories: new tools for antibiotic production in actinomycetes. *Trends Biotechnol.* 33 (1). 15–26. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2014.10.009>

Wickham, H., Chang, W., Wickham, M. H., 2016. ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis. Springer-Verlag, Nueva York. <https://ggplot2.tidyverse.org/>

Xie, Y., Elsheikh, M., 2022. Polyketides and terpenes in marine microalgae: Ecological roles and mechanisms of biosynthesis. *J. Mar. Sci. Technol.* 30(1). <https://doi.org/10.51400/2709-6998.2566>

- Xu, D., Nepal, K. K., Chen, J., Harmody, D., Zhu, H., McCarthy, P. J., Wright, A. E., Wang, G., 2018. Nocardiopeptidins A-C: New angucyclines with anti-MRSA activity isolated from a marine sponge-derived *Nocardiopepsis* sp. HB-J378. *Synth. Syst. Biotechnol.* 3(4), 246-251. <https://doi.org/10.1016/j.synbio.2018.10.008>
- Yang, X., Zhu, Z. H., Ji, X., Liu, Z. M., Zhang, H., Wei, B., 2021. Complete genome sequence of *Micromonospora craniellae* LHW63014T, a potential metal ion-chelating agent producer. *Mar. Genom.* 57, 100830. <https://doi.org/10.1016/j.margen.2020.100830>
- Yassin, A. F., Galinski, E. A., Wohlfarth, A., Jahnke, K. D., Schaal, K. P., Truper, H. G., 1993. A New actinomycete species, *Nocardiopepsis lucentensis* sp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 43 (2), 266-271. <https://doi.org/10.1099/00207713-43-2-266>
- Yoon, S. H., Ha, S. M., Kwon, S., Lim, J., Kim, Y., Seo, H., Chun, J., 2017. Introducing EzBioCloud: A taxonomically united database of 16S rRNA gene sequences and whole-genome assemblies. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 67(5), 1613-1617. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.001755>
- Zamora-Quintero, A. Y., Torres-Beltrán, M., Guillén-Matus, D. G., Oroz-Parra, I., Millán-Aguiñaga, N., 2022. Rare actinobacteria isolated from the hypersaline Ojo de Liebre Lagoon as a source of novel bioactive compounds with biotechnological potential. *Microbiology.* 168(2). <https://doi.org/10.1099/mic.0.001144>
- Zhang, D., Lu, Y., Chen, H., Wu, C., Zhang, H., Chen, L., Chen, X., 2020. Antifungal peptides produced by actinomycetes and their biological activities against plant diseases. *J. Antibiot.* 73 (5), 265-282. <https://doi.org/10.1038/s41429-020-0287-4>
- Zhang, F., Braun, D. R., Chanana, S., Rajski, S. R., Bugni, T. S., 2019. Phallusialides A–E, pyrrole-derived alkaloids discovered from a marine-derived *Micromonospora* sp. bacterium using MS-based metabolomics approaches. *J. Nat. Prod.* 82 (12), 3432-3439. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.9b00808>
- Zhang, T., Li, L., Song, L., Chen, W., 2009. Effects of temperature and light on the growth and geosmin production of *Lyngbya kuetzingii* (Cyanophyta). *J. Appl. Phycol.* 21 (3), 279-285. <https://doi.org/10.1007/s10811-008-9363-z>
- Zhang, Z., In, Y., Fukaya, K., Yang, T., Harunari, E., Urabe, D., Imada, C., Oku, N., Igarashi, Y., 2022. Kumemycinones A–G, cytotoxic angucyclinones from a deep sea-derived actinomycete of the genus *Actinomadura*. *J. Nat. Prod.* 85 (4), 1098-1108. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.1c01205>
- Zhang, Z., Kudo, T., Nakajima, Y., Wang, Y., 2001. Clarification of the relationship between the members of the family Thermomonosporaceae on the basis of 16S rDNA, 16S-23S rRNA internal transcribed spacer and 23S rDNA sequences and chemotaxonomic analyses. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 51 (2), 373-383. <https://doi.org/10.1099/00207713-51-2-373>
- Zhang, Z., Wang, J., Wang, J., Wang, J., Li, Y., 2020. Estimate of the sequenced proportion of the global prokaryotic genome. *Microbiome.* 8 (1), 134. <https://doi.org/10.1186/s40168-020-00903-z>

MATERIAL SUPLEMENTARIO

Tabla S1. Delimitación de las especies de las 12 actinobacterias por gen 16S RNAr, ANI y dDDH

Table S1. Species delimitation of the 12 actinobacteria by 16S rRNA, ANI and dDDH gene.

Muestra	Gen 16S RNAr			ANI			dDDH		
	Género	Especie	%	Género	Especie	%	Género	Especie	%
LOL-12	<i>Nocardiopsis</i>	<i>fildesensis</i> *	99.73%	<i>Nocardiopsis</i>	sp. CNT312	95.16	<i>Nocardiopsis</i>	sp. CNT312	61.30
LOL-11	<i>Actinomadura</i>	<i>cremea</i>	99.93%	<i>Actinomadura</i>	<i>cremea</i>	97.26	<i>Actinomadura</i>	<i>cremea</i>	76.70
LOL-16	<i>Actinomadura</i>	<i>cremea</i>	99.93%	<i>Actinomadura</i>	<i>cremea</i>	97.27	<i>Actinomadura</i>	<i>cremea</i>	76.60
LOL-24	<i>Micromonospora</i>	<i>phaseoli</i>	99.72%	<i>Micromonospora</i>	<i>phaseoli</i>	92.18	<i>Micromonospora</i>	<i>phaseoli</i>	46.90
LOL-25	<i>Micromonospora</i>	<i>citrea</i>	99.79%	<i>Micromonospora</i>	<i>echinofusca</i>	93.43	<i>Micromonospora</i>	<i>echinofusca</i>	50.50
LOL-13	<i>Micromonospora</i>	<i>spongicola</i> *	99.93%	<i>Micromonospora</i>	<i>pattaloongensis</i>	80.56	<i>Micromonospora</i>	<i>pattaloongensis</i>	21.60
LOL-14	<i>Micromonospora</i>	<i>spongicola</i> *	99.93%	<i>Micromonospora</i>	<i>pattaloongensis</i>	80.51	<i>Micromonospora</i>	<i>pattaloongensis</i>	21.60
LOL-15	<i>Micromonospora</i>	<i>spongicola</i> *	99.93%	<i>Micromonospora</i>	<i>pattaloongensis</i>	80.61	<i>Micromonospora</i>	<i>pattaloongensis</i>	21.60
LOL-21	<i>Micromonospora</i>	<i>spongicola</i> *	99.93%	<i>Micromonospora</i>	<i>halophytica</i>	80.52	<i>Micromonospora</i>	<i>halophytica</i>	21.50
LOL-23	<i>Micromonospora</i>	<i>spongicola</i> *	99.51%	<i>Micromonospora</i>	<i>deserti</i>	80.29	<i>Micromonospora</i>	<i>deserti</i>	21.80
LOL-27	<i>Micromonospora</i>	<i>spongicola</i> *	99.93%	<i>Micromonospora</i>	<i>pattaloongensis</i>	80.54	<i>Micromonospora</i>	<i>pattaloongensis</i>	21.60
LOL-28	<i>Micromonospora</i>	<i>spongicola</i> *	99.93%	<i>Micromonospora</i>	<i>pattaloongensis</i>	80.59	<i>Micromonospora</i>	<i>pattaloongensis</i>	21.70

*Secuencias de genomas completos que no se encuentran en las bases de datos. % = Porcentaje de similitud

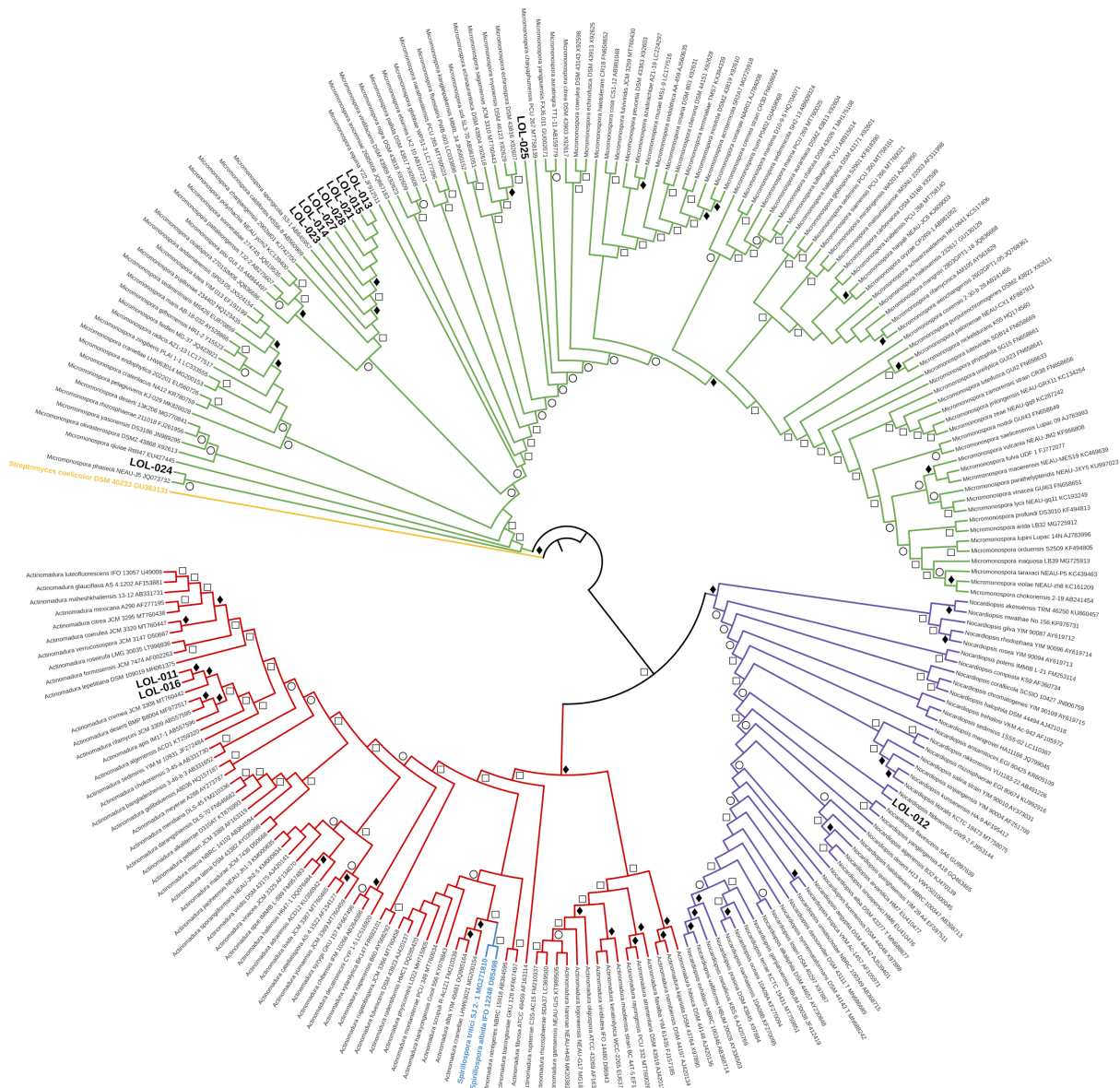


Fig. S2. Árbol filogenético de máxima verosimilitud basado en el análisis del 16S ARNr con 229 cepas tipo generado con 1000 iteraciones. Los rombos negros indican los valores de soporte de las ramas 100%, los cuadrados sin relleno indican valores de soporte de ramas de 80-99% y los círculos sin relleno indican valores de soporte de ramas de 50-79%. En color morado se muestran las bacterias del género *Nocardioopsis*, en color rojo las bacterias del género *Actinomadura* y en color azul las bacterias del género *Spirillospora*, en color verde las bacterias del género *Micromonospora* y en color amarillo se muestra el grupo externo *Streptomyces coelicolor*.

Fig. S2. Maximum likelihood phylogenetic tree based on 16S rRNA analysis with 229 type strains generated with 1000 iterations. Black diamonds indicate 100% branch support values, unfilled squares indicate branch support values of 80-99% and unfilled circles indicate branch support values of 50-79%. Bacteria of the genus *Nocardioopsis* are shown in purple, bacteria of the genus *Actinomadura* are shown in red, bacteria of the genus *Spirillospora* are shown in blue, bacteria of the genus *Micromonospora* are shown in green and the outgroup *Streptomyces coelicolor* is shown in yellow.