

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA



MAESTRÍA EN BIOTECNOLOGÍA

“Desarrollo de un sistema para el mejoramiento genético de *Streptomyces sp.*”

P R E S E N T A

I.B.I. Gerardo Santander Rodríguez

Director

Dr. Armando Mejía Álvarez

Asesor:

Dr. Javier Barrios González

Comité Tutorial

Director

Dr. Armando Mejía Álvarez

Departamento de Biotecnología

División de Ciencias Biológicas y de la Salud.

Universidad Autónoma Metropolitana – Iztapalapa

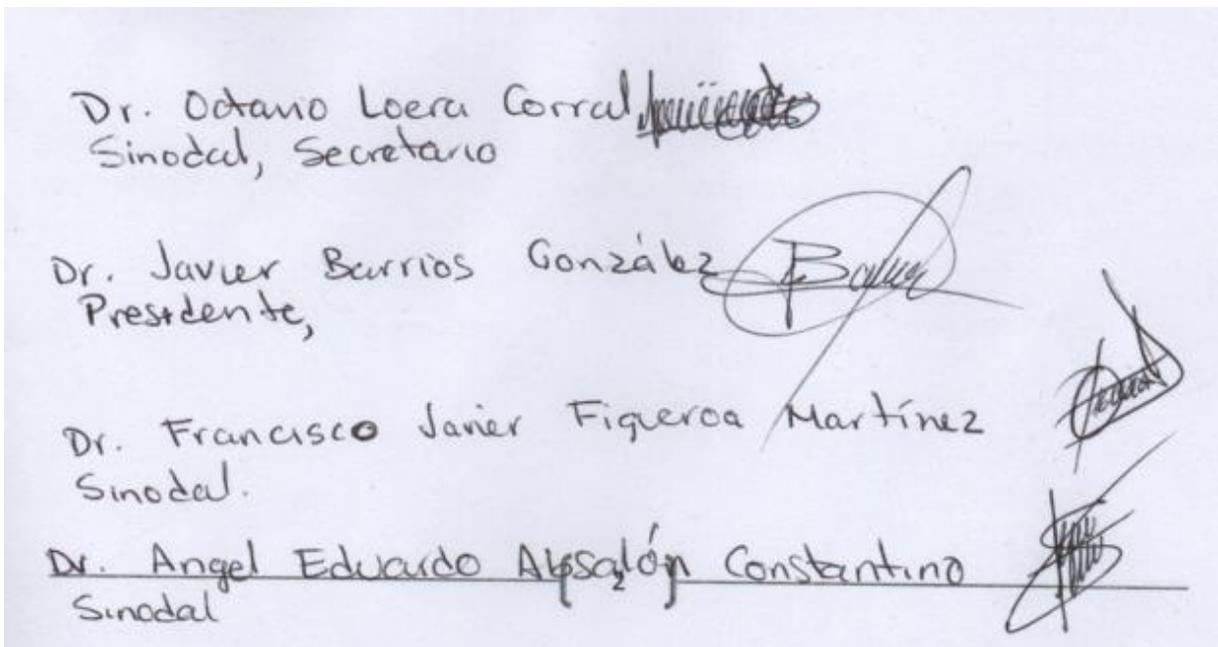
Asesor

Dr. Javier Barrios González

Departamento de Biotecnología

División de Ciencias Biológicas y de la Salud.

Universidad Autónoma Metropolitana - Iztapalapa



Dr. Octavio Loera Corral
Sinodal, Secretario

Dr. Javier Barrios González
Presidente,

Dr. Francisco Javier Figueroa Martínez
Sinodal.

Dr. Angel Eduardo Absalón Constantino
Sinodal

Los miembros del jurado designados por la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa, abajo firmantes, aprobaron la tesis titulada: “**Desarrollo de un sistema para el mejoramiento genético de *Streptomyces sp.***”, con fecha 5 de diciembre de 2017.

Agradecimientos

A *CONACyT* por el apoyo económico proporcionado durante la realización de este trabajo (No. de becario: 570213)

A la maestría en Biotecnología de la Universidad Autónoma Metropolitana que está incluida en el programa Nacional de Posgrados de calidad (PNCP) del *CONACyT*, con número de referencia 001465.

Al laboratorio Divisional de Biología Molecular de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud en la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa, por la secuencia del fragmento de ADN solicitado.

Al Dr. Barrios por sus consejos y guía.

A Armando por su apoyo incondicional, consejos y guía en toda mi formación como científico.

A mis compañeros del laboratorio de Ingeniería Genética y Metabolitos Secundarios, al W-104 que me acogieron en tiempos difíciles, a mis compañeros y amigos del grupo de actinomicetos, Fernanda, Omar, Marisol, Diana, Jessica, a mis queridas alumnas de servicio social Araceli y Diana, gracias por todo el apoyo y con buenos consejos.

A mis amigos Eduardo, Pablo, Paulina, Julio, Christian, Luisa, Victor, Kenia, Dany, Mafer, Angie y Ruben, gracias por los buenos momentos y apoyo.

Dedicatorias.

A mi mamá, papá, Paty, Luis y Eni por todo el apoyo que me han dado durante toda mi vida, gracias por todo lo que han hecho por mí, son el motor que me hace seguir superándome, los amo con todo mi ser.

A Yeny... Por todo... Te amo...

“Unfortunately, the number of ways to do something wrong
always exceeds the number of way to do right.”

Garry Kasparov

Contenido

Comité Tutorial.....	2
Agradecimientos.....	4
Dedicatorias.....	5
Índice de Figuras.....	9
Índice de Tabla.....	10
Resumen.....	12
Introducción.....	13
Antibióticos.....	13
Antibióticos que interfieren en la biosíntesis de la pared celular.....	15
Antibióticos que interfieren en la replicación y reparación del ADN.....	15
Antibióticos que alteran la síntesis proteica.....	16
Streptomyces.....	16
Mejoramiento de cepas.....	17
Estrategia de Mejoramiento de cepas.....	17
Luz Ultravioleta.....	18
Genome shuffling.....	19
Antecedentes.....	20
Justificación.....	21
Hipótesis.....	21
Objetivo.....	22
Objetivos Específicos.....	22
Material y Métodos.....	23
Medios de cultivo y buffers.....	23
Cepa, Conservación y Propagación.....	26
Cuantificación de UFC/mL.....	27
Identificación de la cepa.....	27
Extracción de ADN genómico.....	27
Amplificación y Secuenciación de ARNr 16S.....	28
Concentración mínima inhibitoria (CMI).....	29

Cinética de producción	29
Cuantificación de biomasa	29
Extracción del Antimicrobiano	30
Cuantificación por bioensayos de actividad antimicrobiana.	30
Mutagénesis de la cepa parental	31
Curva de supervivencia	32
Selección y aislamiento de mutantes resistentes a los elementos de selección	32
Selección de Mutantes hiperproductoras.	33
Selección primaria (Selección en caja)	33
Selección Secundaria (Microfermentaciones)	34
Selección Terciaria (Fermentación en matraz)	34
Formación de protoplastos	35
Genome Shuffling y fusión de Protoplastos	36
Selección de cepas hiperproductoras fusionantes.....	37
Selección primaria y selección secundaria.....	37
Resultados y Discusión	38
Identificación de la cepa	38
Curva de supervivencia	39
Selección de Mutantes resistentes y Concentración Mínima Inhibitoria (CMI)	41
Selección Primaria	44
Selección Secundaria	48
Selección Terciaria de Mutantes sobreproductores de agente antimicrobiano.....	49
Genome Shuffling y fusión de protoplastos.	55
Selección Primaria de Fusionantes	55
Selección Secundaria de Fusionantes.....	56
Conclusiones.....	60
Referencias	61
Anexos	65
Curva Patrón Para la cuantificación de Actividad antimicrobiana	65
Electroferograma de ARNr 16S.....	65

Selección Primaria	67
Gentamicina	67
Kanamicina.....	67
Higromicina.....	68
Ampicilina.....	68
Cinética de producción de agente antimicrobiano de la cepa parental en microfermentación	68
Producción Especifica de mutantes	69
Selección Primaria fusionantes	69

Índice de Figuras

Figura 1. Descubrimiento de importantes antibióticos y otros productos naturales a través de los años, marcando en negritas a los productos de actinomicetos y en letra itálica los productos de hongos (Hopwood, 2007).	14
Figura 2. Lesiones en el ADN producidas por UV (Carrasco-Ríos, 2009).	18
Figura 3 Sistema de mutación para esporas de la cepa parental,.....	31
Figura 4 se muestra la forma en que se inocularon las cepas resultantes de la mutagénesis, donde; UV es el agente mutagénico al que se expuso la cepa parental, x es el fenotipo, n el número asignado de la mutante.	33
Figura 5 Muestra del sistema para las microfermentaciones.....	34
Figura 6 Filtro de algodón para suspensión de protoplastos (Kieser, 2000).	36
Figura 7. a) Gel de electroforesis donde se muestra el ADN genómico, b) Gel de electroforesis donde se observa el amplicon de ARNr.....	38
Figura 8 Comparación de la secuencia problema y la de la base de datos de NCBI	40
Figura 9 Curva de supervivencia	41
Figura 10 Mutantes Resistentes, a) Kanamicina, b) Higromicina, c) Gentamicina, d) Ampicilina.	42
Figura 11 Producción de agente antimicrobiano en microfermentación de las cepas mutantes, 15mL medio de producción en frascos de vidrio de 30mL, 200rpm, 30°C.....	48
Figura 12 Cinética de producción de un agente antimicrobiano de las cepas UVg, 100mL de medio de producción en matraces tridentados de 250mL, 200rpm, 30°C.....	50
Figura 13 Cinética de producción de un agente antimicrobiano de las cepas UVk, 100mL de medio de producción en matraces tridentados de 250mL, 200rpm, 30°C.....	50

Figura 14 Cinética de Producción de un agente antimicrobiano para las cepas UVh, 100mL de medio de producción en matraces tridentados de 250mL, 200rpm, 30°C.....	51
Figura 15 Cinética de producción de un agente antimicrobiano de las cepas UVa, 100mL de medio de producción en matraces tridentados de 250mL, 200rpm, 30°C.....	52
Figura 16 Cinética de producción de antibiótico de las mejores cepas de cada uno de los fenotipos deseados contra la cepa parental, 100mL de medio de producción en matraces tridentados de 250mL, 200rpm, 30°C	53
Figura 17 Cinética de cepas fusionantes, 100mL de medio de producción en matraces tridentados de 250mL, 200rpm, 30°C	57

Índice de Tabla

Tabla 1 Medio SFM (Hobbs, Frazer, Gardner, Cullum, & Oliver, 1989)	23
Tabla 2 Medio Phage agar (Roldán-Tapia, 2011)	23
Tabla 3 Medio Phage (Roldán-Tapia, 2011)	23
Tabla 4 Buffer TE (Kieser, 2000)	24
Tabla 5 Buffer CTAB (Worden,2009)	24
Tabla 6 Medio GB1 (Escalante, Gonzalez, Obregon, & Sanchez, 1991)	24
Tabla 7 Medio semilla (Himabindu, Potumarthi, & Jetty, 2007).....	24
Tabla 8 Medio de Producción (Himabindu, Ravichandra, Vishalakshi, & Jetty, 2006).....	25
Tabla 9 Medio LB-Agar Suave (Roldán-Tapia, 2011)	25
Tabla 10 Medio S (Okanishi, Suzuki, & Umezawa, 1974)	25
Tabla 11 Solución P (Okanishi, Suzuki, & Umezawa, 1974).....	25
Tabla 12 Solución de Elementos Traza	26
Tabla 13 Medio Completo de Regeneración (Pigac, Hranueli, Smokvina, & Alačević, 1982)	26
Tabla 14 Todas las combinaciones posibles de los fenotipos buscados, donde; a, k, g y h significan ampicilina, kanamicina, gentamicina e higromicina respectivamente.	37
Tabla 16 CMI de la cepa parental, Numero de mutantes y nombre asignado.	42
Tabla 17 Selección primaria para la resistencia de gentamicina, se muestran los diferentes valores de CoefHalo para las cepas con marcador antes nombrado, el experimento se llevó a cabo en cajas de Petri con 30mL de medio GB1, 10 días de incubación, 30°C.	44
Tabla 18 Selección primaria para la resistencia de kanamicina, se muestran los diferentes valores de CoefHalo para las cepas con marcador antes nombrado, el experimento se llevó a cabo en cajas de Petri con 30mL de medio GB1, 10 días de incubación, 30°C.	45
Tabla 19 Selección primaria para la resistencia de higromicina, se muestran los diferentes valores de CoefHalo para las cepas con marcador antes nombrado, el experimento se llevó a cabo en cajas de Petri con 30mL de medio GB1, 10 días de incubación, 30°C.	46

Tabla 20 Selección primaria para la resistencia de ampicilina, se muestran los diferentes valores de CoefHalo para las cepas con marcador antes nombrado, el experimento se llevó a cabo en cajas de Petri con 30mL de medio GB1, 10 días de incubación, 30°C.	47
Tabla 21. Producción específica de cada uno de las cepas probadas, 100mL de medio de producción en matraces tridentados de 250mL, 200rpm, 30°C.	54
Tabla 22 Selección primaria de fusionantes, se muestran los diferentes valores de, el experimento se llevó a cabo en cajas de Petri con 30mL de medio GB1, 10 días de incubación, 30°C.	56
Tabla 23 Producción específica de las cepas fusionantes, 100mL de medio de producción en matraces tridentados de 250mL, 200rpm, 30°C.	58

Resumen

Las bacterias del género *Streptomyces* tienen gran importancia en la industria biotecnológica, ya que, son productoras de más del 50% de los compuestos antimicrobianos descubiertos, es por esto que se vuelve un organismo muy atractivo para el mejoramiento genético, es decir, búsqueda de estrategias que aseguren el aumento de los rendimientos de producción de antibióticos. En este trabajo se propone una estrategia que va desde la la identificación de la cepa hasta el mejoramiento basado en la mutagénesis inducida, selección racional y *genome shuffling*. Mediante la secuenciación de un fragmento de ARNr 16S se logró identificar a un microorganismo del genero *Streptomyces* capaz de producir una molécula antimicrobiana (8.5µg/mg). Mediante mutagénesis inducida con luz ultravioleta y selección racional, utilizando diversas concentraciones de kanamicina (20µg/mL), gentamicina (12µg/mL), higromicina (26µg/mL) y ampicilina (250µg/mL) como elementos de selección, se logró aislar mutantes hiperproductoras las cuales fueron UVk18 que tiene una producción específica de 229µg/mg, UVa14 231µg/mg, UVh6 217µg/mg y UVg1 210µg/mg. Estas cepas se utilizaron para una ronda de *genome shuffling* y se logró obtener una cepa con las cuatro características mezcladas (GS1) capaz de sintetizar 859µg/mg que representa un aumento de 3.71 veces mayor que la cepa mutante de mayor producción (UVa14), lo que se traduce un incremento del 100 veces más con respecto de la cepa de origen.

Introducción

Antibióticos

Los antibióticos han contribuido decisivamente tanto al aumento de la esperanza de vida de la población como a la mejora de la calidad de vida de las sociedades. Los antibióticos han sido, como probablemente ningún otro grupo de medicamentos una fuente de bienestar, pero, el uso y abuso de los mismos han traído consigo importantes problemas sanitarios y medioambientales, a la cabeza de los cuales hay que situar la aparición y desarrollo de las resistencias bacterianas. El impacto de esta aparición de resistencia a terapias con medicamentos en humanos ha generado el desuso de los antibióticos redirigiendo así su aplicación al uso veterinario y/o agrícola (Peralta, 2013).

De los antibióticos que se han descubierto, el porcentaje utilizado en medicina y/o veterinaria es del 1% y menos del 0.1% se han usado para el control de enfermedades en plantas. La eficacia de algunos se ha modificado químicamente en el laboratorio, obteniendo así antibióticos semisintéticos que modifican su modo de acción favoreciendo su actividad en contra de su microorganismo diana (Peralta, 2013).

El término “antibiótico” fue acuñado en 1889 por el biólogo francés P. Vuillemin, pero fue aplicado de una manera muy general para describir la destrucción de un organismo, no necesariamente un microorganismo, por otro. Selman Waksman sugirió usar esta palabra para distinguir los inhibidores producidos naturalmente de los compuestos sintéticos que se habían utilizado desde mucho tiempo. La definición de Waksman para los antibióticos fue, “sustancias químicas que son producidas por microorganismo y que tienen la capacidad, en una solución diluida, de inhibir el crecimiento o incluso destruir otro microorganismo”. Esta definición, que hace referencia a los antibióticos naturales como la penicilina, se amplió para incluir moléculas con actividad similar obtenidas por síntesis química como las sulfamidas, o semisintéticas como la ampicilina. Al descubrimiento de la penicilina por Alexander Fleming en 1929, le siguió el descubrimiento y uso clínico de las sulfonamidas en la década de los 30. Durante la década de los 40 los antibióticos lactámicos

revolucionaron la medicina, y se convirtieron en el factor más importante para aumentar la esperanza de vida en la población mundial. Las compañías farmacéuticas habían asumido el desafío de desarrollar métodos eficientes para fabricar penicilina y estreptomicina en la década de 1940, pero al principio no estaban buscando nuevos antibióticos. Todo esto cambió en la última parte de la década, ya que casi todas las grandes compañías estadounidenses comenzaron sus propios programas de detección de nuevos compuestos antimicrobianos. También lo hicieron empresas de otros países, así como grupos académicos, especialmente en Japón. A través de toda esta actividad, se identificaron muchos antibióticos nuevos en los siguientes 20 años, desde finales de la década de 1940 hasta fines de la década de 1960, principalmente a partir de los actinomicetos. Bastantes de los compuestos se convirtieron en medicamentos exitosos que hicieron que la industria farmacéutica floreciera. La tasa de descubrimiento de antibióticos disminuyó bruscamente, por lo que estos años productivos se les conocieron como la Edad de Oro (Figura 1). Su legado fue una revolución en el tratamiento de enfermedades infecciosas. La mayoría de los patógenos bacterianos se controlaron, pero la proliferación del uso de antibióticos también condujo a un aumento dramático en la resistencia bacteriana a los antibióticos (Hoopwod, 2007).

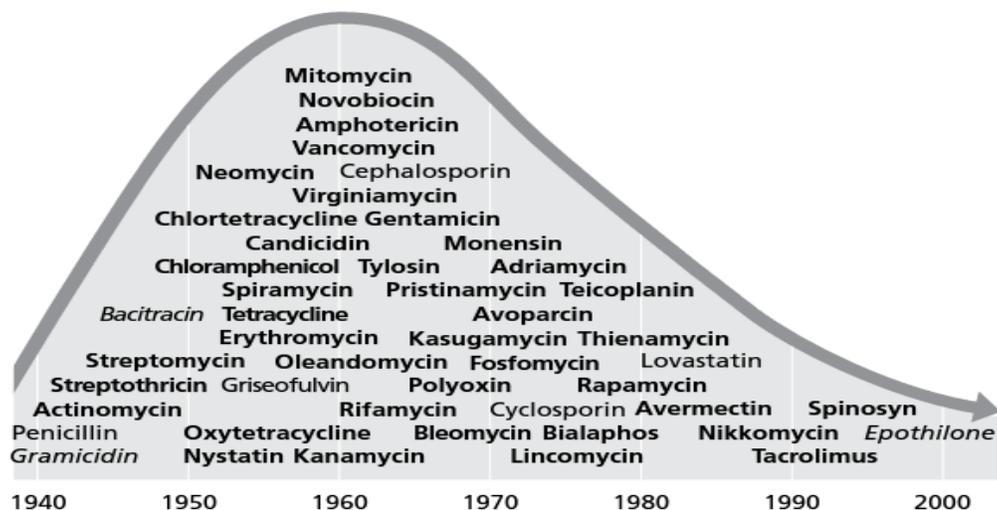


Figura 1. Descubrimiento de importantes antibióticos y otros productos naturales a través de los años, marcando en negritas a los productos de actinomicetos y en letra itálica los productos de hongos (Hopwood, 2007).

Los antibióticos pueden actuar matando a las bacterias (bactericidas), o inhibiendo su crecimiento y multiplicación (bacteriostáticos); se les consideró “fármacos milagrosos”, ya que eliminaban las bacterias sin ocasionar un daño excesivo a las células eucariotas del individuo tratado (Latorre, 2008). Los antibióticos se clasifican habitualmente según su diana y su mecanismo de acción, dividiéndose en tres grandes grupos (Walsh, 2000):

- I. Aquellos que interfieren en la biosíntesis de la pared celular.
- II. Los que alteran la síntesis proteica bacteriana.
- III. Los que Impiden la replicación y reparación del ADN bacteriano

Antibióticos que interfieren en la biosíntesis de la pared celular

La pared celular proporciona a la envoltura bacteriana la rigidez, además de conferir a la bacteria su forma característica. Está compuesta por una serie de polisacáridos y de polipéptidos que forman el peptidoglicano o mureína. Debido a la importancia de la pared celular para la viabilidad de la bacteria y a que no existe una estructura homóloga en células eucariotas, los antibióticos que desestabilizan su integridad se han utilizado en la clínica durante décadas. Entre ellos destacan los β -lactámicos: penicilinas y cefalosporinas, cuya diana de acción es un enzima con actividad transpeptidasa que se encarga de alargar la cadena de peptidoglicano. Como resultado de la acción del antibiótico, la capa de peptidoglicano se vuelve más débil y susceptible a lisis frente a cambios de la presión osmótica. Además de las penicilinas y cefalosporinas, la vancomicina (perteneciente al grupo de los antibióticos de tipo glicopeptídico) actúa sobre la pared celular secuestrando los péptidos que ejercen como sustratos de enzimas transpeptidasas y transglicosilasas, por lo que el ensamblaje del peptidoglicano es defectuoso (Latorre, 2008).

Antibióticos que interfieren en la replicación y reparación del ADN

Las fluoroquinolonas son antibióticos sintéticos cuya diana de acción es la ADN-girasa. Este enzima es una topoisomerasa de tipo II que actúa durante la replicación

del ADN para reducir la tensión molecular causada por el superenrollamiento. La ADN-girasa produce cortes en la doble cadena y después los une. La acción de este tipo de antibióticos impide que el enzima vuelva a ligar las cadenas de ADN cortadas, acumulándose cortes en el ADN y dando lugar a la muerte celular (Walsh, 2000)

Antibióticos que alteran la síntesis proteica.

La maquinaria traduccional procariota es la diana de la mayoría de antibióticos. Probablemente esto sea debido a la complejidad del ribosoma, que lo hace vulnerable en muchos aspectos, además de ser lo suficientemente distinto de su análogo eucariota. Los antibióticos que actúan a este nivel son los macrólidos, las tetraciclinas y los aminoglicósidos. Los macrólidos estimulan la disociación del peptidil-ARNt del ribosoma durante la translocación, por lo que la cadena polipeptídica naciente deja de elongarse prematuramente, las tetraciclinas se unen a la subunidad 30S del ribosoma bacteriano bloqueando la fijación del aminoacilARNt al sitio aceptor del complejo formado por el ARNm y la subunidad 50S del ribosoma, mientras que la unión de los aminoglicósidos al ribosoma provoca la incorporación de aminoácidos incorrectos en la cadena polipeptídica naciente, dando lugar a proteínas erróneas que se acumulan en la célula, induciendo la muerte de la bacteria (Latorre, 2008).

Streptomyces

El género *Streptomyces* pertenece al orden de los actinomicetos, es una bacteria Gram-positivo con alta cantidad de G+C, además de que se caracteriza por un crecimiento micelial y formación de esporas al final de sus hifas. Los actinomicetos producen las dos terceras partes de los antibióticos que se conocen que son producidos por organismos (Kieser, 2000). El género *Streptomyces* se ha convertido en el grupo más importante de microorganismos industriales ya que es el productor de la mayoría de los antibióticos utilizados en el campo clínico y la agricultura, es decir, producen el 80% del total de moléculas con actividad biológica de los actinomicetos (Hobbs, Frazer, Gardner, Cullum, & Oliver, 1989); gracias a su gran potencial como

productor de moléculas con actividad antimicrobiana es un microorganismo idóneo para el mejoramiento genético.

Mejoramiento de cepas

En general, los organismos aislados de la naturaleza que producen metabolitos de interés industrial lo hacen en niveles muy bajos, por lo tanto, se hace necesario aplicar una estrategia de mejoramiento de cepas, para incrementar la eficiencia de producción del metabolito deseado, y así lograr mayor rentabilidad de los procesos (Hernández, 2003).

Estrategia de Mejoramiento de cepas

Dentro de las estrategias para el mejoramiento de cepas se encuentra la mutación inducida, el cual requiere del empleo de un agente mutagénico determinado. Este proceso implica dos etapas, el tratamiento de la población con el mutágeno elegido y luego el aislamiento de los mutantes para su posterior ensayo y selección. La elección del agente mutagénico depende en general de consideraciones prácticas. Los agentes mutagénicos pueden ser agrupados en: (Flickinger, 1999)

1. Físicos, como la luz UV que es un mutágeno muy conveniente. La longitud de onda puede variar de 200 a 300 nm, y el tiempo de exposición puede variar entre 0.5 y 20 min; dependiendo de la sensibilidad del organismo se obtiene una tasa de muerte entre 90 y 99.9%.
2. Químicos, estos agentes se emplean en concentraciones del orden de 0.05 M con exposiciones de 0.5 a 12 h. Este mutágeno requiere de personal con experiencia debido a lo peligroso de su manejo.

El método de mutagénesis por radiación UV ha sido ampliamente usado a lo largo de los años ya que no requiere de una gran experiencia en el método, así como el que no se requiere de una infraestructura demasiado amplia (Barrios-González, Fernández, & Tomasini, 2003).

Ahora bien, después de la mutagénesis se debe aplicar una estrategia eficiente para la selección de microorganismos mejorados a la que se le llama selección racional. Este proceso se realiza por medio de la búsqueda de características genóticas deseables, diferentes del interés final (sobreproducción del metabolito). El diseño de este método se logra conociendo a priori el metabolismo y la regulación del metabolito de interés, y con este conocimiento se puede usar condiciones ambientales, la adición de un agente tóxico o el producto de interés como elemento de selección (Barrios-González, Fernández, & Tomasini, 2003).

Luz Ultravioleta

El ADN es particularmente sensible a radiación UV, debido a que los fotones del tipo ultravioleta promueven transiciones $\pi\text{-}\pi^*$ en las bases nitrogenadas que constituyen los nucleótidos alterando directamente el establecimiento normal de enlaces químicos. La fototransformación producida en el ADN afecta principalmente a bases de timina adyacentes, las que por efecto de la radiación UV forman estructuras cíclicas denominados dímeros de pirimidinas ciclobutano (CDPs) (Figura 4) (Carrasco-Ríos, 2009).

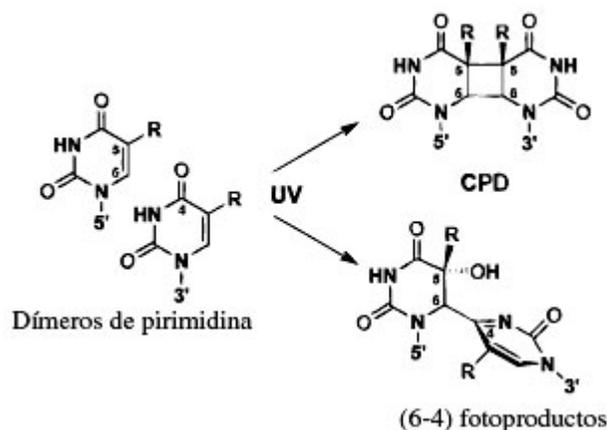


Figura 2. Lesiones en el ADN producidas por UV (Carrasco-Ríos, 2009).

Bajo condiciones de radiación UV no solo se observan lesiones en el ADN del tipo CDPs, también esta radiación induce la formación de otros fotoproductos denominados

dímeros de pirimidina pirimidona (6-4 PPs) entre bases adyacentes de timina y citosina, y en caso del ARN, dímeros de uracilo (Carrasco-Ríos, 2009)

Estos tipos de lesiones alteran los procesos de transcripción de genes y la replicación del ADN, debido a que tanto la ADN polimerasa como la ARN polimerasa no son capaces de leer la hebra de ADN a través de estos fotoproductos. Por tal motivo, la eliminación de los CPDs y 6-4 PPs resulta esencial para la supervivencia de las distintas especies afectadas por este daño. Esto se logra por medio de mecanismos de fotoreactivación y la reparación por escisión de base y/o nucleótidos (Carrasco-Ríos, 2009)

Genome shuffling

La técnica de mutagénesis aleatoria y su posterior selección es un proceso asexual, los microorganismos prometedores usualmente sirven para hacer bibliotecas de mutantes aleatorios y la selección permite seleccionar cepas individuales con una mejora en las características fenotípicas deseadas. Sin embargo, este método es un proceso laborioso y consume mucho tiempo, lo cual es su principal desventaja (Gong, Zheng, Wu, Chen, & Zhao, 2009); por este motivo, se han buscado nuevas estrategias para el mejoramiento de cepas, las cuales dependen de la recombinación, cómo la estrategia de *Genome Shuffling*.

Genome shuffling puede acelerar directamente la evolución ya que facilita la recombinación de los miembros de una población diversa seleccionada (Biot-Pelletier & Martin, 2014). *Genome Shuffling* es similar a la mejora clásica de cruce de cepas en cuanto al ciclo de diversificación genómica y selección de cepas mejoradas. La principal diferencia entre estas dos técnicas es que *genome shuffling* es un proceso asexual, y además toma las ventajas de la cruce multiparental (Leja, Myszka, & Czaczyk, 2011). Se basa en la fusión de protoplastos, además de ser una técnica análoga a *DNA shuffling*, por esto hay una alta frecuencia de transferencia de genes y recombinación, esto gracias a la fusión completa de genomas de protoplastos. Los cambios simultáneos en diferentes posiciones a lo largo de todo el genoma (Petri &

Schmidt-Dannert, 2004), Genome Shuffling es bastante rentable; su aplicación no requiere ninguna instalación costosa, puede ser empleado fácilmente en la mayoría de los laboratorios, además de que las cepas mezcladas obtenidas no son consideradas como organismos genéticamente modificados (Leja et al., 2011), por lo que *genome shuffling* es una buena manera de mejorar cepas industrialmente importantes.

Antecedentes

Choi y colaboradores en el 2005 utilizaron la técnica de fusión de protoplastos y lograron obtener una cepa de *Micromonospora echinospora* (MP3-143) que logró producir 5.6 veces más gentamicina que la cepa parental. En primer lugar, se irradió la cepa parental con UV como agente mutágeno, posteriormente hizo una selección utilizando cloranfenicol y esteptomicina, haciendo un gradiente de concentraciones con estos dos antibióticos, y finalmente realizaron la fusión de protoplastos de las dos cepas que se consiguieron después del tamiz de selección, encontrando con esto la cepa hiperproductora de gentamicina. (Choi, 2005)

En el 2007 Himadindu, et al. consiguieron 2 cepas hiperproductoras (EtBr-22 y MNNG-19) de gentamicina, utilizando agentes mutagénicos químicos (bromuro de etidio y 1-methyl-3-nitro-1-nitrosoguanidine), que lograron producir 147 y 154% más que la cepa parental; sin embargo, estas cepas no conservaban las características que obtuvieron después de la mutagénesis. Utilizaron kanamicina y penicilina como elementos de selección, consiguiendo demostrar que las cepas aisladas con penicilina producían más gentamicina que las aisladas con kanamicina. Además, que probaron diferentes formas de estrés no nutricional aplicados durante la fermentación para observar sus efectos en la producción de gentamicina, incluyendo choques térmicos con baños de agua caliente con microondas, choques osmóticos con NaCl y estrés con etanol, y demostraron que el choque térmico con microondas es la mejor opción para producir mayores cantidades de gentamicina.

Justificación

Las técnicas actuales de mejoramiento se basan en uso de herramientas moleculares, es decir, en modificaciones muy específicas de los microorganismos productores de algún metabolito de interés, sin embargo, estas técnicas pueden mostrar un nulo cambio en las eficiencias de producción, además de que para aplicarlas se requiere de un conocimiento amplio del microorganismo, así como una infraestructura y materiales muy específicos, lo que se traduce en un gran costo para el grupo que decida aplicarla. Es por esto que se siguen utilizando técnicas de mejoramiento clásicas que no requieren de gran conocimiento técnico ni una gran infraestructura, a pesar de ello, estas tácticas han demostrado que se requiere un arduo trabajo con incrementos de producción relativamente lento. Es por esto que nuevas estrategias de mejoramiento, como *Genome shuffling*, que han demostrado acelerar la evolución de cepas hiperproductoras hacia un fenotipo deseable, se hacen atractivas desde un punto de vista metodológico, así como técnico.

Hipótesis

“El incremento obtenido en el nivel de producción de un *actinomiceto mejorado* mediante *Genome Shuffling* es diferente a la suma de los incrementos de las cepas mutadas individuales, usadas para este proceso”

Objetivo

Comparar la mutagénesis convencional con la combinación de las técnicas de selección racional y *Genome Shuffling* para la obtención de cepas con características fenotípicas deseadas las cuales son resistencia a antibióticos de selección y una mayor producción con respecto de la cepa parental.

Objetivos Específicos

- Obtener mutantes mejoradas por mutación con luz UV
- Aislar a cepas mutantes con características fenotípicas deseadas por medio de selección racional.
- Realizar la técnica de *Genome Shuffling* con las mutantes con características fenotípicas deseadas.
- Análisis de la producción de del metabolito de interés de las cepas aisladas

Material y Métodos

Medios de cultivo y buffers

Tabla 1 Medio SFM (Hobbs, Frazer, Gardner, Cullum, & Oliver, 1989)

Manitol	20g
Harina de Soya	20g
Agar	20g
Agua destilada c.b.p.	1000mL

Tabla 2 Medio Phage agar (Roldán-Tapía, 2011)

Glucosa	10g
Triptona	5g
Extracto de levadura	5g
Lab Lemco Powder	5g
MgSO ₄ • 7H ₂ O	0.5g
CaCl ₂ • 2H ₂ O	0.74g
Agar	15g
Agua Destilada c.b.p.	1000L
pH	7.2

Tabla 3 Medio Phage (Roldán-Tapía, 2011)

Glucosa	10g
Triptona	5g
Extracto de levadura	5g
Lab Lemco Powder	5g
MgSO ₄ • 7H ₂ O	0.5g
CaCl ₂ • 2H ₂ O	0.74g
Agua Destilada c.b.p.	1000L
pH	7.2

Tabla 4 Buffer TE (Kieser, 2000)

Tris-HCl	10mM (pH 8)
EDTA	1mM (pH 8)

Tabla 5 Buffer CTAB (Worden,2009)

CTAB (bromuro de hexadeciltrimetilamonio)	2%
Tris-HCl	100mM (pH 8)
EDTA	20mM (pH 8)
NaCl	1.4M
β -mercaptoetanol	0.2%
Proteinasa K	1mg/ml

Tabla 6 Medio GB1 (Escalante, Gonzalez, Obregon, & Sanchez, 1991)

Extracto de Carne	30g
Triptona	50g
Glucosa	10g
Almidón Soluble de papa	240g
Extracto de Levadura	50g
CaCO ₃	10g
Agar	15g
Agua Destilada c.b.p.	1000mL

Tabla 7 Medio semilla (Himabindu, Potumarthi, & Jetty, 2007)

Extracto de Carne	30g
Triptona	50g
Glucosa	10g
Almidón Soluble de papa	240g
Extracto de Levadura	50g
CaCO ₃	10g
Agua Destilada c.b.p.	1000mL

Tabla 8 Medio de Producción (Himabindu, Ravichandra, Vishalakshi, & Jetty, 2006)

Almidón Soluble de papa	9g
Harina de Soya	3g
K ₂ HPO ₄	0.9g
CoCl ₂	0.01g
Agua Destilada c.b.p.	1000mL

Tabla 9 Medio LB-Agar Suave (Roldán-Tapia, 2011)

NaCl	5g
Triptona	10g
Extracto de Carne	5g
Agar	10g
Agua Destilada c.b.p.	1000mL

Tabla 10 Medio S (Okanishi, Suzuki, & Umezawa, 1974)

Glucosa	10g
Peptona	4g
Extracto de levadura	4g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.5g
KH ₂ PO ₄	2g
K ₂ HPO	2g
Agua destilada c.b.p.	1000mL

Tabla 11 Solución P (Okanishi, Suzuki, & Umezawa, 1974)

Sacarosa	103g
K ₂ SO ₄	0.25g
Solución de elementos traza	200µL
KH ₂ PO ₄	0.05mL
MgCl ₂ ·6H ₂ O	2.03g
CaCl ₂ ·7H ₂ O*	3.68mL
Buffer TES (0.25M, pH7.2)	100mL
Agua destilada c.b.p.	1000mL

Tabla 12 Solución de Elementos Traza

ZnCl ₂	40mg
FeCl ₃ ·6H ₂ O	200mg
CuCl ₂ ·2H ₂ O	10mg
MnCl ₂ ·4H ₂ O	10mg
Na ₂ B ₄ O ₇ ·10H ₂ O	10mg
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ ·4H ₂ O	10mg
Agua destilada c.b.p.	100mL

Tabla 13 Medio Completo de Regeneración (Pigac, Hranueli, Smokvina, & Alačević, 1982)

Sacarosa	10g
Caldo de Soya tripticaseína	4g
Extracto de levadura	4g
MgCl ₂ ·6H ₂ O	0.5g
CaCl ₂ ·2H ₂ O	2g
Agar	0.6%
Agua destilada c.b.p.	1000mL

Cepa, Conservación y Propagación

Se partió de una suspensión de esporas de un actinomiceto donada por la empresa Química Agronómica de México, S. de R.L. M.I., con residencia en el estado de Chihuahua, México.

Como método de conservación se eligió la congelación a -20°C, Como elemento crioprotector se usó glicerol al 40%, lo que le da una vida media de almacenaje de 1 a 2 años.

Para la propagación de la cepa se utilizó el medio SFM (Tabla 1), se inocularon 50µL de la suspensión de esporas inicial y se dejó alrededor de dos semanas a 30°C, posteriormente se recolectaron las esporas de la caja con 2mL de Tween 80 (0.1%) y 2mL de glicerol (80%), por raspado del cultivo superficial con asa bacteriológica estéril (Kieser, 2000).

Cuantificación de UFC/mL

Se llevó a cabo utilizando el método de cuenta en placa (Aquiahuatl, 2012), se realizaron diluciones secuenciales, en tubos eppendorf, de la suspensión de esporas cosechadas, se ejecutó una posterior inoculación de éstas en caja de Petri en medio Phage agar (Tabla 2). Pasadas 48 horas de incubación a 30°C se contaron las colonias de las diluciones que tenían entre 30 y 300, con esto se logró estimar la concentración de esporas viables por mililitro de suspensión por medio de la siguiente ecuación:

$$UFC/mL = \frac{(No. de colonias contadas) (Dilución)}{mL de suspensión inoculado}$$

Identificación de la cepa

Extracción de ADN genómico

Alrededor de 1×10^7 UFC fueron inoculadas en matraces tridentados de 250mL con 50mL de medio phage (Tabla 3), estas se incubaron a 30°C con agitación de 200rpm durante 36 horas, el ADN genómico se extrajo utilizando 5 ml de este cultivo.

5mL del cultivo del actinomiceto se centrifugaron a 16,000g durante dos minutos, se descartó el sobrenadante, el pellet se resuspendió en 500 μ L de buffer TE (Tabla 4) al que se le adicionaron 15 μ L de lisozima (100mg/mL en agua, Sigma-Aldrich), y se incubó a 37°C durante 2 horas. Pasado el tiempo se volvió a centrifugar bajo las mismas condiciones, se recuperó el paquete celular y se resuspendió en 800 μ L de buffer CTAB (Tabla 5) y se incubó durante una hora a 65°C. Después de la incubación, se dividió la mezcla en dos, se le agregaron 800 μ L de solución cloroformo-isoamílico (24:1) y se mezcló gentilmente. Se centrifugó a 21,000g durante 10 minutos a 4°C, se recuperó la fase acuosa, y se eliminó el ARN adicionando 1 μ L de RNAsa (10mg/mL en buffer TE) e incubando a 37°C durante 30 minutos.

Pasado el periodo el ADN se precipitó adicionando a a la fase acuosa recuperada 800µL de isopropanol, seguido de una incubación de 2 horas a a temperatura ambiente, y centrifugación por 15 minutos a 4°C a 21000g. El ADN se lavó con etanol al 70% (21000g durante 15 minutos a 4°C), y se secó a temperatura ambiente durante 2 horas. El ADN se resuspendió en 50µL de agua destilada libre de nucleasas. Una vez obtenida la muestra, 1µL de la muestra se mezcló con buffer de carga y Gelgreen (biotium), posteriormente se realizó una electroforesis con gel de agarosa (1.5%) a 90V, en buffer TAE, durante 1 hora. El gel se reveló en un fotodocumentador (Gel Doc EZ, Biorad).

Amplificación y Secuenciación de ARNr 16S

La amplificación del gen para la identificación del microorganismo que muestra actividad antimicrobiana se llevó a cabo utilizando cebadores específicos para actinomicetos (Rainey, Ward-Rainey, Kroppenstedt, & Stackebrandt, 1996), usando como forward el oligonucleótido 27f (5'-GAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') y reverse el oligonucleótido 907r (5'-CCGTCAATTCATTTGAGTTT-3'), con esto se espera un amplicón de aproximadamente 900pb.

Para realizar la PCR se ocupó 12.5µL de PCR MasterMix (Promega), 3µL de ADN genómico (250ng), 1µL de primer 27f y 907r, 2.5µL de dimetilsulfóxido y 5µL de agua libre de nucleasas, para tener un volumen de reacción final de 25µL. En cuanto al ciclo de reacción se realizó de la siguiente manera: inicio; tres minutos a 98°C, desnaturalización; un minuto a 94°C, hibridación; un minuto a 52°C, y extensión dos minutos a 72°C, esto durante 34 ciclos. Pasado el tiempo de PCR se procedió a mezclar 4µL de la muestra con buffer de carga y Gelgreen (biotium), subsiguientemente se realizó una electroforesis con un gel de agarosa (0.8%) a 90V, en buffer TAE, durante 1.5 hora. El gel se reveló en un fotodocumentador (Gel Doc EZ, Biorad), esto con la finalidad de asegurarnos que la amplificación se haya llevado de manera correcta.

Para poder purificar el amplicon de la mezcla de PCR, se optó por hacer una limpieza de banda, esto mezclando 20 μ L del producto de PCR con 5 μ L de buffer de carga con GelGreen posteriormente una electroforesis con un gel de agarosa al 0.8% a 90V durante 1.5 horas, una vez pasado el tiempo se utilizó un trasiluminador UV para ver la banda y poder cortarla, ulteriormente se purificó la banda con el kit Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System de la marca Promega utilizando el protocolo recomendado por el fabricante. Para la secuenciación el amplicon se llevó al laboratorio divisional de biología molecular en el edificio S de la UAM unidad Iztapalapa.

Concentración mínima inhibitoria (CMI)

Para conocer la CMI de la cepa parental se realizó un gradiente de concentraciones de kanamicina, gentamicina, higromicina y ampicilina, primeramente, se realizaron saltos grandes en la concentración para después acotar las distintas CMI, para esto se utilizaron cajas de Petri de 60 x 15mm con medio GB1 a los cuales se inocularon alrededor de 80 mil esporas viables, se incubó a 30°C durante 60 horas.

Cinética de producción

Se inocularon 50 μ L de suspensión de esporas (1.5x10⁷ UFC/mL) en 50mL de medio semilla (Tabla 7) en matraces tridentados de 250mL con tapones de tela quirúrgica y se incubó en agitadores rotativos a 200rpm a 30°C por 72h. Pasado el periodo de incubación se inoculó aproximadamente 0.5mL de volumen de pellet, en 100 mL de medio de producción (Tabla 8) que estaba contenido en matraces de 250mL, con tapones de tela quirúrgica, se agitaron en incubadoras rotatorias a 200rpm a 30°C; se tomó una muestra con un volumen de 500 μ L cada 24 horas durante 8 días, tanto para analizar la producción de antibiótico como de biomasa.

Cuantificación de biomasa

La cuantificación de la biomasa se llevó a cabo por medio de la medición de peso seco, el cual se obtuvo a partir de las muestras recolectados durante la cinética

centrifugándolas durante 10 minutos a 16000g, se realizaron 2 lavados con agua destilada estéril, bajo las mismas condiciones de centrifugación, finalmente esta biomasa lavada se vaciaron en charolas circulares de aluminio de aproximadamente dos centímetros de diámetro, previamente pesados, y se secaron durante 24 horas en un horno a 60°C. Cabe resaltar que este resultado se estimó por medio de la diferencia en el peso de la charola antes y después de poner la muestra que se tomó durante la cinética previamente lavada.

Extracción del Antimicrobiano

Para la extracción del antimicrobiano se ocupó cambios de pH (Reiblein et al., 1973) Cada una de las muestras antes mencionadas se les llevó a un pH de 2 con H₂SO₄ concentrado (aprox. 25 µl), después de 2 horas se agito vigorosamente con vortex durante 5 min y una vez transcurrido este tiempo se llevó la muestra a un PH de 7 con la ayuda de NaOH 10 M (aprox. 50 µl), finalmente se centrifugó la muestra a 16,000g por 10 min, el sobrenadante se ocupó para la cuantificación de actividad de antimicrobiana.

Cuantificación por bioensayos de actividad antimicrobiana.

Para la cuantificación del antimicrobiano se optó por bioensayos de difusión. El ensayo fue desarrollado con el método de difusión en pozo, que es una técnica adecuada para las suspensiones acuosas que no son esterilizadas por filtración, en este método la presencia de partículas suspendidas en la muestra tiene poca probabilidad de interferir con la difusión de las sustancias antibacterianas al agar (Roldán-Tapia, 2011).

Para el ensayo por pozos, se prepararon cajas para bioensayo con medio LB-Agar Suave (250mL) (Tabla 9), que fueron inoculadas embebiendo 250µL de suspensión de *Bacillus subtilis* a una densidad óptica de 0.9, medidas con biofotómetro a 600nm, el medio se deja solidificar para posteriormente perforar los pozos con ayuda de un sacabocados (9.1mm de diámetro) estéril. en cada uno de los pozos se colocaron

100 μ L de sobrenadante previamente tratado, igualmente se realizó una curva patrón con este método (ver Anexo).

Mutagénesis de la cepa parental

La mutagénesis se llevó a cabo sobre una suspensión de esporas de la cepa parental (1.6x10⁷ UFC/mL, glicerol 20%) utilizando una lámpara de luz ultravioleta, 6W y 254nm, a 30cm de distancia con respecto del material biológico a mutar, (intensidad 220 μ W/cm²), El sistema de mutación se montó como se muestra en la Figura 3; la suspensión de esporas se mantuvo en agitación continua de 72 rpm, y el procedimiento se realizó en la campana de flujo de laminar en condiciones de esterilidad y en completa oscuridad

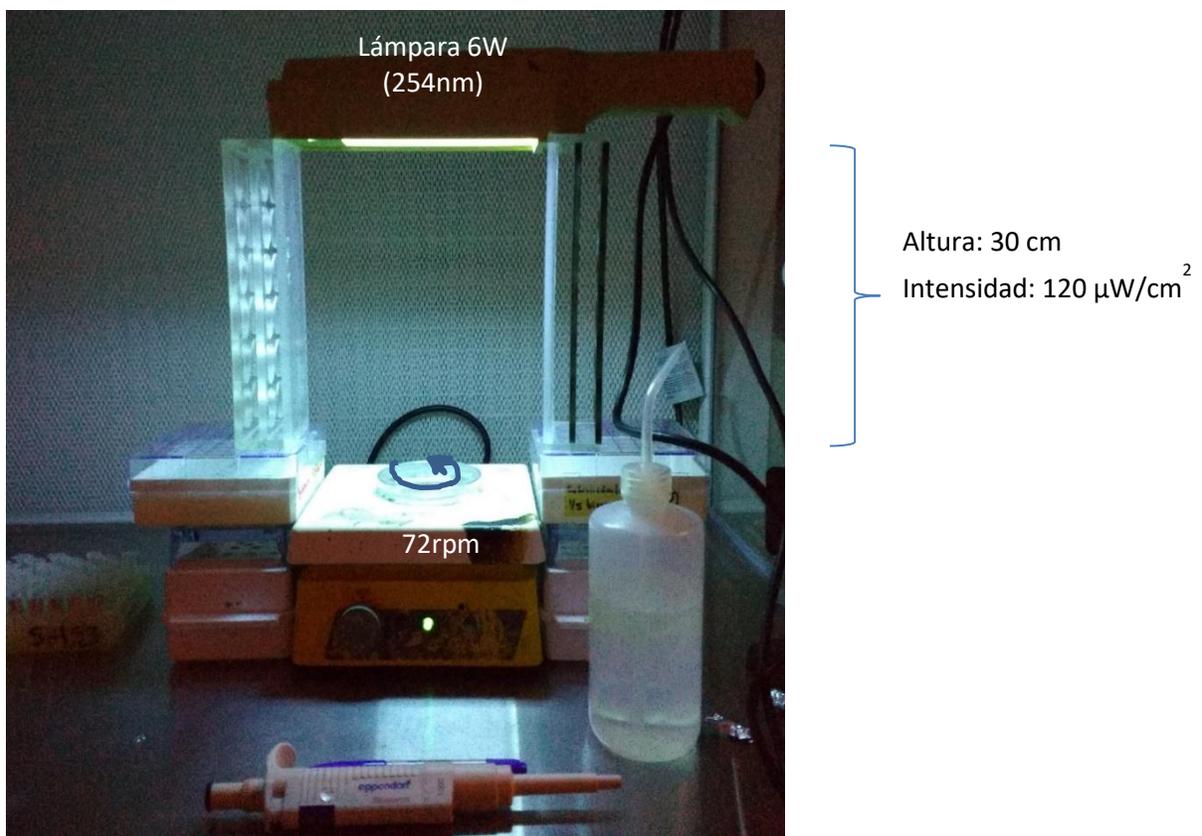


Figura 3 Sistema de mutación para esporas de la cepa parental,

Curva de supervivencia

Se tomó 1mL de muestra irradiada con UV cada 20 segundos durante 4 minutos en tubos eppendorf de 1.5mL cubiertos con papel aluminio, posteriormente se realizaron diluciones e inocularon en medio phage y se incubaron durante 5 días a 30°C en completa oscuridad para la cuantificación de las esporas viables, se realizó una curva de tiempo de exposición al mutágeno contra el porcentaje de supervivencia, esto dividiendo la viabilidad de x tiempo entre la viabilidad del tiempo cero multiplicado por cien. Al observar el decaimiento de la curva resultante se logró obtener la dosis adecuada para seleccionar las cepas mutantes con las resistencias deseadas.

Selección y aislamiento de mutantes resistentes a los elementos de selección

Al haber encontrado CMI para la cepa parental y la dosis de UV conveniente para obtener mutantes adecuadas se procedió a encontrar variantes resistentes a los elementos de selección, inoculando, de manera superficial, alrededor de 8×10^4 esporas viables totales irradiadas con UV en medio GB1 con un antibiótico (gentamicina, higromicina, kanamicina o ampicilina) a su respectiva CMI; la caja Se incubó durante 5 días en completa oscuridad a 30°C; pasado el periodo de crecimiento se aislaron las colonias utilizando asa bacteriológica estéril y se procedió a inocular en medio SFM e incubó durante 14 días a 30°C. las esporas se recolectaron después del tiempo de incubación mediante el método antes descrito. Las variantes resultantes de esta selección se les asignaron el nombre **UVxn**, donde; UV; es el mutagénico al que se expusieron las esporas; x para designar el antibiótico utilizado para su selección (a, g, k, h para ampicilina, gentamicina, kanamicina e higromicina respectivamente) o fenotipo buscado y n; el número colonia aislada.

Selección de Mutantes hiperproductoras.

Se utilizaron tres pasos para identificar cepas hiperproductoras del compuesto antimicrobiano, para cada una de los elementos de selección. El criterio de selección es la producción, es decir, aquellas cepas que tienen una mayor producción del antibacteriano, con diferencias significativas ($\alpha=0.05$), pasarán al siguiente paso de selección.

Selección primaria (Selección en caja)

Esta se realizó por medio de siembra en caja de Petri de 90 x 15mm por picadura en un medio que promoviera a producción de antimicrobiano, se sumergió la punta de un

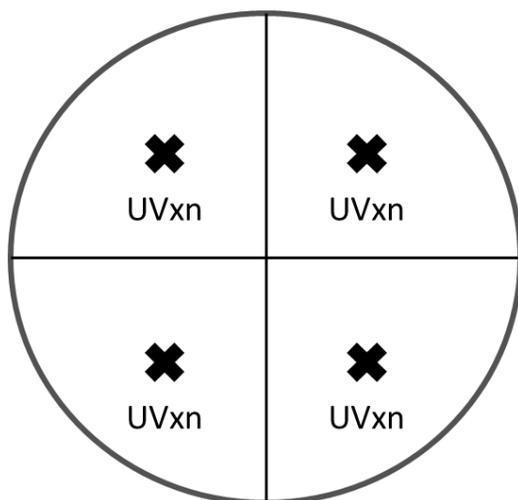


Figura 4 se muestra la forma en que se inocularon las cepas resultantes de la mutagénesis, donde; UV es el agente mutagénico al que se expuso la cepa parental, x es el fenotipo, n el número asignado de la mutante.

palillo de dientes de madera estéril en la suspensión de esporas alrededor de un segundo, posteriormente con éste se picó la caja de acuerdo a lo que se muestra en la Figura 4, esto se realizó por triplicado para cada una de las cepas mutantes aisladas.

Se incubó durante 10 días a 30°C, pasado el tiempo se colocó una cobertura de 30 mL medio LB suave inoculadas con 30 μ L de *B. subtilis* (D.O.= 0.9) embebido, , y se incubó de 12 -16 horas adicionales. Posteriormente se midió el diámetro del halo de inhibición formado y el diámetro de la colonia para realizar la comparación de producción. En cuanto al análisis estadístico utilizado para encontrar diferencias

significativas se propuso el cálculo de un número adimensional (CoefHalo) con la finalidad de disminuir el impacto de la cantidad de biomasa con respecto de la producción, se ocupó la siguiente ecuación para estimar el número antes mencionado:

$$\text{CoefHalo} = \frac{\text{Diametro de Halo de Inhibición}}{\text{Diametro de Colonia}}$$

Con respecto del análisis estadístico se optó por realizar un ANOVA y una prueba de Tukey con una significancia del 0.05.

Selección Secundaria (Microfermentaciones)

Se realizó mediante microfermentaciones que consistieron en la utilización de frascos de vidrio de alrededor de 30 mL de volumen con tapa de tela quirúrgica para la correcta aireación del sistema (Figura 5). Esta fermentación se dividió en dos fases, una de precultivo que consistió en frascos con 15 mL de medio semilla inoculados con 3.3×10^4 UFC e incubados durante 72 horas a 30°C y 200rpm. Pasado este periodo se tomó 50µL de volumen empacado de biomasa y se inoculó a frascos con 15mL de medio de producción e incubó durante 144 horas. Se tomaron muestras para estimar la actividad antimicrobiana. Con la información conseguida se calculó la producción volumétrica, utilizando una curva patrón (ANEXO), para con esto escoger las cepas que pasaron al siguiente sistema de selección se tomaron las dos mejores cepas de cada uno de los fenotipos, únicamente revisando su producción.



Figura 5 Muestra del sistema para las microfermentaciones

Selección Terciaria (Fermentación en matraz)

Se realizaron las fermentaciones de la misma manera que la metodología descrita previamente para la cinética de producción, una vez obtenida esta cinética se calculó la producción específica por medio de la siguiente ecuación:

$$\textit{Producción Específica} = \frac{\textit{Producción volumetrica} [\mu\textit{g/mL}]}{\textit{Biomasa} [\textit{mg/mL}]}$$

Este cálculo se realizó con la biomasa y concentración de antibiótico en el tiempo de máxima producción, sus unidades son: cantidad de antibiótico por miligramo de biomasa, se procedió a realizar un ANOVA con prueba de Tukey, con $\alpha = 0.05$.

Con este resultado se seleccionaron las cepas con mejores producciones de los cuatro fenotipos buscados, para realizar el *Genome Shuffling*.

Formación de protoplastos

Se dejaron crecer las mutantes seleccionadas durante 36 horas en medio S (Tabla 10), suplementado con glicina con una concentración final de 3%, en matraces lisos de 250mL con 10 perlas de vidrio con un diámetro entre 1 y 3mm. Se tomó todo el medio de cultivo y se centrifugó a 7000g a una temperatura de 4°C durante 15 minutos, se retiró el sobrenadante y posteriormente se realizaron dos lavados con sacarosa al 0.3M y centrifugación a las mismas condiciones que se describieron anteriormente. Se agregaron 6mL de solución P (Tabla 11), por cepa, con lizozima (5mg/mL, Sigma-Aldrich) y enzimas líticas de *Trichoderma harzianum* (300 μ g/mL, Sigma-Aldrich), se incubó en frascos de vidrio con tapa de rosca a 36°C, en incubadora rotativa, durante 1.5 horas. Se monitoreó todo el proceso con microscopio de contraste de fases. Cuando el periodo de tiempo terminó se agregaron 10mL de solución P frío, por frasco, posteriormente esta suspensión se filtró utilizando algodón (Figura 6) (Kieser, 2000). El filtrado se centrifugó a 1,200g a 4°C durante 15 minutos. Los protoplastos obtenidos finalmente se lavaron 3 veces con 10, 8 y 5mL de solución P.

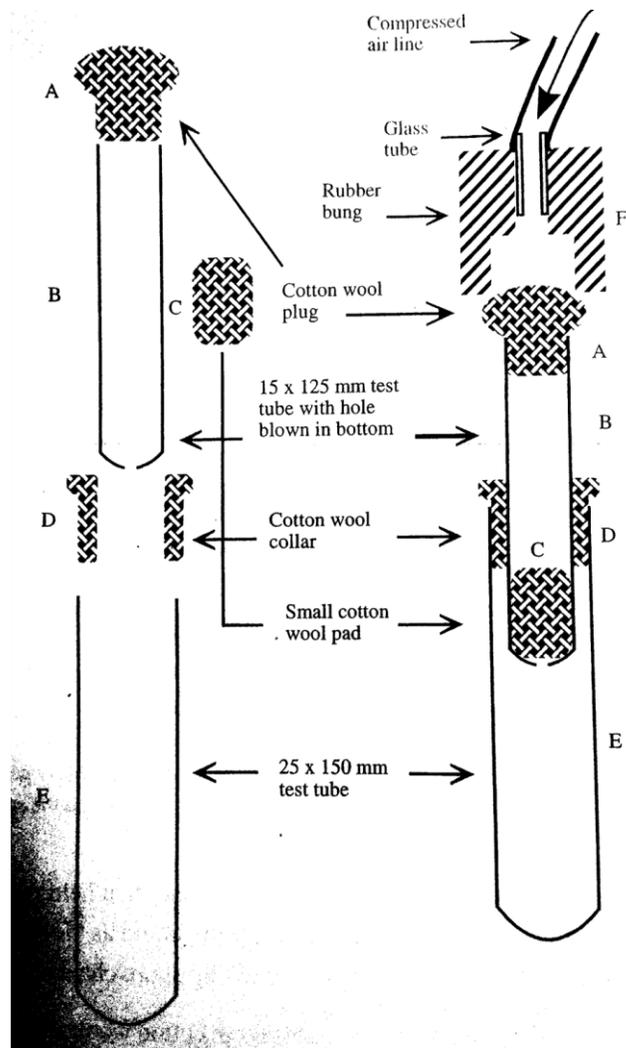


Figura 6 Filtro de algodón para suspensión de protoplastos (Kieser, 2000).

La concentración de protoplastos en la suspensión fue medida con biofotómetro a 600nm con celdas de plástico marca eppendorf.

Genome Shuffling y fusión de Protoplastos

Para realizar las rondas de recombinación se debe de tomar los protoplastos inmediatamente después de obtenerlos, se ajustan todas las cepas a la misma D.O. (0.3) y se mezclan para con esto obtener un volumen final de 10mL, hay que recordar que esta suspensión se realizó en solución P, posteriormente se colocan 5mL de

polietilenglicol 6000 (40%) en solución P, se dejó a temperatura ambiente durante 15 minutos, luego, se diluyó con 10mL de buffer P y se centrifugó durante 10 minutos a 2,500g por 5 minutos a 4°C, por último se inocularon 2mL de esta suspensión en medio completo de regeneración (Tabla 13) con los elementos de selección a sus respectivas CMI para encontrar las diferentes combinaciones de resistencia a antibióticos.

Las combinaciones de fenotipos para obtener las cepas fusionantes se muestran en la Tabla 14, una vez crecidas las colonias con diferentes combinaciones de resistencia a antibióticos, se procedió a aislarlas y propagarlas en medio SFM para posteriores pasos de selección.

Tabla 14 Todas las combinaciones posibles de los fenotipos buscados, donde; a, k, g y h significan ampicilina, kanamicina, gentamicina e higromicina respectivamente.

Dos Fenotipos	Tres fenotipos	Cuatro fenotipos
ak, ah, ag, kh, kg, hg	akg, akh, agh, kgh	akgh

Selección de cepas hiperproductoras fusionantes

Selección primaria y selección secundaria

Se llevó a cabo utilizando el método propuesto para la selección primaria de mutantes, se usó un ANOVA para analizar los datos obtenidos, con una $\alpha= 0.05$ y Tukey como prueba posthoc, una vez obtenidas las tres cepas que tuvieron las mayores producciones se procedió a hacer fermentaciones en matraces, con las mismas condiciones y medios que se describieron en la sección de cinética de producción. El punto de mayor producción se tomó para calcular la producción específica y compararlas entre si utilizando un ANOVA con significancia de 0.05 y una prueba de Tukey.

Resultados y Discusión

Identificación de la cepa

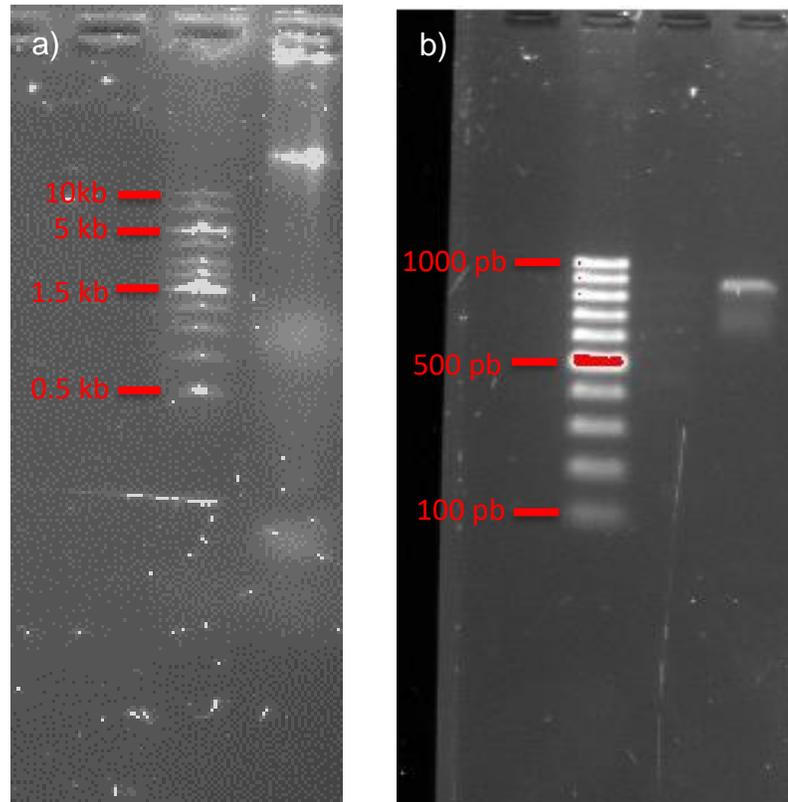


Figura 7. a) Gel de electroforesis donde se muestra el ADN genómico, b) Gel de electroforesis donde se observa el amplicon de ARNr.

La extracción del ADN genómico se llevó de manera correcta, porque como se muestra en la figura 7a la banda de éste queda por encima de las 10kb, también se puede observar que el método permite obtener ADN integro, dando a que si fuera degradado se produciría una mancha corrida. Ahora bien, cómo se puede observar en la figura 7b se logró amplificar la región de ARNr con un peso aproximado de 900pb, esto es lo que se esperaba dado que se reporta una amplificación de 880pb (Rainey et al., 1996), cabe resaltar que solo se amplificó esta región lo que nos hace tener como conclusión que los cebadores recomendados son específicos para esta región de ADN. Se utilizó esta sección del genoma porque es una de las regiones conservadas de los procariontes.

La banda obtenida se cortó y se mandó secuenciar al Laboratorio Divisional de Biología Molecular de la UAM unidad Iztapalapa (para ver electroferograma ver ANEXO).

Al analizar esta secuencia mediante Blast de la National Center for Biotechnology Information (REFERENCIA) (NCBI) dio como resultado que la cepa usada es del género *Streptomyces*, con una identidad del 99% y una expectacia de 0, es decir, que con el fragmento analizado nos da la seguridad de decir que es dicho microorganismo, sin embargo, el fragmento secuenciado no da la suficiente información para identificar la especie de *Streptomyces* (Figura 8).

Curva de supervivencia

Para poder conocer la dosis (tiempo) de radiación UV adecuada a la que se tiene que exponer un microorganismo para generar mutaciones sin que la exposición sea letal se debe de realizar una curva de supervivencia por medio de una cuenta en placa, además de que se debe de mantener las cajas en absoluta oscuridad, para evitar la fotoreactivación (Kieser, 2000).

En la Figura 9 se muestran el porcentaje de supervivencia de cada uno de los tiempos probados. Se observa que el porcentaje de supervivencia decayó de una manera muy drástica en los primeros 20 segundos de la irradiación con luz ultravioleta. Esto es un comportamiento diferente a lo descrito por (Himabindu et al., 2007) en el que irradió durante 10, 30 y 30 minutos, en condiciones similares, a una suspensión de micelio de *M. echinospora* y obtuvo una tasa de supervivencia entre 0.01-1%; también se tienen reportes que en esporas de *Streptomyces avermitilis* con una exposición de 45 minutos se muestra una supervivencia de 20% con una lámpara de 30W (Siddique, Syed, Adnan, & Qureshi, 2014), igualmente se puede hablar de esporas de *Streptomyces pristinaespiralis* en donde a 120 segundos de irradiación se tiene una tasa de muerte del 90% (Xu et al., 2008). A partir de los 60 segundos se obtiene un porcentaje de muerte de alrededor 99.9%, sin embargo en esporas de *S. hygrosopicus* a 40 s de

tratamiento de luz UV tiene un porcentaje de supervivencia similares al nuestro (Zhu et al., 2010a).

Streptomyces sp. strain ARR4 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
 Sequence ID: [KX427132.1](#) Length: 1467 Number of Matches: 1

Range 1: 22 to 841 [GenBank](#) [Graphics](#) ▼ Next Match ▲

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
1500 bits(812)	0.0	819/822(99%)	2/822(0%)	Plus/Min
Query 12	CCAGGCGGGGCACTTAATGCGTTAGCTGCGGCACGGACAACGTGGAATGTTGCCACACC	71		
Sbjct 841	CCAGGCGGGGCACTTAATGCGTTAGCTGCGGCACGGACAACGTGGAATGTTGCCACACC	782		
Query 72	TAGTGCCACCGTTTACGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTCGCTCCCCACGC	131		
Sbjct 781	TAGTGCCACCGTTTACGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTCGCTCCCCACGC	722		
Query 132	TTTCGCTCCTCAGCGTCAGTATCGGCCAGAGATCCGCCCTTCGCCACCGGTGTTCTCTCT	191		
Sbjct 721	TTTCGCTCCTCAGCGTCAGTATCGGCCAGAGATCCGCCCTTCGCCACCGGTGTTCTCTCT	662		
Query 192	GATATCTGCGCATTTACCGCTACACCAGGAATTCGGATCTCCCCACCGAACTCTAGCC	251		
Sbjct 661	GATATCTGCGCATTTACCGCTACACCAGGAATTCGGATCTCCCCACCGAACTCTAGCC	602		
Query 252	TGCCCGTATCGACTGCAGACCCGGGGTTAAGCCCCGGGCTTTACAACCGACGTGACAAG	311		
Sbjct 601	TGCCCGTATCGACTGCAGACCCGGGGTTAAGCCCCGGGCTTTACAACCGACGTGACAAG	542		
Query 312	CCGCCTACGAGCTCTTTACGCCAATAAATTCGGACAACGCTTGCGCCCTACGTATTACC	371		
Sbjct 541	CCGCCTACGAGCTCTTTACGCCAATAAATTCGGACAACGCTTGCGCCCTACGTATTACC	482		
Query 372	GCGGCTGCTGGCACGTAGTTAGCCGGCGCTTCTTCTGCAGGTACCGTCACTTTCGCTTCT	431		
Sbjct 481	GCGGCTGCTGGCACGTAGTTAGCCGGCGCTTCTTCTGCAGGTACCGTCACTTTCGCTTCT	422		
Query 432	TCCCTGCTGAAAGAGGTTTACAACCCGAAGGCCGTATCCCTCACGCGGCGTTCGCTGCAT	491		
Sbjct 421	TCCCTGCTGAAAGAGGTTTACAACCCGAAGGCCGTATCCCTCACGCGGCGTTCGCTGCAT	362		
Query 492	CAGGCTTTCGCCCATTTGTGCAATATTCCTCCACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTCTGGGCCGT	551		
Sbjct 361	CAGGCTTTCGCCCATTTGTGCAATATTCCTCCACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTCTGGGCCGT	302		
Query 552	GTCTCAGTCCCAGTGTGGCCGGTTCGCCCTCTCAGGCCGGCTACCCGTCGTCGCCCTGGTG	611		
Sbjct 301	GTCTCAGTCCCAGTGTGGCCGGTTCGCCCTCTCAGGCCGGCTACCCGTCGTCGCCCTGGTG	242		
Query 612	AGCCGTTACCTCACCAACTAGCTGATAGGCCGCGGGCTCATCCTGCACCGCCGGAGCTTT	671		
Sbjct 241	AGCCGTTACCTCACCAACTAGCTGATAGGCCGCGGGCTCATCCTGCACCGCCGGAGCTTT	182		
Query 672	CGATCCTCGCAGATGCCTGCGAGGATCAGTATCCGGTATTAGACCCCGTTTCCAGGGCTT	731		
Sbjct 181	CGAACCTCGCAGATGCCTGCGAGGATCAGTATCCGGTATTAGACCCCGTTTCCAGGGCTT	122		
Query 732	GTCCAGAGTGCAGGGCAGATTGCCACGTGTTACTACCCGTTTCGCCACTAATCCCCA	791		
Sbjct 121	GTCCAGAGTGCAGGGCAGATTGCCACGTGTTACTACCCGTTTCGCCACTAATCCCCA	63		
Query 792	CCGAAGTGGTTCATCGTTCGACTTGCATGGTGTAAAGCACGC	833		
Sbjct 62	CCGAAGTGGTTCATCGTTCGACTTGCATG-TGTTAAGCACGC	22		

Figura 8 Comparación de la secuencia problema y la de la base de datos de NCBI

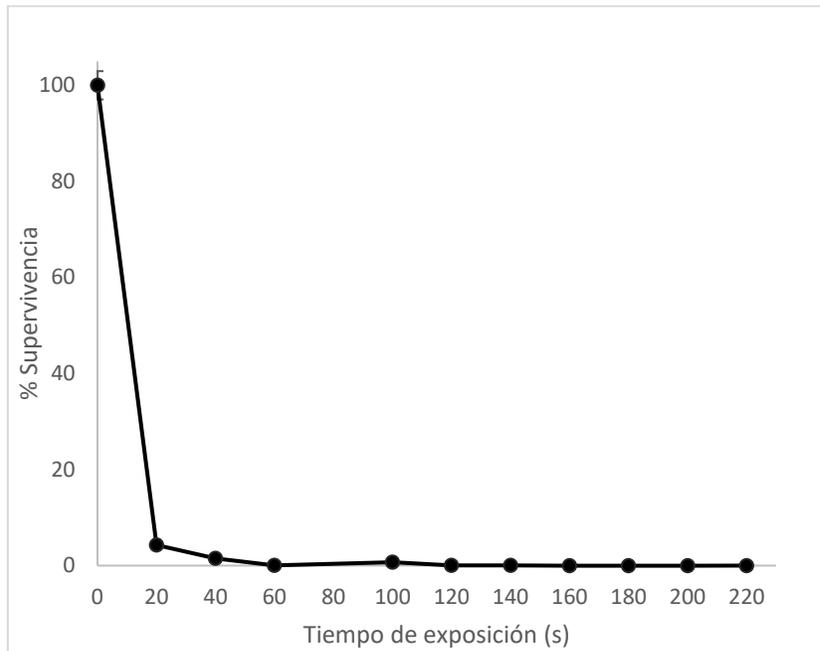


Figura 9 Curva de supervivencia

Gracias a la curva de supervivencia (Figura 9) podemos determinar que el tiempo apropiado de exposición a luz UV es de 20 segundos con 4% de supervivencia (6.67×10^5 UFC/mL) aproximadamente, ya que entre 3 y 5 de porcentaje de supervivencia es el adecuado porque es el intervalo donde se puede esperar que la mutación lograda sea de tipo puntual (Miller, 1985).

Selección de Mutantes resistentes y Concentración Mínima Inhibitoria (CMI)

Los elementos de selección se decidieron con base en la hipótesis de que la cepa con la que trabajábamos era productora de gentamicina. La producción de gentamicina está condicionada en gran medida por la toxicidad que esta puede eventualmente provocar al propio microorganismo, con lo cual se establece una relación directa entre sobreproducción-resistencia al producto; por lo tanto, la selección de colonias capaces de crecer en un medio con dosis del antibiótico mayor a la Concentración Mínima

Inhibitoria es un factor a considerar. Los antibióticos que se utilizaron son Kanamicina, Higromicina y Gentamicina (Himabindu, Potumarthi, & Jetty, 2007), además de que este último, por tratarse del producto final de la vía de síntesis del antibiótico de interés en este trabajo y podría generar inhibición retroalimentación, como muchos de los metabolitos secundarios que producen los microorganismos (Zhi-hua Jin et al., 2006). Igualmente se tienen reportes de que los β -lactámicos ayudan a aumentar la producción de aminoglucósidos, ya que favorecen la secreción de los mismos, con esto aliviando la represión feedback, además de que esta mutación, resistencia a ampicilina, podría alterar la pared celular ayudando con esto al transporte del antibiótico hacia afuera de la célula (Meenavilli, Potumarthi, & Jetty, 2008).

Tabla 15 CMI de la cepa parental, Numero de mutantes y nombre asignado.

CMI	Kanamicina 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$	Higromicina 26 $\mu\text{g}/\text{mL}$	Gentamicina 12 $\mu\text{g}/\text{mL}$	Ampicilina 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$
Numero de Mutantes	31	11	14	26
Nombre asignado	UVkn	UVhn	UVgn	UVan

Las concentraciones que se eligieron para seleccionar las mutantes resistentes se muestran en la Tabla 16, estas son las CMI de la cepa parental. Se reportan cepas mutantes de *M. echinospora* con la capacidad de soportar la concentración de 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de kanamicina y penicilina, esto sobre micelio.

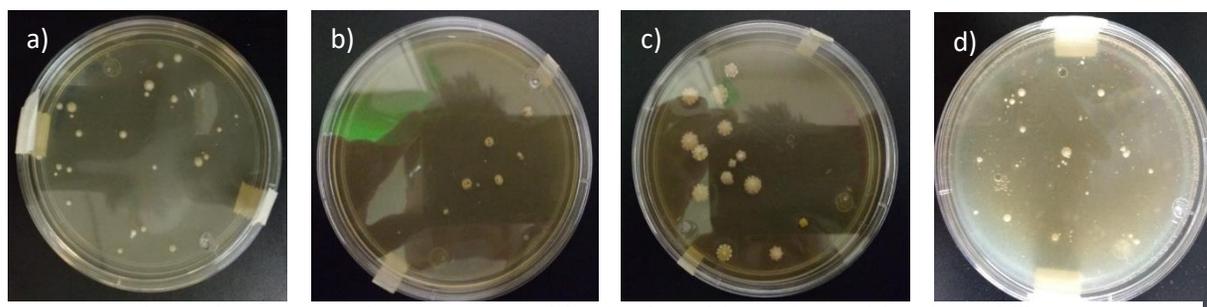


Figura 10 Mutantes Resistentes, a) Kanamicina, b) Higromicina, c) Gentamicina, d) Ampicilina.

Las mutantes con el fenotipo deseado se muestran en la Figura 10, donde se pueden observar 31, 11, 14 y 26 mutantes resistentes a kanamicina, higromicina, gentamicina y ampicilina respectivamente, dando como resultado un total de 82 colonias que fueron analizadas posteriormente. Aquí se ve la importancia del uso de la selección racional, por ejemplo, en la cepa de *S. pristinaespiralis* CGMCC 0957, utilizando UV como mutagénico, se obtienen alrededor de 270 colonias al utilizar como elemento de selección pristinamicina (Xu et al., 2008), Igualmente esporas de *Saccharoypora spinosa* expuestas a UV generaron un total de 200 mutantes donde solo el 24% tenían la característica fenotípica que se buscaba, (Liang, Lu, & Wen, 2009), en fenotipos parecidos a que los que buscábamos, kanamicina y penicilina, se pudieron aislar solo 23 mutantes que mostraron resistencia (Himabindu et al., 2007). En cepas de *Streptomyces* sp. para la producción de proteasa alcalina, se lograron aislar solo 24 colonias con la capacidad de producir una mayor cantidad de esta enzima (Khattab & Abdel-aziz, 2012). En otros reportes donde solo se mutan esporas de *S. hygrosopicus*, se probaron todas las cepas que se obtuvieron, alrededor de 600 mutantes (Zhu et al., 2010b), de las cuales solo el 1% mostró un aumento de la producción.

Selección Primaria

Tabla 16 Selección primaria para la resistencia de gentamicina, se muestran los diferentes valores de CoefHalo para las cepas con marcador antes nombrado, el experimento se llevó a cabo en cajas de Petri con 30mL de medio GB1, 10 días de incubación, 30°C.

Cepa	Subconjunto para alfa = 0.05					
	1	2	3	4	5	6
UVg6	1.00					
UVg7	1.00					
UVg13	1.00					
UVg14	1.00					
UVg10		1.59				
UVg4		1.70	1.70			
UVg8		1.82	1.82			
Parental		2.01	2.01	2.01		
UVg11			2.10	2.10		
UVg3			2.19	2.19		
UVg12				2.43	2.43	
UVg2					2.75	
UVg9					2.77	
UVg1						3.76

En la tabla número 17, 18, 19 y 20 se reporta el CoefHalo de todas las cepas mutantes aisladas utilizando la selección racional, de igual manera aquellas cepas que tuvieron un mayor CoefHalo en el caso de la gentamicina al hacer un análisis estadístico, se demostró que el uso de este antibiótico como elemento de selección de mutantes produce diferencias significativas en las cepas con un significancia calculada menor a la que se propuso (0.05), en cuanto a la prueba posthoc de Tukey se lograron identificar 3 cepas que tienen un CoefHalo mayor que el observado para la cepa parental, entre ellas se encuentran UVg2, UVg9 y UVg1. En caso de las mutantes seleccionadas utilizando kanamicina se obtuvieron alrededor 6 cepas con cuyo CoefHalo muestra diferencias

Tabla 17 Selección primaria para la resistencia de kanamicina, se muestran los diferentes valores de CoefHalo para las cepas con marcador antes nombrado, el experimento se llevó a cabo en cajas de Petri con 30mL de medio GB1, 10 días de incubación, 30°C.

Cepa	Subconjunto para alfa = 0.05										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
UVk3	1.00										
UVk4	1.00										
UVk11	1.00										
UVk12	1.00										
UVk13	1.00										
UVk14	1.00										
UVk15	1.00										
UVk25	1.00										
UVk27	1.00										
UVk31	1.00										
UVk23	1.20	1.20									
UVk22	1.26	1.26	1.26								
UVk1		1.46	1.46	1.46							
UVk2		1.55	1.55	1.55	1.55						
UVk7		1.58	1.58	1.58	1.58						
UVk10			1.65	1.65	1.65	1.65					
UVk8			1.67	1.67	1.67	1.67					
UVk5				1.80	1.80	1.80					
UVk24				1.85	1.85	1.85	1.85				
UVk26				1.87	1.87	1.87	1.87				
UVk21					1.89	1.89	1.89				
UVk16					1.94	1.94	1.94				
Parental						2.01	2.01	2.01			
UVk30							2.24	2.24	2.24		
UVk17							2.26	2.26	2.26		
UVk9								2.39	2.39		
UVk20									2.47		
UVk28									2.57	2.57	
UVk6									2.58	2.58	
UVk19										2.90	2.90
UVk29											3.04
UVk18											3.05

significativa con respecto al de la cepa parental, siendo las cepas UVk20, UVk28, UVk6, UVk19, UVk29 y UVk18, con una alfa propuesta de 0.05. En cuanto a la resistencia a higromicina solo se lograron identificar tres mutantes que mostraron las mismas características que las cepas anteriores siendo UVh1, UVh7 y UVh6.

Tabla 18 Selección primaria para la resistencia de higromicina, se muestran los diferentes valores de CoefHalo para las cepas con marcador antes nombrado, el experimento se llevó a cabo en cajas de Petri con 30mL de medio GB1, 10 días de incubación, 30°C.

Cepa	Subconjunto para alfa = 0.05					
	1	2	3	4	5	6
UVh3	1.00					
UVh9	1.00					
UVh5	1.19					
UVh4	1.77					
UVh11	1.82					
Parental	2.01	2.01				
UVh10	2.07	2.07				
UVh8			2.19	2.19		
UVh2			2.27	2.27	2.27	
UVh1				2.42	2.42	2.42
UVh7						2.59
UVh6						2.64

Con lo que respecta a la característica fenotípica buscada con ampicilina como agente de selección, se lograron obtener 14 cepas que soportaron 150µg/mL del antibiótico para la selección, siendo UVa2, UVa21, UVA25, UVa,15, UVa3, UVa4, UVa24, UVa5, UVa2, UVa12, UVa14, UVa23, UVa19, UVa22 las que mostraron diferencias significativas con respecto de la parental.

Tabla 19 Selección primaria para la resistencia de ampicilina, se muestran los diferentes valores de CoefHalo para las cepas con marcador antes nombrado, el experimento se llevó a cabo en cajas de Petri con 30mL de medio GB1, 10 días de incubación, 30°C.

Cepas	Subconjunto para alfa = 0.05									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
UVa6	1.00									
UVa9	1.00									
UVa17	1.00									
UVa10		1.29								
UVa13			1.85							
Parental			2.01	2.01						
UVa1			2.10	2.10	2.10					
UVa16			2.28	2.28	2.28	2.28				
UVa8			2.36	2.36	2.36	2.36				
UVa7				2.43	2.43	2.43				
UVa18				2.48	2.48	2.48	2.48			
UVa20				2.51	2.51	2.51	2.51			
UVa11				2.52	2.52	2.52	2.52			
UVa2					2.54	2.54	2.54			
UVa21					2.57	2.57	2.57			
UVa25					2.58	2.58	2.58			
UVa15					2.59	2.59	2.59			
UVa3					2.61	2.61	2.61			
UVa4						2.64	2.64			
UVa24						2.71	2.71			
UVa5						2.71	2.71			
UVa26						2.73	2.73			
UVa12						2.76	2.76			
UVa14							2.99	2.99		
UVa23								3.35		
UVa19									4.07	
UVa22										4.77

Se tiene reportado que para *S. clavuligerus* (Korbekandi et al., 2010) se utilizó un método de selección para mutantes sobreproductoras similar al reportado en este trabajo, sin embargo; Korbekandi y colaboradores utilizaron un criterio de selección diferente (diámetro de inhibición/ diámetro de inhibición de la parental), este método

demonstró ser buen tamiz para descartar mutantes que producen una cantidad de antibiótico similar a la parental. En el caso de Korbekandi lograron disminuir el número de mutantes a analizar de 105 a tan solo 3; en nuestro trabajo se lograron descartar 56 mutantes utilizando el criterio de selección propuesto (CoefHalo) en la selección primaria, reduciendo la cantidad de 82 a 24 mutantes, lo que nos permitió continuar con el trabajo utilizando únicamente cepas de las cuales se puede asegurar que tienen una mayor producción de compuesto antimicrobiano que la parental.

Selección Secundaria

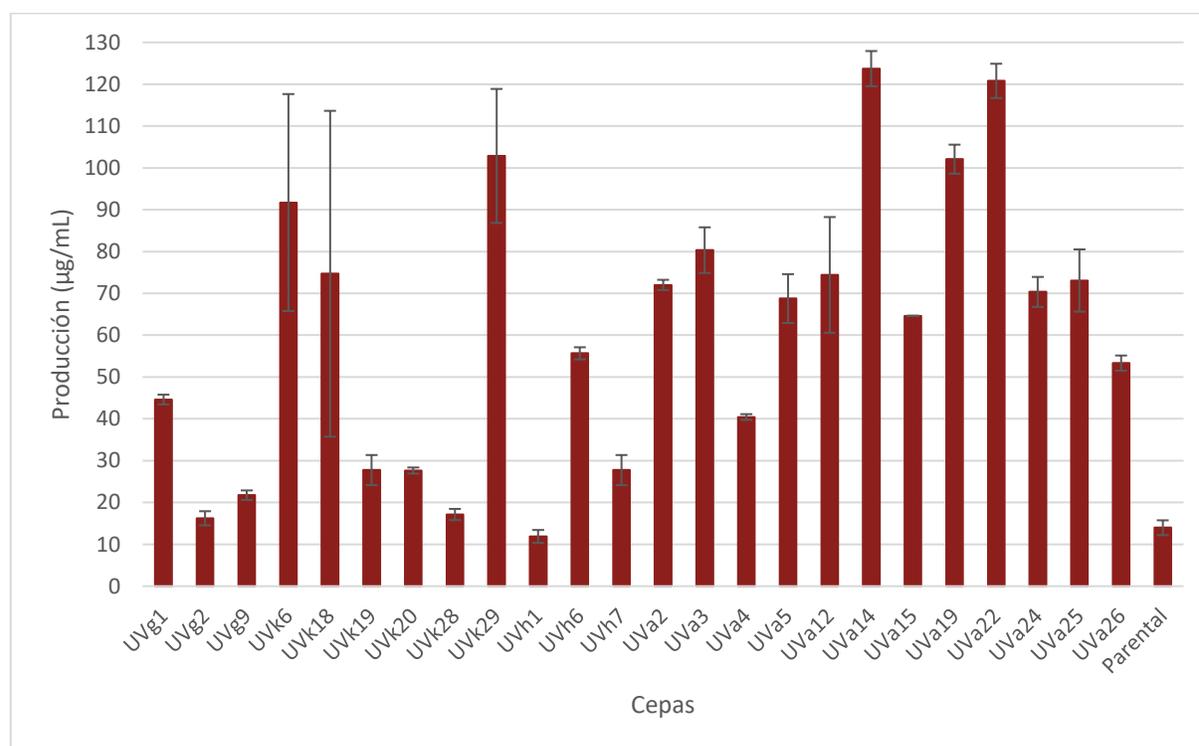


Figura 11 Producción de agente antimicrobiano en microfermentación de las cepas mutantes, 15mL medio de producción en frascos de vidrio de 30mL, 200rpm, 30°C.

Para esta selección solo se tomó en cuenta el punto de máxima actividad antimicrobiana de la cepa progenitora, siendo el día 6 con una producción de aproximadamente 14µg/mL de antibiótico (ver Anexo). En la figura 11 se puede apreciar las concentraciones (de que) que se tienen al realizar las

microfermentaciones, siendo UVg1 y UVg9 las que obtuvieron mayores producciones con promedio aproximado de 44 y 22 μ g/mL respectivamente. En cuanto al fenotipo de kanamicina se logró producir alrededor de 92, 74 y 103 μ g/mL de las cepas UVK6, UVk18 y UVk29 respetivamente, con que respecta a la producción del antimicrobiano por cepas obtenidas bajo selección con higromicina se determinó que la cepa UVh6 produjo 55.66 μ g/mL de actividad antimicrobiana seguido de UVh7 con 27.75 μ g/mL. Para las cepas con resistencia ampicilina se lograron reconocer 3 cepas que lograron producir una mayor cantidad de compuestos antimicrobianos con respecto de las otras con ese fenotipo las cuales fueron UVa14, UVa19 y UVa22 con una producción aproximada de 124, 102 y 120 μ g/mL respectivamente.

Después de esta selección se seleccionaron las cepas que mostraron una mayor producción del antimicrobiano fueron UVg9, UVg1, UVk6, UVk18, UVK29, UVh6, UVh7, UVa19, UVa14 y UVa22, estas fueron seleccionadas para el siguiente paso de selección.

Selección Terciaria de Mutantes sobreproductores de agente antimicrobiano

Los microorganismos al estar en mejores condiciones de crecimiento en lo que respecta a la oxigenación, lograron aumentar mucho su capacidad de producción del metabolito de interés. En la gran mayoría de las cepas, la máxima producción del agente antimicrobiano se alcanza a las 144h, exactamente igual que la cepa parental. En la figura número 12 se puede observar la producción de... a través del tiempo de las cepas resistentes a gentamicina apreciándose que ambas tienen una producción similar, en entre 305 a 310 μ g/mL, (sin diferencia significativa).

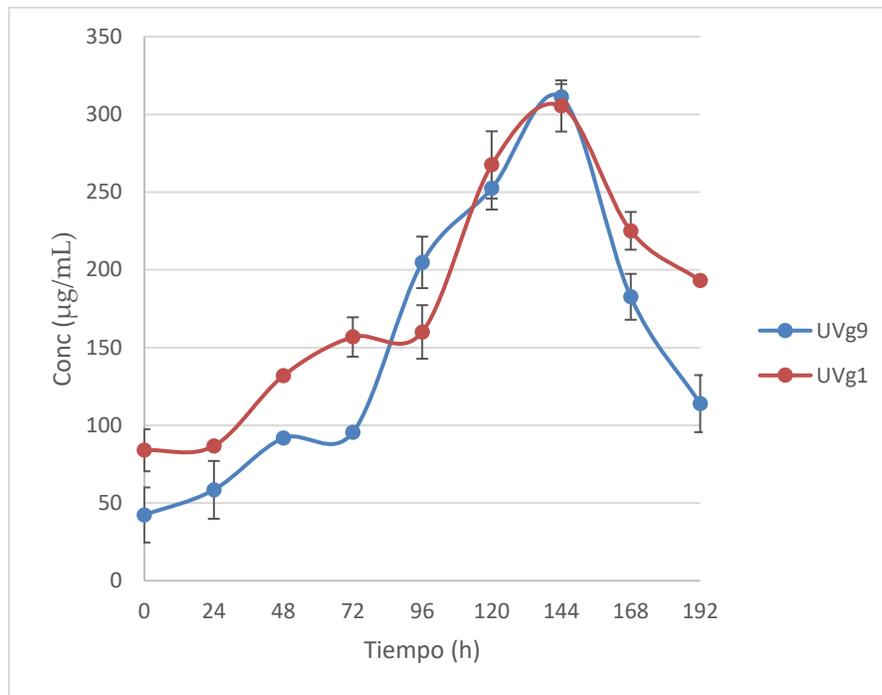


Figura 12 Cinética de producción de un agente antimicrobiano de las cepas UVg, 100mL de medio de producción en matraces tridentados de 250mL, 200rpm, 30°C

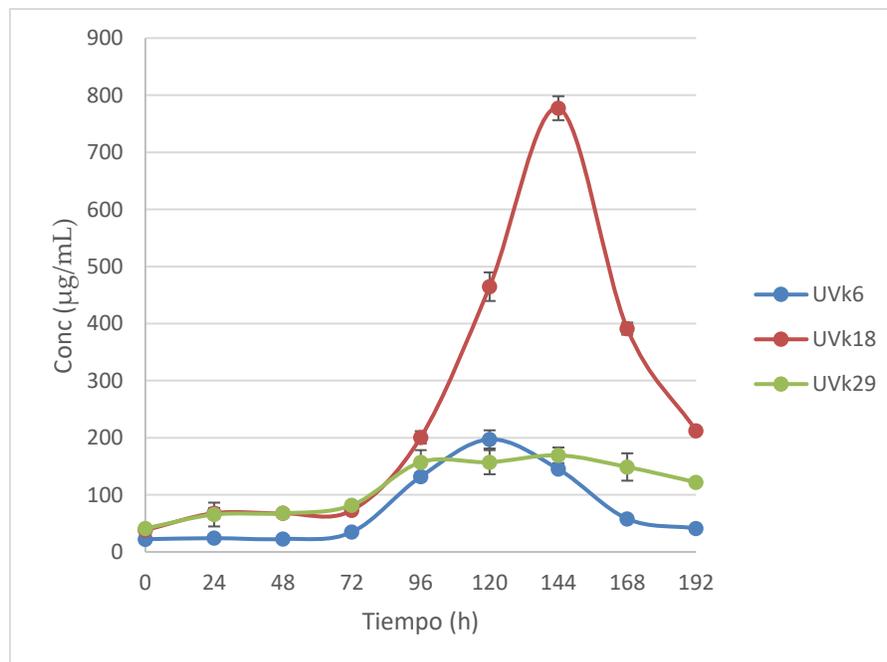


Figura 13 Cinética de producción de un agente antimicrobiano de las cepas UVk, 100mL de medio de producción en matraces tridentados de 250mL, 200rpm, 30°C

En cuanto a las cepas con resistencia a kanamicina, se tiene que la que mayor producción obtenida se logró con la cepa UVk18, con producción cercana a 780 $\mu\text{g}/\text{mL}$, seguida de UVk6 con 197 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y por último UVk29 con 189 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Cabe resaltar que la cepa UVk6 llegó a su máxima producción de agente antimicrobiano el día 5 (Figura 13).

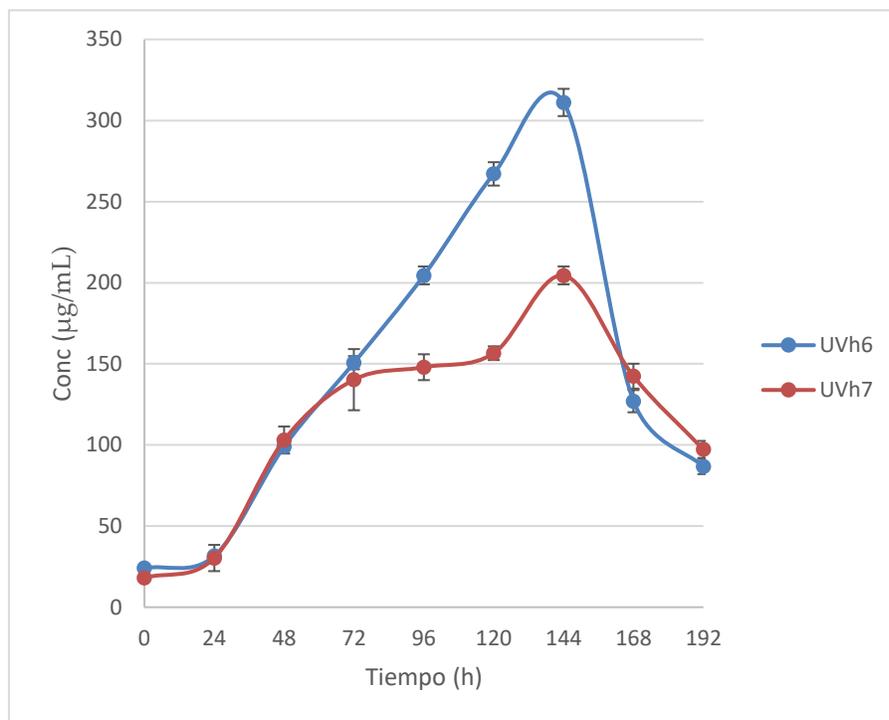


Figura 14 Cinética de Producción de un agente antimicrobiano para las cepas UVh, 100mL de medio de producción en matraces tridentados de 250mL, 200rpm, 30°C

En la figura 14 se observa la cinética de producción de las cepas resistentes a higromicina, el día al que se alcanza el punto máximo es el sexto, siendo la cepa UVh6 la que logró obtener mayor actividad con una cantidad estimada de 310 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de antibiótico, seguido de UVh7 con 204 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

Como se muestra en la Figura 15 se pudo observar que la cepa con resistencia a ampicilina que tuvo mayor producción fue UVA14 con 360 $\mu\text{g}/\text{mL}$ seguida por UVa19 y UVa22 con 340 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y 237 $\mu\text{g}/\text{mL}$ respectivamente.

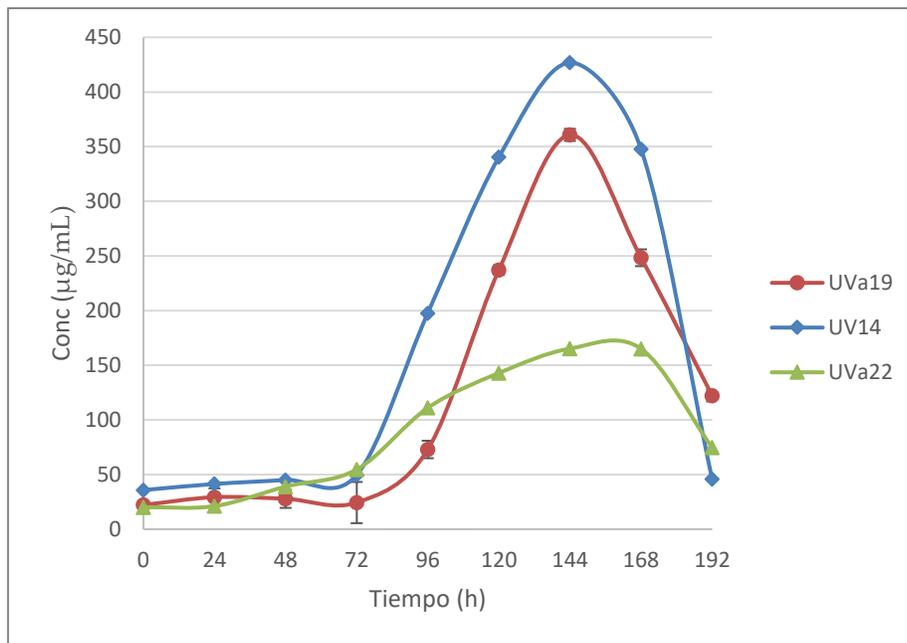


Figura 15 Cinética de producción de un agente antimicrobiano de las cepas UVa, 100mL de medio de producción en matraces tridentados de 250mL, 200rpm, 30°C

En la figura 16 se aprecia la cinética de producción de antibiótico de aquellas cepas que mostraron la mejor producción en cada una de las resistencias buscadas. Igualmente se puede apreciar la cepa progenitora, esta última tiene una producción máxima de 36µg/mL de antibiótico a los 6 días.

Gracias a este gráfico podemos decir que la cepa de mayor producción fue UVk18, seguida de UVa14, UVh6 y UVg1, sin embargo, no se aprecia diferencia contundente entre estas últimas. La mutante con resistencia de kanamicina produce 21.66 veces más antibiótico que la cepa parental, mientras que la que tiene resistencia a ampicilina 10 veces más, la de higromicina 860% más que la parental, mientras que la cepa con resistencia de gentamicina 840% veces más, ahora bien, aunque este resultado parezca impresionante se debe hacer un análisis con producción específica, ya que no se puede llegar a conclusiones si no se conoce la producción específica, como

ya es sabido en muchos casos de cepas hiperproductoras este aumento de la producción se debe al aumento en el crecimiento celular (Kieser, 2000).

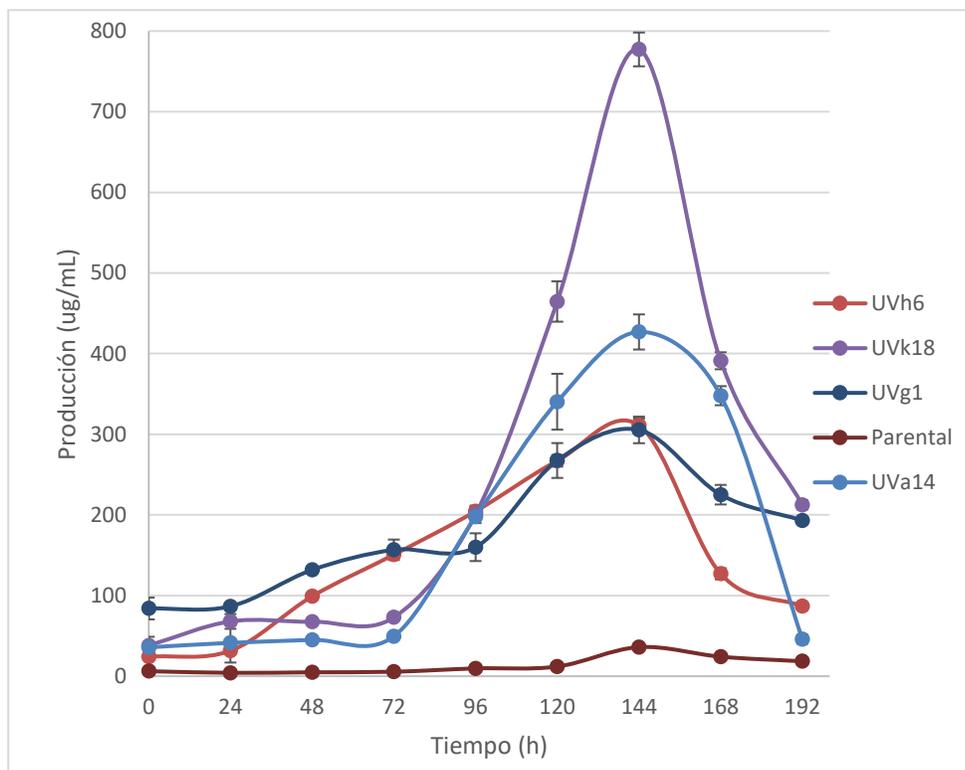


Figura 16 Cinética de producción de antibiótico de las mejores cepas de cada uno de los fenotipos deseados contra la cepa parental, 100mL de medio de producción en matraces tridentados de 250mL, 200rpm, 30°C

La producción específica de cada una de las cepas que se eligieron para esta última fase de selección de mutantes se observa en la tabla número 10. Hay que tomar en cuenta que la biomasa y valores de producción de antibiótico que se usaron para hacer este cálculo fueron los del día 6, el día de máxima producción. Después de un análisis de varianza y posterior prueba de Tukey con significancia de 0.05 se obtuvo que las cepas con mayor producción fueron UVg1, UVh6, UVk18 y UVa14, ordenados de forma ascendente, aunque la diferencia no es tan marcada como en el caso de la producción volumétrica.

En cuanto a la relación que se tiene con la cepa parental se observa que UVa14 produce 27.05 veces más, UVk18 26.8, UVh6 25.3 más y UVg1 24.6 veces más. Este resultado es más confiable ya que la comparación se basa en la eficiencia de cada uno de las cepas. Al final, estas cuatro cepas fueron las que se eligieron para comenzar el proceso de fusión de protoplastos o *Genome Shuffling* (Tabla 21).

Tabla 20. Producción específica de cada uno de las cepas probadas, 100mL de medio de producción en matraces tridentados de 250mL, 200rpm, 30°C.

	Antibiótico para selección	Producción (µg/mL)	Biomasa (mgX/mL)	Producción específica (mg/gX)
UVh6	Higromicina	311.14 ± 8.39	1.45 ± 0.21	217.33 ± 37.58
UVh7	Higromicina	206.46 ± 2,76	1.70 ± 0.14	121.94 ± 11.77
UVk6	Kanamicina	197.14 ± 15.94	0.95 ± 0.07	207.47 ± 1.33
UVk18	Kanamicina	777.27 ± 20.96	3.40 ± 0.28	229.66 ± 25.27
UVk29	Kanamicina	169.24 ± 13,68	1.70 ± 0.85	116.02 ± 65.95
UVg1	Gentamicina	305.43 ± 16.47	1.45 ± 0.07	210.61 ± 1.09
UVg9	Gentamicina	311.14 ± 8,39	1.65 ± 0.21	189.81 ± 19.32
UVa14	Ampicilina	426.90 ± 21.76	1.85 ± 0.21	231.60 ± 14.79
UVa19	Ampicilina	360.77 ± 18.39	3.55 ± 0.35	101.87 ± 4.97
UVa22	Ampicilina	165.24 ± 11.23	1.50 ± 0.28	112.87 ± 28.77
Parental		36.07 ± 1.94	4.45 ± 1.34	8.56 ± 3.02

En cuanto a las resistencias pareciera que todas son buenos elementos de selección sobresaliendo la resistencia a ampicilina y kanamicina, el principal problema es que no sabemos cuál es el producto de biosíntesis de esta cepa ya que no se sabe con certeza que especie de *Streptomyces* es, dado a que ese género produce una amplia variedad de compuestos de mucha de las familias conocidas de moléculas con actividad antimicrobiana, únicamente podemos afirmar que la mutación con ampicilina posiblemente modificó de alguna manera la pared y con esto favoreció la secreción del metabolito (Chu, Zhang, Zhuang, Chen, & Li, 2002). Se tienen reportes de que la ampicilina y kanamicina son buenos elementos de selección para aumentar la producción de aminoglucósidos, (Himabindu et al., 2007), En cuanto a la resistencia a aminoglucósidos originada por una mutación se refiere, se tienen reportes que su sitio de unión para el impedimento de la síntesis de proteínas, es una de las proteínas de

las subunidad chica del ribosoma, al igual que otra familia de antibiótico, las tetraciclinas (Walsh, 2000), o bien cambiando algún sitio en la secuencia del ARN 16S (Jana & Deb, 2006), creyendo con esto que si la cepa es productora de alguno de estos antibióticos tienen una baja toxicidad contra nuestras cepas mutantes y con esto el aumento de la producción del antibiótico.

Se tienen reportes que con cepas mutantes de *S. clavuligerus* se logró aumentar la producción ácido clavulánico en 1.8 veces más que la cepa parental, utilizando UV como agente mutagénico, (Korbekandi et al., 2010); igualmente se tienen reportes que una cepa mutante de *Saccharopolyspora spinosa* produjo alrededor de 238 veces más de X antibiótico que la cepa parental, esto utilizando ramnosa y propionato de sodio como elemento de selección, estas moléculas son intermediarios tóxicos para la cepa (Liang et al., 2009); también se han logrado el incremento en la producción de avermectina por *S. avermitilis* de 30µg/mL a 254µg/mL u.

Genome Shuffling y fusión de protoplastos.

Después de realizar fusión de protoplastos y *Genome Shuffling* solo se consiguieron 8 cepas que muestran características fenotípicas mezcladas de las cepas mutantes con las que se inició el proceso; de ellas solo dos con un fenotipo resistente a ampicilina y kanamicina (ak), tres cepas con resistencia a tres de los antibióticos utilizados (2 cepas con resistencia a ampicilina, kanamicina y gentamicina (agk) y una cepa con resistencia a gentamicina kanamicina e higromicina (gkh), 3 cepas resultado de *Genome Shuffling* (GS), es decir, con las cuatro resistencias combinadas. Esto se logró dado a que se llevaron alrededor de 10 ronda de fusión en experimentos aislados, lo que nos indica que las tasas de recombinación son muy bajas lo que se traduce en un bajo número de fusionantes logradas.

Selección Primaria de Fusionantes

Para la selección primaria de las cepas fusionantes se usó la misma estrategia que con las mutantes de determinación del CoefHalo. En este caso se probaron todas las

colonias aisladas con fenotipos múltiples, dando como resultado la Tabla 22 donde se pueden observar que ninguna de estas tiene diferencias muy claras en el valor de CoefHalo con respecto de las otras, por lo que se optó por tomar las tres cepas más productoras en este sistema (ak1, GS2 y GS1), además que se eligió por no pasar por las microfermentación dado a su difícil manejo y las condiciones no apropiadas para el crecimiento del microorganismo. Cabe resaltar que las cepas fusionantes tienden a producir un mayor CoefHalo que las mutantes, sin embargo, en algunos casos es exactamente igual haciéndonos creer con esto que algunas cepas tendrán una producción similar a las cepas antes analizadas.

Tabla 21 Selección primaria de fusionantes, se muestran los diferentes valores de, el experimento se llevó a cabo en cajas de Petri con 30mL de medio GB1, 10 días de incubación, 30°C.

Cepa	Subconjunto para alfa = 0.05		
	1	2	3
gkh1	2.24		
agk1	2.44	2.44	
ak1	2.65	2.65	2.65
agk2	2.70	2.70	2.70
GS3	2.80	2.80	2.80
ak2	2.83	2.83	2.83
GS2		3.21	3.21
GS1			3.34

Selección Secundaria de Fusionantes

En la Figura número 17 se muestran las cinéticas de las cepas que fueron elegidas del primer sistema de selección; se puede observar que las cepas ak2 y GS2 tiene una producción aproximada de 1350 μ g/mL, esta se conoce gracias a la estimación que se hizo con gentamicina, mientras que la cepa GS2 tiene una producción estimada en 1490 μ g/mL. Con lo que respecta a la comparación con la progenitora que tuvo una mayor producción volumétrica (UVk18) se puede decir que GS1 y ak2 producen 1.73 veces más mientras que la cepa GS2 produce 1.91 veces más antibiótico que la mejor

cepa progenitora, sin embargo, a este resultado también se le debe de hacer una comparación con respecto a su producción específica.

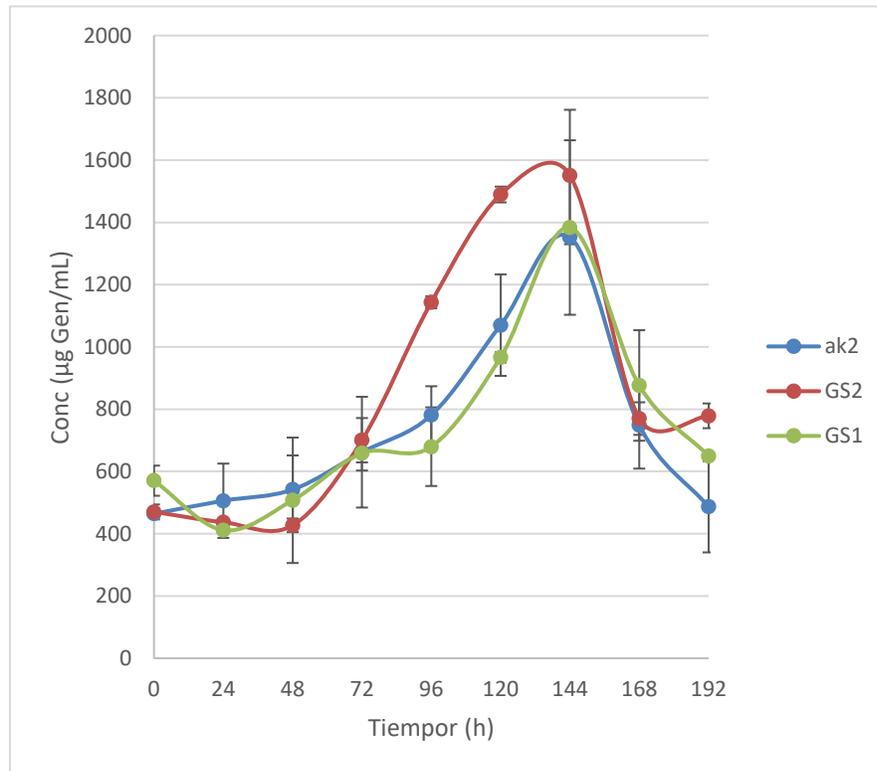


Figura 17 Cinética de cepas fusionantes, 100mL de medio de producción en matraces tridentados de 250mL, 200rpm, 30°C

Con lo que respecta a la producción específica se puede apreciar en la Tabla 15 una diferencia significativa de la cepa GS2 con respecto de las otras dos cepas fusionantes; sin embargo, con respecto de la producción específica de la cepa mutante cn mejor producción, se puede decir que nuestra cepa hiperproductora produce 3.71 veces más que la mejor

Tabla 22 Producción específica de las cepas fusionantes, 100mL de medio de producción en matraces tridentados de 250mL, 200rpm, 30°C.

	Producción ($\mu\text{gGen/mL}$)	Biomasa (mgX/mL)	Producción Específica ($\mu\text{gGen/mgX}$)
ak2	1352.87 \pm 23	5.00 \pm 1.41	282.53 \pm 84.51
GS1	1383.40 \pm 280.28	3.70 \pm 0.28	372.08 \pm 47.31
GS2	1551.16 \pm 210.31	1.80 \pm 0.14	859.82 \pm 49.29

cepa mutante (UVa14), mientras que si comparamos la producción de antibiótico de la cepa GS2 con respecto de la cepa parental inicial se logró el sorprendente aumento del 100 veces más cabe resaltar que el pico de máxima producción se mantuvo en el sexto día.

El método de *Genome Shuffling* ha demostrado ser un buen método de mejoramiento para cepas de importancia industrial, ya que en él se transfieren grandes trozos de ADN del genoma de las células progenitoras (Leja, Myszka, & Czaczyk, 2011). Gracias a este hecho se puede creer que las mutaciones conseguidas en la mutagénesis previa se transfieran de una cepa a la otra, siendo la resistencia a ampicilina, la que probablemente favorece la secreción del metabolito de interés y la resistencia a kanamicina dando con ello el cambio en un posible blanco acción del antibiótico. Se puede asegurar, gracias a los resultados obtenidos, que la combinación de resistencias kanamicina/ampicilina obtiene los mejores resultados si es que el trabajo solo se basara en fusión de protoplastos. En este trabajo se sugiere que la transferencia de ADN de una célula a otra es posible, rastreando fenotipos de interés. Hay varios ejemplos en la literatura en el que se ha usado un agente mutagénico en una cepa parental, seguida de diversas rondas de genome shuffling para obtener cepas mejoradas; por ejemplo, en el caso de la cepa *Saccharopolyspora spinosa* donde con UV diversificaron a su cepa parental de alta producción, y mediante 4 rondas de *Genome Shuffling* lograron obtener una cepa que produjo 4.36 veces más que a cepa parental (Zhihua Jin, Cheng, & Cen, 2006); para la cepa *Streptomyces avermitilis* iniciaron diversificando la cepa con metilnitronitrosoguanidina (MNNG) y UV, utilizando estreptomycin como elemento de selección y finalmente realizaron una

ronda de *Genome Shuffling* logrando producir 11.2 veces más que la cepa parental en cuanto a la producción de doramectina ; para una cepa de *Streptomyces rimosus* productora de oxitetraciclina se diversificaron las poblaciones con MNNG, estas se recombinaron con 6 rondas de *Genome Shuffling*, y se obtuvo una cepa capaz de producir 339% más que la cepa parental (Lu, Zhang, Liu, & Li, 2013). Para la cepa *Streptomyces pristinaespiralis* con 5 rondas de *Genome Shuffling* logrando conseguir una cepa que producía 154.9% más que la cepa parental, una cepa de alta producción de pristinamicina (Xu et al., 2008). Con la cepa *Streptomyces gilvosporeus* y mutagénesis con UV consiguieron diversificar las cepas y 5 rondas de *Genome Shuffling*, con una cepa de alta producción de natamicina consiguieron aumentar la producción un 379% con respecto a esta última cepa (Luo et al., 2012). Con la cepa *Streptomyces sp.* U121 se obtuvo población de mutantes fue obtenida por medio de MNNG además realizaron 3 rondas de *Genome Shuffling* produciendo 5 veces más que la cepa parental para la producción de ácido hidrocítrico (Hida, Yamada, & Yamada, 2007), estos resultados exitosos de *Genome Shuffling* sugieren que probablemente incrementando el número de rondas de *Genome Shuffling* se podría incrementar aún más la producción de antibiótico en nuestra cepa de *Streptomyces sp.*

Conclusiones

- La cepa que se mejoró genéticamente durante este trabajo fue identificada como una bacteria del género *Streptomyces*.
- Se lograron obtener 82 cepas mutantes resistentes a uno de los 4 antibióticos que se utilizaron para la selección; de estas, sólo 24 mostraron una mayor producción de antibiótico que la cepa parental.
- Con la mutagénesis y selección racional se lograron obtener 4 cepas sobreproductoras con resistencia a kanamicina (20µg/mL), ampicilina (250µg/mL), higromicina (26µg/mL) y gentamicina (12µg/mL).
- Las cepas UVh6, UVg1, UVa14 y UVk18 son las que tienen mayor producción (311, 305, 360 y 777µg/mL respectivamente), con respecto a producción específica no se muestran diferencias significativas entre ellas, siendo 217, 229, 210 y 231µg/mgX.
- Durante la recombinación por genome shuffling, sólo se obtuvieron 8 cepas fusionantes.
- De las tres cepas fusionantes evaluadas, sólo una mostró una producción mayor ¿que quién?, GS2, con una producción volumétrica de 1551µg/mL y producción específica de 859µgGen/mgX.
- El mejoramiento genético obtenido por genome shuffling mostro un aumento significativo en la producción del compuesto antimicrobiano comparado con la mutagénesis por UV y su posterior selección. Siendo similar a la suma de los aumentos de producción de las mutantes

Referencias

- Aquiahuatl-Ramos, Volke-Sepúlveda, T. Prado-Barragán, A. Shirai-Matsumoto, K. Ramírez-Vives, F. Salazar-González, M. (2012) Manual de prácticas de laboratorio Microbiología general. Univesidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa, México.
- Barrios-González, J., Fernández, F. J., & Tomasini, a. (2003). Microbial Secondary Metabolites Production and Strain Improvement. *Indian Journal of Biotechnology*, 2(July), 322–333.
- Biot-Pelletier, D., & Martin, V. J. J. (2014). Evolutionary engineering by genome shuffling. *Applied Microbiology and Biotechnology*. <http://doi.org/10.1007/s00253-014-5616-8>
- Carrasco-Ríos, L. (2009). Efecto de la radiación ultravioleta-B en plantas. *Idesia (Arica)*, 27(3), 59–76. <http://doi.org/10.4067/S0718-34292009000300009>
- Chu, J., Zhang, S., Zhuang, Y., Chen, J., & Li, Y. (2002). Factors affecting the biosynthesis and secretion of gentamicin. *Process Biochemistry*, 38(5), 815–820. [http://doi.org/10.1016/S0032-9592\(02\)00230-3](http://doi.org/10.1016/S0032-9592(02)00230-3)
- Escalante, L., Gonzalez, R., Obregon, A., & Sanchez, S. (1991). Carbon catabolite regulation of gentamicin formation. *The Journal of Antibiotics*, 45(4), 465–469.
- Flickinger, M.C. Drew, S.W. (1999). Bioprocess technology: fermentation, biocatalysis and bioseparation. John Wiley & Sons, Inc.
- Gong, J., Zheng, H., Wu, Z., Chen, T., & Zhao, X. (2009). Genome shuffling: Progress and applications for phenotype improvement. *Biotechnology Advances*, 27(6), 996–1005. <http://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2009.05.016>
- Hida, H., Yamada, T., & Yamada, Y. (2007). Genome shuffling of *Streptomyces* sp. U121 for improved production of hydroxycitric acid. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 73, 1387–1393. <http://doi.org/10.1007/s00253-006-0613-1>
- Himabindu, M., Potumarthi, R., & Jetty, A. (2007). Enhancement of gentamicin production by mutagenesis and non-nutritional stress conditions in *Micromonospora echinospora*. *Process Biochemistry*, 42(9), 1352–1356. <http://doi.org/10.1016/j.procbio.2007.05.002>
- Himabindu, M., Ravichandra, P., Vishalakshi, K., & Jetty, A. (2006). Optimization of critical medium components for the maximal production of gentamicin by *Micromonospora echinospora* ATCC 15838 using response surface methodology. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 134(2), 143–154. <http://doi.org/10.1385/ABAB:134:2:143>
- Hobbs, G., Frazer, C., Gardner, D. J., Cullum, J., & Oliver, S. (1989). Dispersed growth of *Streptomyces* in liquid culture. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 31(3), 272–277. <http://doi.org/10.1007/BF00258408>
- Hopwood, D.A. (2007). *Streptomyces in Nature and Medicine: The Antibiotic Markers*. John Innes Center, Oxford University Press.

- Jana, S., & Deb, J. K. (2006). Molecular understanding of aminoglycoside action and resistance. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 70(2), 140–150. <http://doi.org/10.1007/s00253-005-0279-0>
- Jin, Z., Cheng, X., & Cen, P. (2006). Effects of glucose and phosphate on spinosad fermentation by *Saccharopolyspora spinosa*. *Chinese Journal of Chemical Engineering*, 14(2005), 542–546. [http://doi.org/10.1016/S1004-9541\(06\)60111-0](http://doi.org/10.1016/S1004-9541(06)60111-0)
- Jin, Z., Wu, J., Zhang, Y., Cheng, X., Yang, L., & Cen, P. (2006). Improvement of spinosad producing *Saccharopolyspora spinosa* by rational screening. *Journal of Zhejiang University SCIENCE A*, 7, 366–370. <http://doi.org/10.1631/jzus.2006.AS0366>
- Khattab, A. A., & Abdel-aziz, M. S. (2012). Mutation induction and protoplast fusion of, 8(2), 807–814.
- Kieser T, Bibb MJ, Butner MJ, Chatter KF and Hopwood DA. Practical Streptomyces Genetics. The John Innes Foundation, UK (2000)
- Kim, H. J., White-Phillip, J. a, Ogasawara, Y., Shin, N., Isiorho, E. a, & Liu, H. (2010). Biosyn Spinosyn Permethylated Rhamnose & Characterization of the Functions of SpnH, SpnI, SpnK, 132, 2901–2903. <http://doi.org/doi: 10.1021/ja910223x>
- Korbekandi, H., Darkhal, P., Hojati, Z., Abedi, D., Hamed, J., & Pourhosein, M. (2010). Overproduction of clavulanic acid by UV mutagenesis of streptomyces clavuligerus. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*, 9(2), 177–181. <http://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2007.07.931>
- Latorre, M. (2008). Obtención y caracterización bioquímica de un enzima de resistencia a antibióticos aminoglucósidos: 6-Adenil Transferasa de *Bacillus subtilis*. Universidad Complutense de Madrid, Facultad de Ciencias Biológicas, Departamento de Bioquímica y biología Molecular, España.
- Leja, K., Myszka, K., & Czaczyk, K. (2011). Genome shuffling: A method to improve biotechnological processes. *Biotechnologia*, 92(4), 345–351.
- Liang, Y., Lu, W., & Wen, J. (2009). Improvement of saccharopolyspora spinosa and the kinetic analysis for spinosad production. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 152, 440–448. <http://doi.org/10.1007/s12010-008-8281-5>
- Lu, Z., Zhang, D., Liu, Z., & Li, Y. (2013). Nitrosoguanidine Mutagenesis and Genome Shuffling Enhanced the Oxytetracycline Production of *Streptomyces rimosus*, 4(6), 23–27.
- Luo, J. M., Li, J. S., Liu, D., Liu, F., Wang, Y. T., Song, X. R., & Wang, M. (2012). Genome shuffling of *Streptomyces gilvosporeus* for improving natamycin production. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(23), 6026–6036. <http://doi.org/10.1021/jf300663w>
- Meenavilli, H., Potumarthi, R., & Jetty, A. (2008). Gentamicin production by *Micromonospora echinospora* (Me- 22) in stirred tank reactor: effect of various parameters. *Journal of Basic Microbiology*, 48(1), 53–58. <http://doi.org/10.1002/jobm.200700116>

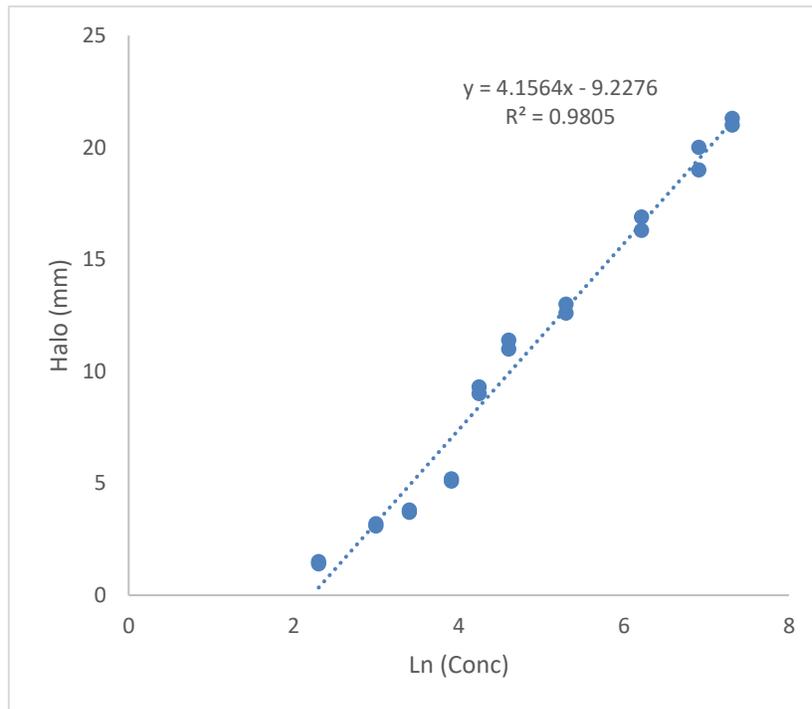
- Miller, J. H. (1985). Mutagenic specificity of ultraviolet light. *Journal of Molecular Biology*, 182(1), 45–65. [http://doi.org/10.1016/0022-2836\(85\)90026-9](http://doi.org/10.1016/0022-2836(85)90026-9)
- Okanishi, M., Suzuki, K., & Umezawa, H. (1974). Formation and reversion of Streptomyces protoplasts: cultural condition and morphological study. *Journal of General Microbiology*, 80(2), 389–400. <http://doi.org/10.1099/00221287-80-2-389>
- Perarltta-Valle, O. (2013). Identificación y caracterización parcial de un antibiótico proveniente de *Streptomyces paucisporogenes*. Universidad Autónoma Metropolitana Departamento de Biotecnología, México.
- Petri, R., & Schmidt-Dannert, C. (2004). Dealing with complexity: Evolutionary engineering and genome shuffling. *Current Opinion in Biotechnology*. <http://doi.org/10.1016/j.copbio.2004.05.005>
- Pigac, J., Hranueli, D., Smokvina, T., & Alačević, M. (1982). Optimal Cultural and Physiological Conditions for Handling Streptomyces rimosus Protoplasts. *Applied and Environmental Microbiology*, 44(5), 1178–1186. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC242166/pdf/aem00180-0174.pdf>
- Rainey, F. a, Ward-Rainey, N., Kroppenstedt, R. M., & Stackebrandt, E. (1996). The genus Nocardopsis represents a phylogenetically coherent taxon and a distinct actinomycete lineage: proposal of Nocardopsaceae fam. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 46(4), 1088–1092. <http://doi.org/10.1099/00207713-46-4-1088>
- Roldán-Tapia, M. (2011). Producción heteróloga de péptidos sintéticos con actividad antimicrobiana. Universidad Autónoma Metropolitana, posgrado en Biología Experimental, México.
- Siddique, S., Syed, Q., Adnan, A., & Qureshi, F. A. (2014). Production and Screening of High Yield Avermectin B1b Mutant of Streptomyces avermitilis 41445 Through Mutagenesis. *Jundishapur Journal of Microbiology*, 7(2), 1–8. <http://doi.org/10.5812/jjm.8626>
- Walsh, C. (2000). Molecular mechanisms that confer antibacterial drug resistance. *Nature*, 406(6797), 775–781. <http://doi.org/10.1038/35021219>
- Wonden, A. (2009). DNA Extraction - CTAB Method Revisado el 14 de septiembre de 2017 en: https://www.mbari.org/wp-content/uploads/2015/11/CTAB-DNA-Extract_GenomeSeq-quality.pdf
- Xu, B., Jin, Z., Wang, H., Jin, Q., Jin, X., & Cen, P. (2008). Evolution of Streptomyces pristinaespiralis for resistance and production of pristinamycin by genome shuffling. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 80(2), 261–267. <http://doi.org/10.1007/s00253-008-1540-0>
- Zhang, J., Wang, X., Diao, J., He, H., Zhang, Y., & Xiang, W. (2013). Streptomycin resistance-aided genome shuffling to improve doramectin productivity of Streptomyces avermitilis NEAU1069. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 40(8), 877–889. <http://doi.org/10.1007/s10295-013-1280-8>
- Zhu, X., Zhang, W., Chen, X., Wu, H., Duan, Y., & Xu, Z. (2010a). Generation of high

rapamycin producing strain via rational metabolic pathway-based mutagenesis and further titer improvement with fed-batch bioprocess optimization. *Biotechnology and Bioengineering*, 107(3), 497–505. <http://doi.org/10.1002/bit.22825>

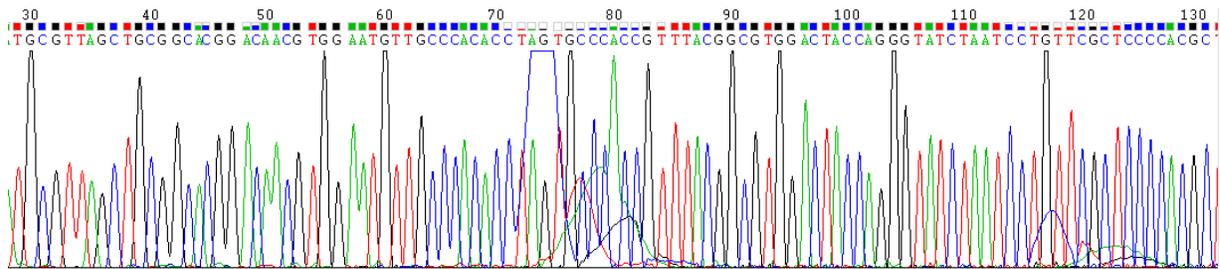
Zhu, X., Zhang, W., Chen, X., Wu, H., Duan, Y., & Xu, Z. (2010b). Generation of high rapamycin producing strain via rational metabolic pathway-based mutagenesis and further titer improvement with fed-batch bioprocess optimization. *Biotechnology and Bioengineering*, 107(3), 497–505. <http://doi.org/10.1002/bit.22825>

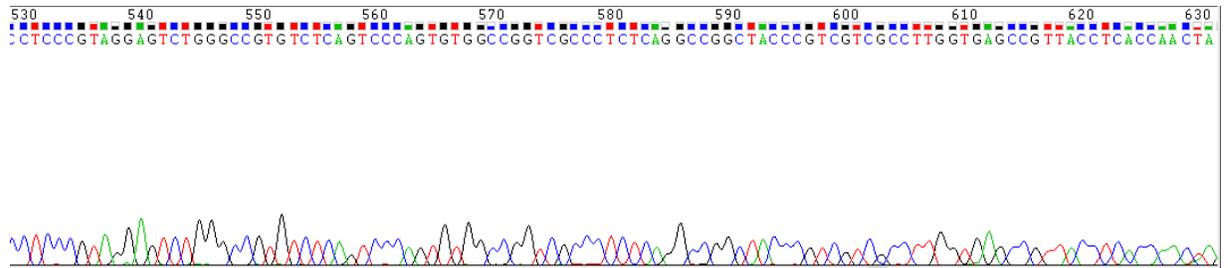
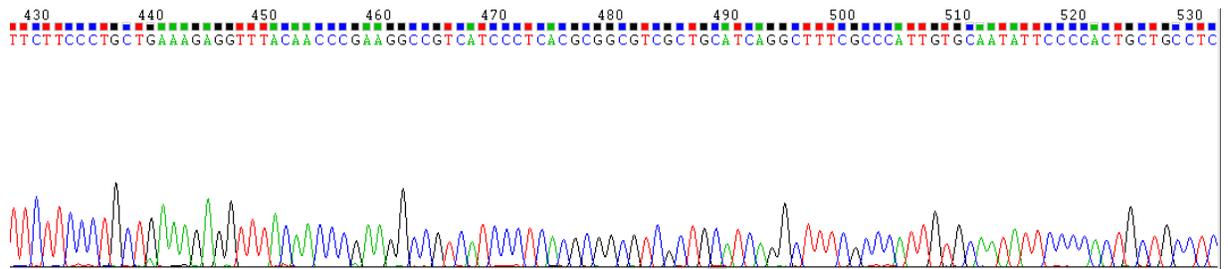
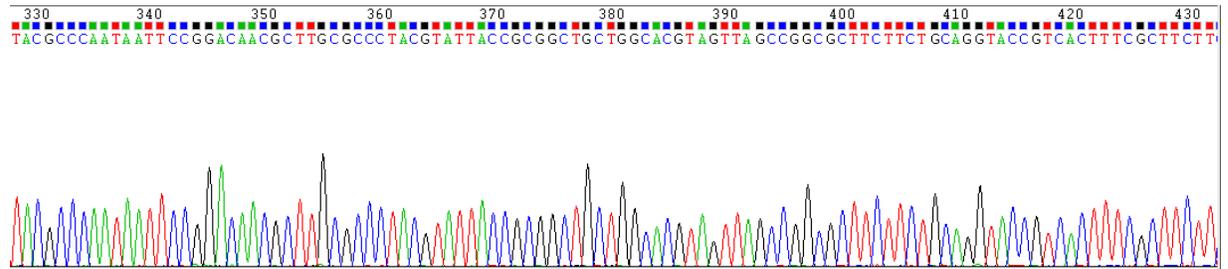
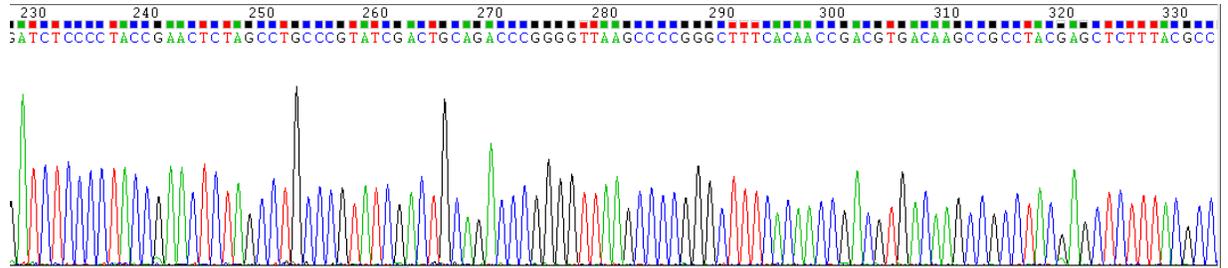
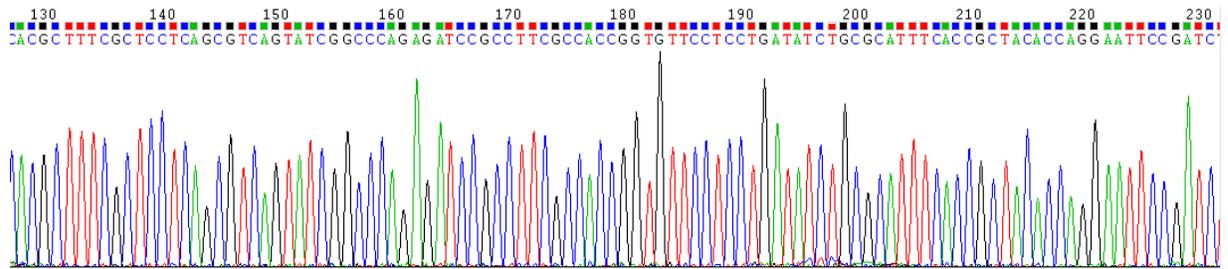
Anexos

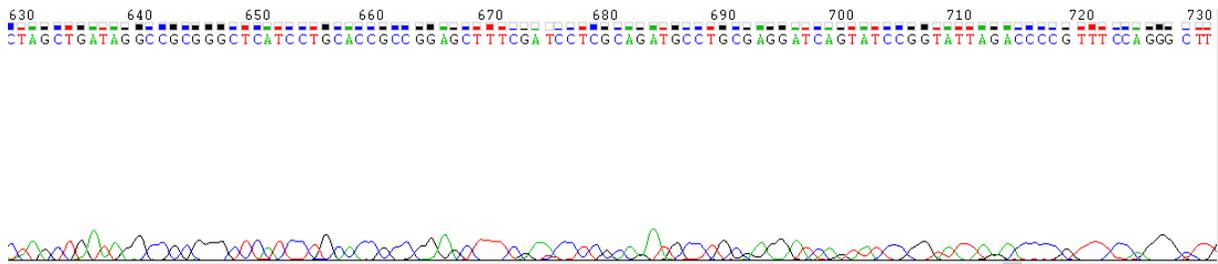
Curva Patrón Para la cuantificación de Actividad antimicrobiana



Electroferograma de ARNr 16S







Selección Primaria

Gentamicina

ANOVA

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	28.530	14	2.038	123.584	.000
Intra-grupos	.247	15	.016		
Total	28.777	29			

Kanamicina

ANOVA

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	27.889	31	.900	87.723	.000
Intra-grupos	.328	32	.010		
Total	28.217	63			

Higromicina

ANOVA

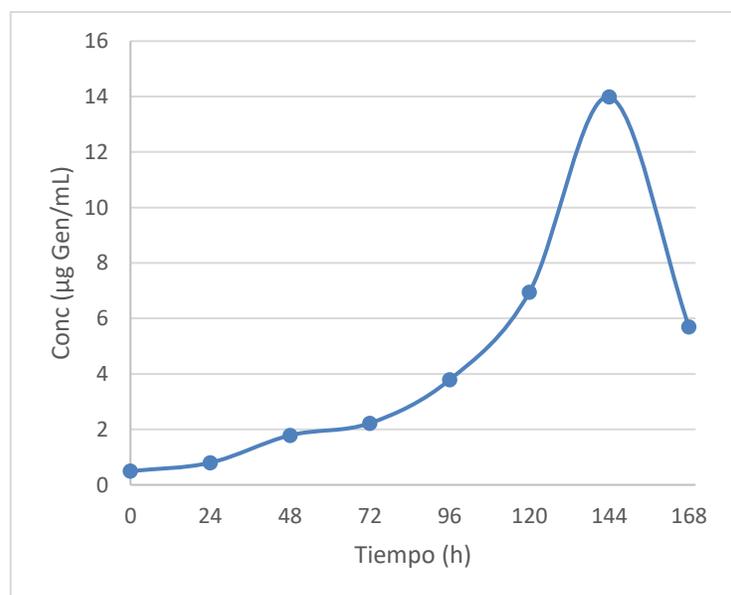
	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	6.034	11	.549	94.235	.000
Intra-grupos	.070	12	.006		
Total	6.103	23			

Ampicilina

ANOVA

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	58.664	26	2.256	137.943	.000
Intra-grupos	.442	27	.016		
Total	59.106	53			

Cinética de producción de agente antimicrobiano de la cepa parental en microfermentación



Producción Especifica de mutantes

ANOVA

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	101906.354	10	10190.635	14.021	.000
Intra-grupos	7994.686	11	726.790		
Total	109901.041	21			

Selección Primaria fusionantes

ANOVA

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	2.061	7	.294	4.837	.009
Intra-grupos	.730	12	.061		
Total	2.791	19			



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

ACTA DE EXAMEN DE GRADO

No. 00245
Matrícula: 2143802548

DESARROLLO DE UN SISTEMA
PARA EL MEJORAMIENTO
GENÉTICO DE *Streptomyces sp.*

En la Ciudad de México, se presentaron a las 15:00 horas del día 5 del mes de diciembre del año 2017 en la Unidad Iztapalapa de la Universidad Autónoma Metropolitana, los suscritos miembros del jurado:

- DR. JAVIER BARRIOS GONZALEZ
- DR. ANGEL EDUARDO ABSALON CONSTANTINO
- DR. FRANCISCO JAVIER FIGUEROA MARTINEZ
- DR. OCTAVIO LOERA CORRAL

Bajo la Presidencia del primero y con carácter de Secretario el último, se reunieron para proceder al Examen de Grado cuya denominación aparece al margen, para la obtención del grado de:

MAESTRO EN BIOTECNOLOGIA

DE: GERARDO SANTANDER RODRIGUEZ

y de acuerdo con el artículo 78 fracción III del Reglamento de Estudios Superiores de la Universidad Autónoma Metropolitana, los miembros del jurado resolvieron:

Aprobar

Acto continuo, el presidente del jurado comunicó al interesado el resultado de la evaluación y, en caso aprobatorio, le fue tomada la protesta.



GERARDO SANTANDER RODRIGUEZ
ALUMNO

REVISÓ

LIC. JULIO CESAR DE LARA ISASSI
DIRECTOR DE SISTEMAS ESCOLARES

SECRETARIA ACADÉMICA DE LA DIVISIÓN DE
CBS

DRA. MARGARITA ELIZABETH GALLEGOS
MARTINEZ

PRESIDENTE

DR. JAVIER BARRIOS GONZALEZ

VOCAL

DR. ANGEL EDUARDO ABSALON
CONSTANTINO

VOCAL

DR. FRANCISCO JAVIER FIGUEROA
MARTINEZ

SECRETARIO

DR. OCTAVIO LOERA CORRAL