



**Universidad Nacional Autónoma de México**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
CUAUTITLAN**

**OBTENCION DE UNA MUTANTE DE Bacillus subtilis  
HIPERPRODUCTORA DE BACITRACINA.**

# **Tesis Profesional**

**Que para obtener el Título de  
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO**

**p r e s e n t a**

**ELSA P. FLORES CASTELLANOS**

**México, D. F.**

**1985**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



## **UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso**

### **DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## I N D I C E

|   |    |
|---|----|
| INTRODUCCION.....   | 1  |
| MATERIALES.....   | 10 |
| METODOS.....  | 13 |
| I.- Conservación de las cepas.....  | 13 |
| II.- Caracterización de la cepa.....  | 14 |
| A.- Determinación del carácter pro-<br>tótrofo ó auxótrofo de las ce-<br>pas <u>Bacillus subtilis</u> ..... | 14 |
| B.- Curva de crecimiento.....   | 16 |
| III.- Identificación de la Bacitracina -<br>por cromatografía en capa fina....                              | 17 |
| IV.- Cuantificación del antibiótico ( <u>Ba</u><br>citracina) por el Método Microbio-<br>lógico.....        | 18 |
| A.- Obtención de la mutante.....  | 19 |
| B.- Obtención del cultivo de <u>Micro</u><br><u>coccus flavus</u> .....                                     | 19 |
| C.- Proceso de cuantificación....   | 20 |
| V.- Elaboración de la curva tipo para-<br>la cuantificación de Bacitracina..                                | 21 |
| VI.- Proceso de mutación.....   | 22 |
| A.- Determinación del tiempo y la-<br>concentración óptima de 9- <u>ami</u><br>noacridina (9AA).....        | 22 |
| B.- Selección de la mutante.....  | 25 |
| RESULTADOS.....   | 26 |
| I.- Características de la cepa <u>Baci---</u><br><u>llus subtilis</u> ATCC 6633.....                        | 26 |
| A.- Morfología colonial y micros-<br>cópica.....  | 26 |
| B.- Características de crecimen-<br>to.....   | 26 |

|       |  |    |
|-------|--|----|
| C.-   | Determinación del carácter --<br>protótrofo ó auxótrofo.....   | 27 |
| II.-  | Determinación de la producción de<br>Bacitracina por la cepa <u>Bacillus -</u><br><u>subtilis</u> ATCC 6633..... | 27 |
| A.-   | Curva tipo.....  | 31 |
| B.-   | Cuantificación del antibiótico<br>producido por la cepa silves--<br>tre.....                                     | 31 |
| C.-   | Identificación del antibiótico<br>producido por la cepa.....   | 31 |
| D.-   | Cinética de producción del an--<br>tibiótico.....  | 34 |
| III.- | Obtención de mutantes hiperproduc--<br>toras de Bacitracina.....   | 37 |
| A.-   | Determinación de las condicio--<br>nes óptimas de mutación.....  | 37 |
| B.-   | Tratamiento mutagénico y selec--<br>ción de mutantes.....  | 40 |
| IV.-  | Caracterización de la cepa mutante<br>GM 2000.   |    |
| A.-   | Morfología colonial y microscó--<br>pica.....  | 45 |
| B.-   | Características de crecimien--<br>to.....  | 45 |
| C.-   | Determinación del carácter au--<br>xótrofo ó protótrofo.....   | 46 |
| D.-   | Identificación del antibiótico<br>producido.....   | 50 |
| E.-   | Cuantificación de la Bacitraci--<br>na.....  | 50 |
| F.-   | Estabilidad de la mutación....   | 53 |

|   |    |
|---|----|
| V.- Cinética de producción de Bacitracina por la cepa <i>B. subtilis</i> GM 2000..... | 53 |
| VI.- Obtención de mutantes hiperproductoras a partir de la cepa GM 2000.....          | 58 |
| A.- Determinación de las condiciones óptimas de mutación.....                         | 58 |
| B.- Tratamiento mutagénico y selección de las mutantes.....                           | 58 |
| DISCUSION.....  | 64 |
| CONCLUSIONES.....   | 76 |
| RESUMEN.....  | 78 |
| BIBLIOGRAFIA.....   | 81 |

## I N T R O D U C C I O N

Los microorganismos del género Bacillus son bacterias aerobias estrictas Gram +, que tienen forma bacilar y que se caracterizan por formar largas cadenas de bacilos. Además forman esporas cuando crecen en medio mínimo (7).

Durante la fase de iniciación de la esporulación varias especies del género Bacillus elaboran enzimas como las Proteasas, Penicilinasas, Nucleasas, Fosfatasa, Esterasas y Carbohidrasas, además de antibióticos polipeptídicos. (27).

Recientemente Vitkovic y Sadoff han demostrado que hay cierta relación genética entre la producción de enzimas proteolíticas como las Proteasas, la producción de antibióticos polipeptídicos y la fase de esporulación del microorganismo (36).

Entre los antibióticos producidos por diferentes especies de Bacillus, algunos son lineales y otros son cíclicos, como ejemplo podemos mencionar: Bacitracina (B. licheniformis), Gramicidina S. (B. brevis), Polimixina (B. polymixa), Colistina (B. Colistenus), Micobacillina, Bacillina y Bacitracina (B. subtilis) (17, 24).

La Bacitracina, un antibiótico de tipo polipeptídico, fué descubierta por Balbina A. Johnson en --- 1943 y a partir de esa fecha ha sido objeto de una serie de estudios. Se ha demostrado mediante estudios de sus propiedades físicas, químicas y biológicas que el antibiótico es un polvo amorfo blanco, altamente higroscópi-

co soluble en agua y en otros solventes (18).

Es muy inestable si se encuentra mezclado con otras sustancias como el cobre. Su estabilidad máxima en solución acuosa está en un intervalo de pH de 4 a 5.

Ciertas formas comerciales de Bacitracina pura se encuentran mezcladas con  $Zn^{++}$ , ya que se ha demostrado que es más estable a los efectos del calor y al almacenamiento que la Bacitracina natural. Por otro lado se sabe que cuando disminuye su estabilidad, disminuye también su potencia (18).

Estos y otros estudios de composición y propiedades físicas y químicas han permitido establecer la existencia de diferentes tipos de Bacitracinas que se han denominado: A, A', B, C, E, F, F<sub>1</sub>, F<sub>2</sub>, F<sub>3</sub> y G; la Bacitracina A es la más activa biológicamente y las B y C son menos activas que A, pero su actividad es bastante mayor que la del resto.

La fórmula química de la Bacitracina A es la siguiente: (C<sub>65</sub> H<sub>103</sub> O<sub>16</sub> N<sub>17</sub> S), y su estructura se muestra en la figura No. 1.

Como se puede observar, el antibiótico es un dodecapéptido. Además la molécula contiene un ciclo hexapeptídico y otro thiazolina (9).

Por otra parte la Bacitracina puede ser identificada mediante cromatografía en papel y en capa fina. Existen varios sistemas de solventes que se emplean para resolverla. Algunos de ellos son: t-butanol-Ac. acé-



tico-agua (60:60:34); acetona- agua (70:30) con atmósfera de amoníaco; etanol- agua (80:20) y n-butanol- Ac. acético- agua (4:1:2) entre otros (19). Este último es el -- más comunmente empleado. Conforme a lo que reporta la bibliografía revisada se sabe que la Bacitracina produce Rfs que van desde 0.2 hasta 0.71 (35) y que éstos valores dependen del tipo de Bacitracina y del sistema de solventes utilizado.

La producción del antibiótico por el microorganismo depende de una serie de factores: oxigenación del medio; presencia de iones  $Mg^{++}$  y  $Mn^{++}$ , y de fuentes de -- carbono y nitrógeno; esporulación de la cepa y producción de Proteasas, entre otras.

La Bacitracina es un antibiótico que tiene diferentes usos y aplicaciones:

- a) Como un potente agente antimicrobiano en -- contra de bacterias Gram + y Gram - en la clínica humana y veterinaria.

En la clínica humana se emplean las presentaciones altamente purificadas y su aplicación podría ser amplia sino fuera por su elevada nefrotoxicidad y ototoxicidad. Debido a lo anterior su uso es casi exclusivamente tópico (7).

- b) Como aditivo no nutriente en las dietas para animales (principalmente aves de corral). En éste caso se emplean las presentaciones menos puras y de baja potencia. El uso de

los antibióticos como aditivos no nutrientes en los alimentos tiene varios beneficios como son mejorar la eficiencia nutricional del alimento utilizado, incrementar el crecimiento de los animales jóvenes y reducir los niveles de las enfermedades de los mismos (18).

De los usos de la Bacitracina mencionados el más importante es su empleo como aditivo no nutriente en los alimentos para animales.

Por otra parte se sabe que desde que se descubrieron los antibióticos y se emplearon como antimicrobianos se desarrollaron procesos de producción a nivel industrial.

Uno de los principales objetivos en la producción industrial es que ésta sea económicamente redituable, para ello se buscan técnicas de obtención aplicables a éste nivel (15, 25).

Con base a lo anterior se han desarrollado técnicas por medio de las cuales se obtienen mejores microorganismos en relación no sólo a la cantidad sino al tiempo de producción del antibiótico deseado, como son la obtención de mutantes. Los programas de obtención de éstos microorganismos hiperproductores se caracterizan por ser laboriosos y tardados y consisten, simplemente, en exponer a la cepa silvestre (que en forma natural produce el metabolito secundario) al agente mutagénico y seleccionar posteriormente (de las clonas sobrevivientes) a la mutante hiperproductora (11).

Por otro lado se sabe que las mutaciones son - aquéllas modificaciones que puede sufrir un organismo a - nivel de su DNA y que son permanentes y hereditarias.

Las alteraciones producidas en el material genético pueden ser: Cambios en el número de cromosomas, - cambios en la estructura del cromosoma y cambios dentro - de un solo gene. El primer tipo de alteraciones se presentan exclusivamente en células eucarióticas y los otros dos tanto en eucarióticas como en procarióticas.

Los cambios en el número de cromosomas son conocidos también como poliploidias y como su nombre lo indica son el resultado de un cambio en el número de cromosomas por la pérdida ó adquisición de uno ó más cromosomas ó un grupo completo de ellos.

Los cambios en la estructura del cromosoma son conocidos como rearrreglos del material genético. Los - cuatro tipos de rearrreglos más importantes son:

- a) Delecciones ó deficiencias.
- b) Duplicaciones.
- c) Inversiones.
- d) Translocaciones.

Los cambios en un solo gene pueden ser mutaciones puntuales y mutaciones por corrimiento de fase ó --- "frameshift" (33).

Hay dos tipos de mutaciones puntuales: Las --- transiciones, donde hay el cambio de una base púrica por-

otra púrica ó de una pirimidica por otra pirimidica en el DNA, y las transversiones donde hay el cambio de una base púrica por una pirimidica ó viceversa.

Las mutaciones por corrimiento de fase ó mutaciones "frameshift" se deben a la pérdida ó a la adición de uno ó dos pares de bases en el DNA y conducen a un corrimiento de la lectura del mRNA durante la síntesis -- de proteínas.

Por otro lado se sabe que éstas alteraciones se producen en forma espontánea como respuesta a cambios en el medio ambiente y además se conocen una serie de agentes (físicos, químicos y biológicos) que pueden aumentar la frecuencia de mutación.

Dentro de los agentes químicos podríamos citar:

- a) Análogos de base: Los análogos de base son compuestos cuya estructura molecular es muy similar a los compuestos que naturalmente se emplean para la síntesis del DNA y de ahí que sean capaces de sustituirlos durante la replicación del DNA. Ejemplo: 5- bromo uracilo.
- b) Mutágenos que alteran la estructura química del DNA: Estos compuestos actúan modificando la composición química de los nucleótidos constituyentes de los ácidos nucleicos, así su acción es independiente de la replicación del DNA. Ejemplos: Hidroxilamina -- ( $\text{NH}_2\text{OH}$ ), ácido nitroso ( $\text{HNO}_2$ ) y los agentes

alquilantes.

- c) Compuestos que se intercalan en el DNA: Las acridinas como la proflavina, acriflavina, naranja de acridina y los compuestos ICR\* - son los principales compuestos que producen éste tipo de efecto.

Se sabe que éstos son moléculas bastante -- planas que son capaces de unirse al DNA, intercalándose entre pares de bases adyacentes obligándolas a separarse, de tal manera que se distorciona la doble hélice del DNA- (33, 34).

\* Institute of Cáncer Research.

Por otro lado, en México la Bacitracina se emplea principalmente como aditivo no nutriente en las dietas para aves de corral. Se sabe que el consumo anual de alimentos balanceados por gallina ponedora es de:----- 37,960 Kg. y el consumo de Bacitracina (en su presentación Bacitracina-zinc) para la producción de éstos alimentos, fué de 324 Toneladas en 1980 (22).

A pesar de lo anterior el antibiótico no se produce en México y por ello es necesario satisfacer su demanda mediante importación. Esta situación justifica el desarrollar en el país un proceso de producción del antibiótico. Con éste fin se desarrollará un proyecto de trabajo que incluye los siguientes OBJETIVOS:

- A) Obtener una mutante de Bacillus subtilis-hiperproductora de Bacitracina.
- B) Comprobar que la mutación sea estable.

## M A T E R I A L E S

### I.- Medios de cultivo.

- a) Medio para antibióticos No. 2.  
Medio elaborado por Bioxón, preparar siguiendo las instrucciones del fabricante.
- b) Medio para antibióticos No. 1.  
Medio elaborado por Bioxón, preparar de acuerdo con las instrucciones del fabricante.
- c) Medio de producción del antibiótico.  
Este medio se utiliza para la producción de Bacitracina. Disolver en 1000 ml de agua destilada: soytona 20.0 g. peptona de gelatina 10.0 g. dextrosa 10.0 g.  $K_2SO_4$  1.0 g,  $MnSO_4$  0.01 g. Ajustar el pH a 7.0 con NaOH y esterilizar en autoclave a 15 lb durante 15 minutos.
- d) Medio 56/2.  
adicionar a 1000 ml de agua destilada: --  $KH_2PO_4$  6.8 g;  $(NH_4)_2SO_4$  1.0 g; solución de  $MgSO_4 \cdot 7 H_2O$  al 20%, 0.5 ml; solución de  $FeSO_4 \cdot 7 H_2O$  al 0.1%, 0.25 ml y solución de  $CaCl_2$  al 1%, 0.5 ml. Ajustar el pH a 7.0 7.2 con NaOH y esterilizar en autoclave a 15 lb durante 15 minutos.
- e) Medio 56/2 más glucosa (Medio Mínimo).  
Preparar en forma similar al anterior, con una pequeña modificación. Adicionar a cada 990 ml de medio, 10 ml de una solución-

de dextrosa al 20% esterilizada a 10 lb durante 10 minutos.

f) Medio rico A3 sólido.

Este medio se utilizó para determinar el número de células viables. Disolver en 1000-ml: extracto de levadura 3.0 g, peptona de gelatina 6.0 g, extracto de carne 1.5 g, -- dextrosa 1.0 g, agar bacteriológico 15 g, - NaCl 3.5 g,  $K_2HPO_4$  3.68 g,  $KH_2PO_4$  1.32 g. - Ajustar el pH a 7.0-7.2 con NaOH y esterilizar en autoclave a 15 lb durante 15 minutos.

g) Medio rico A3 líquido.

Preparar en forma similar al anterior, pero sin adicionar agar bacteriológico.

h) Caldo nutritivo.

Medio elevado por Bioxón, preparar siguiendo las instrucciones del fabricante.

II.- Cepas utilizadas.

a) Bacillus subtilis ATCC 6633.

b) Micrococcus flavus ATCC 10240

III.- Soluciones.

a) Solución salina fisiológica.

Pesar 8.5 g de NaCl y disolver en 1000 ml - de agua destilada. Esterilizar en autoclave a 15 lb durante 15 minutos.

b) Regulador de fosfatos.

Pesar 2.0 g de  $K_2HPO_4$  y 8.0 g de  $KH_2PO_4$  disolverlos en 1000 ml de agua destilada.

Ajustar el pH a 6.0 con KOH y esterilizar - en autoclave a 15 lb durante 15 minutos.

- c) Solución de Bacitracina (100 microgramos/ml). Pesar 16.835 mg de Bacitracina Sigma, disolverlos regulador de fosfatos y aforar a 10-ml en un matraz aforado.

#### IV.- Otros.

- a) Placas para cromatografía en capa fina.

Se emplearon placas de sílica gel (D.C. fertigtplatten KIESELGEL 60) merck. De 20 X - 20 cm. y 0.25 mm de grosor de la sílica gel.

## M E T O D O S

### I.- Conservación de las cepas.

- a) La cepa de Micrococcus flavus ATCC 10240- (microorganismo de prueba) se conserva en medio para antibióticos No. 2 (Bioxón), sembrando por estría sobre la superficie del medio envasado en tubos con tapón de rosca, e incubando durante 24 horas a 37°C. Posteriormente la cepa se mantiene en refrigeración (4°C) haciéndose resiembras cada 15 días.
- b) Las cepas de Bacillus subtilis se conservaron de dos formas:
  - 1.- La cepa de Bacillus subtilis ATCC 6633 y las mutantes de ésta cepa se conservaron en medio para antibióticos No. 2 (Bioxón) envasado en tubos con tapón de rosca que se mantienen en forma inclinada hasta solidificación. Sembrar cada una de las cepas por estría, sobre la superficie del medio a incubar a 37°C durante 24 horas. Posteriormente las cepas se mantienen en refrigeración, haciéndose resiembras cada tres meses.
  - 2.- Producción de esporas de las cepas de Bacillus subtilis.
    - Inocular 5 ml de caldo nutritivo con una asada del microorganismo.
    - Incubar a 37°C durante 5 horas con agita-

ción fuerte.

- Transferir 2.5 ml del caldo anterior a una matraz erlenmeyer de 1 litro, conteniendo 300 ml de caldo nutritivo.
- Incubar a 37°C durante 24 horas con agitación fuerte.
- Centrifugar durante 30 minutos a 9000 rpm.
- Eliminar el sobrenadante y lavar el paquete celular con agua destilada estéril.
- Centrifugar nuevamente y resuspender el paquete en 10 ml de agua destilada estéril.
- Destruir las formas vegetativas mediante tratamiento con 3 ml de Lizosima durante 20 minutos a 50°C.
- Centrifugar durante 30 minutos a 9000 rpm, eliminar el sobrenadante y lavar las esporas dos veces con agua destilada.
- Resuspender el paquete en 10 ml de agua -- destilada.
- Hacer cuenta viable en cajas con medio A3.
- Conservar en refrigeración hasta su utilización.

## II.- Caracterización de la cepa.

### A.- Determinación del carácter protótrofo ó auxótrofo de las cepas de Bacillus subtilis.

Esta determinación se realizó empleando dos métodos diferentes que se describen a continuación.

#### 1.- Método en medio sólido.

- a) Inocular un tubo conteniendo 5 ml de medio A3 con una asada de microorganismo.
- b) Incubar durante 24 horas a 37°C.
- c) Inocular un matraz de 125 ml conteniendo 10 ml de medio A3 con 0.2 ml del cultivo anterior e incubar a 37°C con agitación fuerte hasta llegar a fase logarítmica (aproximadamente 4 horas para la cepa B. subtilis ATCC 6633).
- d) Centrifugar durante 30 minutos a 9000-rpm y eliminar el sobrenadante.
- e) Lavar dos veces las células con 10 ml de solución salina.
- f) Resuspender las células en 5 ml de solución salina y hacer cuenta viable en cajas con medio A3 y en cajas con medio 56/2 más glucosa.
- g) Incubar a 37°C durante 24 horas las cajas con medio A3 y 48 horas las cajas con medio 56/2 más glucosa.
- h) Contar y sacar el título de bacterias.

## 2.- Método en medio líquido.

- a) Seguir los mismos pasos descritos en los incisos IIA 1a. hasta el IIA 1e.
  - Inocular 9 ml de medio 56/2 más glucosa contenido en un matraz Erlenmeyer de 125 ml con 1.0 ml de la suspensión obtenida anteriormente.
  - Incubar a 37°C con agitación fuerte durante 1 y 3 horas y sembrar sobre cajas con medio A3, diluciones adecuadas

de cada cultivo.

- Incubar a 37°C durante 24 horas
  - Contar y, sacar el título de bacterias
- b) Seguir los pasos descritos en los incisos-  
IIA 1a. al IIA 1e.
- Inocular 9 ml de medio A3 contenido en un-  
matraz erlenmeyer de 125 ml con 1.0 ml de-  
la suspensión obtenida anteriormente.
  - Incubar a 37°C con agitación fuerte duran-  
te 1 y 3 horas y sembrar sobre cajas con -  
medio A3, diluciones adecuadas de cada cul-  
tivo.
  - Incubar a 37°C durante 24 horas.
  - Contar y sacar el título de bacterias.

B.- Curva de crecimiento.

- Inocular un matraz nefelométrico de 125 ml  
conteniendo 12.5 ml de medio A3 con  $10^8$  es-  
poras/ml. Conservar la relación 1:10 en-  
tre el volúmen del medio y el volúmen del-  
matraz.
- Incubar a 37°C con agitación fuerte.
- Tomar lecturas en el fotocolorímetro Klett  
Sumersson a las 0, 1, 3, 5, 24, 36 y 48 ho-  
ras.
- Hacer cuenta viable a éstos tiempos sem-  
brando las diluciones adecuadas sobre ca-  
jas con medio A3, por duplicado.
- Graficar unidades Klett y No. de bacterias/  
ml contra tiempo, en papel semilogarítmico.  
Calcular el tiempo de generación de acuer-  
do con la siguiente fórmula:

$$\mu = \frac{\ln X_2 - \ln X_1}{t_2 - t_1}$$

$$T_g = \frac{\ln 2}{\mu}$$

donde

$\mu$  = velocidad específica de crecimiento.

X = No. de células.

t = Tiempo en horas.

T<sub>g</sub> = Tiempo de generación

### III.- Identificación de la Bacitracina por cromatografía en capa fina.

Para realizar la cromatografía fue necesario preparar las siguientes sustancias: una solución de Bacitracina pura marca - Sigma de 100 U/ml, medio de producción del antibiótico y un extracto del medio fermentado.

La obtención del extracto se realizó de la siguiente manera:

- Colocar en un tubo 4 ml del medio fermentado durante 48 horas. (tiempo de máxima producción de Bacitracina por la cepa *B. subtilis* ATCC 6633 (10) obtenido por filtración, lo cual elimina las células.
  - Adicionar 2 ml de n-butanol, agitar fuertemente durante 15 minutos.
  - Centrifugar durante 15 minutos a 1500 rpm.
  - Separar la capa menos densa (la del n-butanol) con una pipeta pasteur.
  - Adicionar otros 2 ml de n-butanol a la capa restante, la capa más densa (el medio fermentado).
- Agitar fuertemente y centrifugar como se

describió anteriormente.

- Separar nuevamente la capa menos densa y juntarla con la anterior.
- Conservar en un tubo estéril en refrigera---ción.

Posteriormente sobre placas de sílica gel, - colocaron volúmenes de 50 microlitros de:

- Extracto del medio fermentado al tiempo de - máxima producción del antibiótico.
- Bacitracina Sigma de 100 U/ml.
- Extracto de Bacitracina Sigma y medio de producción sin fermentar (en una relación 1:1).
- Medio de producción antibiótico estéril.

Colocar cada muestra con una distancia entre sí de 2.0 cm. Además la distancia entre la orilla de la placa y la muestra deberá ser - de 2.0 Cm.

Dejar secar las muestras y correrlas en una cámara saturada durante 24 horas utilizando el sistema de solventes: n-butanol- Ac. acético- agua (4:1:2), sin permitir que la marca del solvente salga de la placa de sílica-gel (aproximadamente 5 horas).

Indicar con un lápiz la marca superior pro-ducida por el solvente, secar y revelar con una solución de Ninhidrina al 0.3%.

Marcar las manchas reveladas y calcular el - Rf de cada una de ellas.

#### IV.- Cuantificación del antibiótico (Bacitracina) por el Método Microbiológico.

Para realizar ésta prueba se requiere la -- muestra que se va a cuantificar y una suspen

si3n del microorganismo prueba, en 3ste ca  
so Micrococcuss flavus ATCC 10240.

A.- Obtenci3n de la muestra.

Colocar en un tubo de 16 X 150 mm, 5 ml de  
medio de producci3n del antibi3tico, inocu  
lar con una asada del microorganismo cuya  
producci3n del antibi3tico se va a cuanti  
ficar e incubar a 37'C durante 24 horas.

En un matraz Erlenmeyer de 125 ml colocar  
medio de producci3n del antibi3tico mante  
niendo una relaci3n 1:10 entre el vol3men  
del matraz y el vol3men del medio y aprox  
imadamente 0.5 ml del cultivo bacteriano ob  
tenido anteriormente.

Incubar a 37'C durante 48 horas, con agita  
ci3n fuerte. Centrifugar el medio fermen  
tado durante 30 minutos a 9000 rpm. Fil  
trar el sobrenadante obtenido sobre una --  
membrana millipore de 0.45 micras de poro  
y recolectar el filtrado en un tubo est3--  
ril.

Hacer diluciones logarftmicas del filtrado;  
10<sup>-0.25</sup>, 10<sup>-0.5</sup>, 10<sup>-1.0</sup>, 10<sup>-1.25</sup>, 10<sup>-1.5</sup>, --  
utilizando regulador de fosfatos como dilu  
yente.

B.- Obtenci3n del cultivo de Micrococcus fla--  
vus.

- Sembrar con una asada de Micrococcus fla--  
vus ATCC 10240 (resiembra reciente), un tu  
bo de 16 x 150 mm conteniendo 5 ml de me--

dio de producción del antibiótico.

- Incubar a 37°C durante 24 horas.
- Colocar sobre la superficie del medio para antibiótico No. 1 contenido en una botella de Roux.
- 1 ml del cultivo anterior, cubrir perfectamente la superficie del medio con el cultivo.
- Incubar a 37°C durante 24 horas.
- Cosechar las bacterias con solución salina fisiológica estéril.
- Centrifugar la suspensión durante 15 minutos a 9000 rpm.
- Eliminar el sobrenadante y resuspender el paquete bacteriano en solución salina.
- Ajustar la suspensión hasta que una dilución 1:100 de una lectura de 90 U.K. en el fotocolorímetro.
- Conservar en refrigeración.

C.- Proceso de cuantificación.

- Vaciar 20 ml de medio para antibiótico No. 2 (recién preparado) sobre cajas de petri-altas.
- Dejar solidificar el medio sin permitir -- que se formen gotas de condensación en la tapa, ésto se logra colocando la tapa ligeramente fuera de su base y manteniendo a temperatura ambiente durante 30 minutos.
- Adicionar 4 ml de medio para antibióticos No. 1 conteniendo Micrococcus flavus ATCC 10240 en una concentración de 0.3%, a cada caja.

- Dejar solidificar durante una hora a temperatura ambiente.
- Colocar seis cilindros metálicos en cada caja y llenar tres cilindros con la solución tipo de Bacitracina y tres cilindros con la dilución de la muestra problema, alternando un cilindro con la solución tipo y uno con la muestra problema.
- Montar tres cajas por cada dilución que se ensaye.
- Incubar a 37°C durante 24 horas, sin permitir que los cilindros se muevan por vibración.
- Medir los halos de inhibición con una regla, sacar las medias y corregir los datos de la siguiente manera:

Factor de corrección =  $\bar{X}$  Std total -  $\bar{X}$  Std-parcial.

$\bar{X}$  corregido del problema =  $\bar{X}$  problema - Factor de corrección.

donde:

$\bar{X}$  problema = media del problema.

$\bar{X}$  Std total = media de los datos de la solución de Bacitracina de -----  
1.0 U/ml.

$\bar{X}$  Std parcial = media de los datos obtenidos para cada una de las diluciones del problema que se ensayan.

- Interpolar en la curva tipo.
- V.- Elaboración de la curva tipo para la cuantificación de Bacitracina.

- Preparar una suspensión de Micrococcus flavus ATCC 10240 como se mencionó en IV B.
- Hacer soluciones de Bacitracina con concentraciones de: 0.64, 0.8, 1.0, 1.25 y 1.56 - unidades, a partir del polvo puro de Bacitracina Sigma. El diluyente que se utiliza es regulador de fosfatos de pH 6.0
- Preparar cajas altas con 20 ml de medio para antibióticos No. 2 siguiendo el procedimiento que se describió en IV C.
- Colocar seis cilindros en cada caja y llenar tres de ellos en forma alternada con la solución de Bacitracina de una de las concentraciones señaladas y los otros tres con la solución estandar de 1.0 unidad.
- Montar tres cajas por cada concentración en sayada (excepto para 1.0 unidad, ya que ésta se utiliza como estandar).
- Incubar todas las cajas de 37°C durante 24-horas.
- Medir los halos de inhibición con una regla, obtener las medias y corregir los datos como se describió anteriormente.
- Graficar en papel semilogarítmico, el diámetro en milímetros (mm) vs. Unidades de Bacitracina.

#### VI.- Proceso de mutación.

- A.- Determinación del tiempo y la concentración óptima de 9-aminoacridina (9AA).  
Para ésta determinación se consideraron como óptimas las condiciones (tiempo y concentración) que produjeron un 90-95% de muerte

en las células tratadas.

- 1.- a) Inocular un tubo conteniendo 5 ml de medio A3 con una asada del microorganismo.
  - b) Incubar a 37°C con agitación fuerte hasta fase logarítmica (aproximadamente 4 - horas para la cepa *B. subtilis* ATCC 6633).
  - c) Colocar en un matraz actínico de 125 ml: 1 ml de medio A3, 8 ml de medio 56/2 más glucosa, 1 ml del cultivo anterior diluído 1:5 con solución salina y 0.1 ml de solución de 9AA (10 microgramos/ml) recién preparada.
  - d) Colocar las mismas cantidades y componentes en otro matraz actínico, sustituyendo la solución de 9AA por 0.1 ml de agua destilada estéril, utilizar éste matraz como testigo.
  - e) Incubar a 37°C con agitación fuerte durante 10 horas.
  - f) Centrifugar durante 30 minutos a 9000 -- rpm.
  - g) Eliminar el sobrenadante y lavar dos veces con solución salina estéril.
  - h) Resuspender finalmente en 5 ml de solución salina.
  - i) Hacer cuenta viable de la suspensión anterior utilizando cajas con medio A3.
  - j) Contar y sacar el título de bacterias. Este experimento se repitió empleando 15 microgramos de 9AA.
- 2.- a) Colocar las mismas cantidades y componentes que se describieron en VI 1c en ----

- otros dos matraces actfnicos de 125 ml.
- b) Incubar a 37'C con agitaci3n fuerte durante 18 horas.
  - c) Seguir los pasos indicados en VI Alc hasta - VI Alj.
- 3.- a) Inocular un tubo conteniendo 5 ml de medio - A3 con una asada del microorganismo.
- b) Incubar a 37'C con agitaci3n fuerte hasta fase estacionaria de crecimiento (aproximadamente 8 horas 6 m3s para la cepa B. subtilis ATCC 6633).
  - c) Colocar en un matraz actfnico de 125 ml: 1 - ml de medio A3, 8 ml de medio 56/2 m3s glucosa, 1 ml del cultivo anterior diluido 1:5 -- con soluci3n salina fisiol3gica y 0.1 ml de una soluci3n de 9AA (10 microgramos/ml) recci3n preparada.
  - d) Colocar las mismas cantidades y componentes en otro matraz actfnico, sustituyendo la soluci3n de 9AA por 0.1 ml de agua destilada, utilizar 3ste matras como testigo.
  - e) Seguir los pasos indicados en IV Ale hasta - IV Alj.
- 4.- a) Colocar las mismas cantidades y componentes a otros dos matraces actfnicos de 125 ml, como se describi3 en IV A3c.
- b) Incubar a 37'C con agitaci3n fuerte durante 18 horas.
  - c) Seguir los pasos indicados en IV Ale hasta - IV Alj.

B.- Selecci3n de la mutante.

Cabe mencionar que sólo se seleccionaron las clonas que se obtuvieron del tratamiento mutagénico que dió un porcentaje de muerte, al tratar con SAA, de 95-99 aproximadamente.

- Tomar una asada de cada colonia y sembrar en tubos conteniendo 2 ml de medio de producción del antibiótico.
- Incubar a 37°C durante 24 horas con agitación fuerte.
- Colocar 0.2 ml de éste cultivo en tubos calibrados conteniendo 5 ml de medio de producción del antibiótico.
- Incubar a 37°C con agitación fuerte hasta obtener una densidad de 60 unidades Klett. Sembrar con una asa calibrada de 0.01 ml --- seis muestras del cultivo anterior sobre una caja conteniendo medio para antibióticos No. 2.
- Incubar durante 3 horas a 37°C. Invertir la caja sembrada sobre otra conteniendo 7ml de cloroformo durante 30 minutos a 37°C.
- Separar la caja con el crecimiento y adicionar 4 ml de medio para antibióticos No. 1 -- conteniendo una concentración de Micrococcus flavus ATCC 10240 de 0.3%.
- Incubar a 37°C durante 24 horas.
- Medir los halos de inhibición con una regla.
- Sembrar las colonias que hayan dado halos de inhibición mayores que la cepa testigo, en tubos con medio para antibióticos No. 2 inclinado.
- Incubar a 37°C durante 24 horas.
- Mantener en refrigeración.

## R E S U L T A D O S

### I.- Características de la cepa Bacillus subtilis ATCC 6633.

La cepa Bacillus subtilis ATCC 6633 fué seleccionada para realizar éste trabajo por producir Bacitracina en forma silvestre. Con el fin de caracterizar la cepa se procedió a realizar una serie de experimentos, que a continuación se describen:

#### A.- Morfología colonias y microscópica.

Para determinar la morfología colonial de la cepa, se sembró una asada por la técnica de estría cruzada sobre cajas con medio para antibióticos No. 2. Se incubó a 37°C durante 24 horas, observándose posteriormente colonias redondas e irregulares de color crema, con superficie rugosa, aspecto seco y de consistencia suave mucosa.

Se tomó una asada de éstas colonias para realizar la tinción de Gram y observar la morfología microscópica. Encontrándose bacilos Gram +, muy largos, en cadenas y con endosporas localizadas a todo lo largo del bacilo.

#### B.- Características de crecimiento.

Para determinar las características de crecimiento se siguió el método descrito en el inciso IIB de métodos. Las condiciones de crecimiento del microorganismo fueron: incubación a 37°C y agitación fuerte, ya que los microorganismos del género Bacillus son aerobios estrictos.

Con los datos de crecimiento a los diferentes tiempos, tanto en absorbancia como en No. de células/ml - obtenidos (Tabla No. 1), se construyó la gráfica presentada en la figura No. 2. En ella se puede observar como, aproximadamente a los 40 minutos de incubación se inicia la fase logarítmica de crecimiento que dura aproximadamente 4 horas. Con los datos de ésta curva se calculó el tiempo de generación, que fué de 0.55 horas.

### C.- Determinación del carácter protótrofo ó auxótrofo.

La metodología para hacer ésta determinación se describió en la sección de Métodos y los resultados obtenidos se presentan en la Tabla No. 2.

Como se puede observar por los resultados obtenidos el microorganismo solamente disminuye su crecimiento cuando se encuentra en un medio mínimo. Esto nos indica que la cepa es protótrofa, ya que no requiere en especial de ningún nutriente (contenido en el medio rico) para crecer. Sin embargo, cuando se siembra la cepa sobre cajas con medio mínimo no crece, éste resultado se discutirá posteriormente.

### II.- Determinación de la producción de Bacitracina por la cepa Bacillus subtilis ATCC - 6633.

Una de las principales características de las cepas utilizadas en éste trabajo es la producción del antibiótico. Debido a lo anterior fué primordial utilizar un método de cuantificación. Método que a continuación-

T A B L A No. 1

CRECIMIENTO DE LA CEPA B. subtilis ATCC 6633

| Tiempo (horas) | No. bacterias/ml   | U.K. |
|----------------|--------------------|------|
| 0              | $8.6 \times 10^6$  | 12   |
| 0.66           | $8.3 \times 10^6$  | 15   |
| 1.33           | $2.13 \times 10^7$ | 23   |
| 2.0            | $2.66 \times 10^7$ | 57   |
| 2.66           | -                  | 137  |
| 3.33           | $2.64 \times 10^8$ | 256  |
| 4.0            | $4.83 \times 10^8$ | 335  |
| 4.66           | $5.72 \times 10^8$ | 395  |
| 5.33           | $6.2 \times 10^8$  | 425  |
| 9.0            | $6.5 \times 10^8$  | 430  |

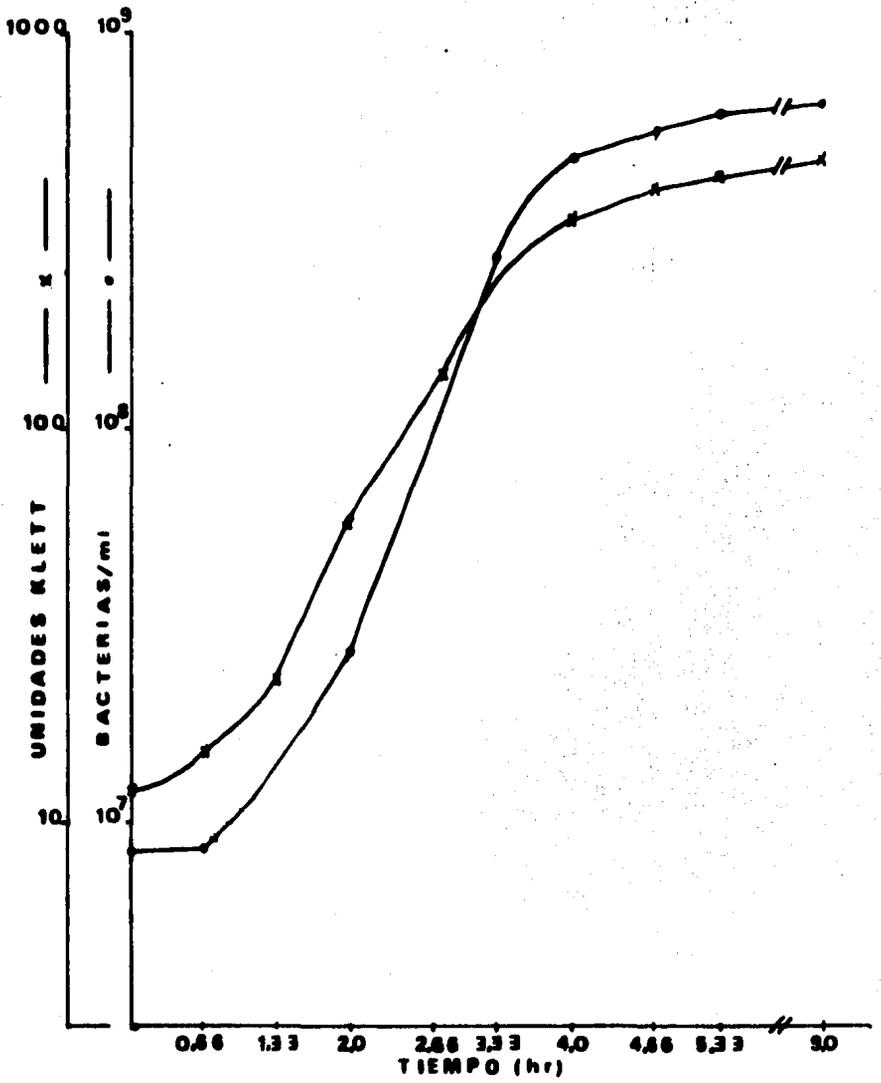


Figura No2 CURVA DE CRECIMIENTO DE LA CEPA *Bacillus subtilis* ATCC 6633

T A B L A No. 2

DETERMINACION DE LA PROTOTROFIA O AUXOTROFIA DE LA  
CEPA Bacillus subtilis ATCC 6633

| Medio de crecimiento    | Tiempo de ----- No.<br>incubación (hr) | bacterias/ml       |
|-------------------------|--|--------------------|
| Sólido<br>A3<br>Mínimo  | 24                                     | $3.18 \times 10^6$ |
|                         | 48                                     | No creció          |
| Líquido<br>A3<br>Mínimo | 1                                      | $7.45 \times 10^6$ |
|                         | 3                                      | $6.60 \times 10^6$ |
|                         | 1                                      | $2.58 \times 10^5$ |
|                         | 3                                      | $2.50 \times 10^6$ |

se describe:

A.- Curva tipo.

Para realizar la curva tipo se requirió contar con una suspensión bacteriana de Micrococcus flavus-- ATCC 10240, además de una serie de soluciones de Bacitracina con las siguientes concentraciones: 0.64, 0.8, 1.0 - 1.25 y 1.56 unidades por mililitro (U/ml).

Se siguió la técnica descrita previamente en el inciso V de Métodos. Con los datos de tamaño del halo de inhibición del Micrococo obtenidos con las diferentes concentraciones de Bacitracina y que se presentan en la Tabla No. 3 se obtuvo la gráfica representada en la figura No. 3.

B.- Cuantificación del antibiótico producido por la cepa silvestre.

La cuantificación se realizó conforme al método descrito por Hoff, Bennett y Stanley conocido como método microbiológico (16). La técnica se describió en los incisos IV A, B y C de Métodos. Después de seguir la técnica se midieron, con una regla, los halos de inhibición producidos por la cepa, se calcularon los promedios y los valores obtenidos se interpolaron en la curva tipo para obtener las unidades de Bacitracina/ml. El resultado obtenido demostró que la cepa silvestre produce aproximadamente 2 U/ml del antibiótico a las 48 horas de fermentación.

C.- Identificación del antibiótico producido por la cepa.

T A B L A No. 3

DIAMETRO PROMEDIO DE LAS DIFERENTES CONCENTRACIONES DE  
BACITRACINA SIGMA

| Diámetro (mm) | Unidades de Bacitracina/ml |
|---------------|----------------------------|
| 15.09         | 0.64                       |
| 15.88         | 0.80                       |
| 16.47         | 1.0                        |
| 17.19         | 1.25                       |
| 17.76         | 1.56                       |

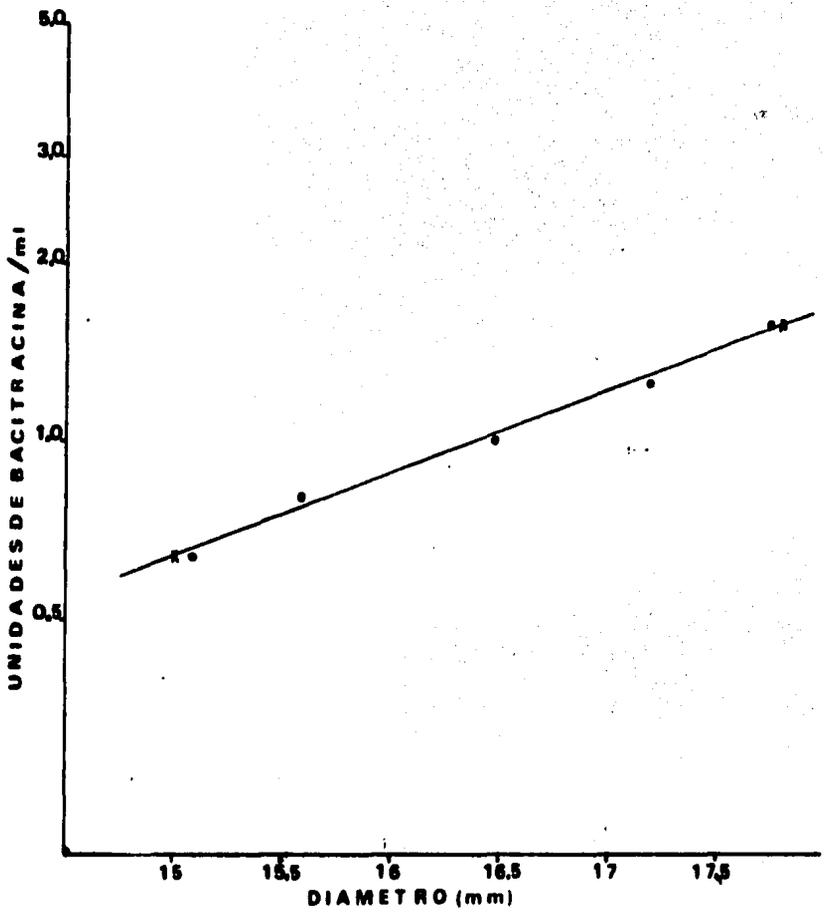


Figura No.3 CURVA TIPO PARA LA DETERMINACION DE BACITRACINA

El antibiótico producido por la cepa silvestre se identificó por medio de cromatografía en capa fina.

Los resultados se muestran en la Tabla No. 4 y en la figura No. 4.

Como se puede observar, la Bacitracina Sigma - produce dos manchas de color amarillo con Rfs diferentes, lo cual nos está indicando que es una mezcla de dos tipos de Bacitracina. Por otro lado, cuando se mezcla Bacitracina Sigma con medio de producción y se extrae con n-butanol, los Rf de las manchas producidas por la Bacitracina se modifican a 0.40 y 0.41, al igual que el color de las mismas, que cambió a marrón.

El extracto del medio fermentado por la cepa - 6633 produjo cinco manchas, de color marrón, de las cuales consideramos que la de Rf 0.42 pertenece al antibiótico, ya que es el valor más próximo a los producidos por el testigo.

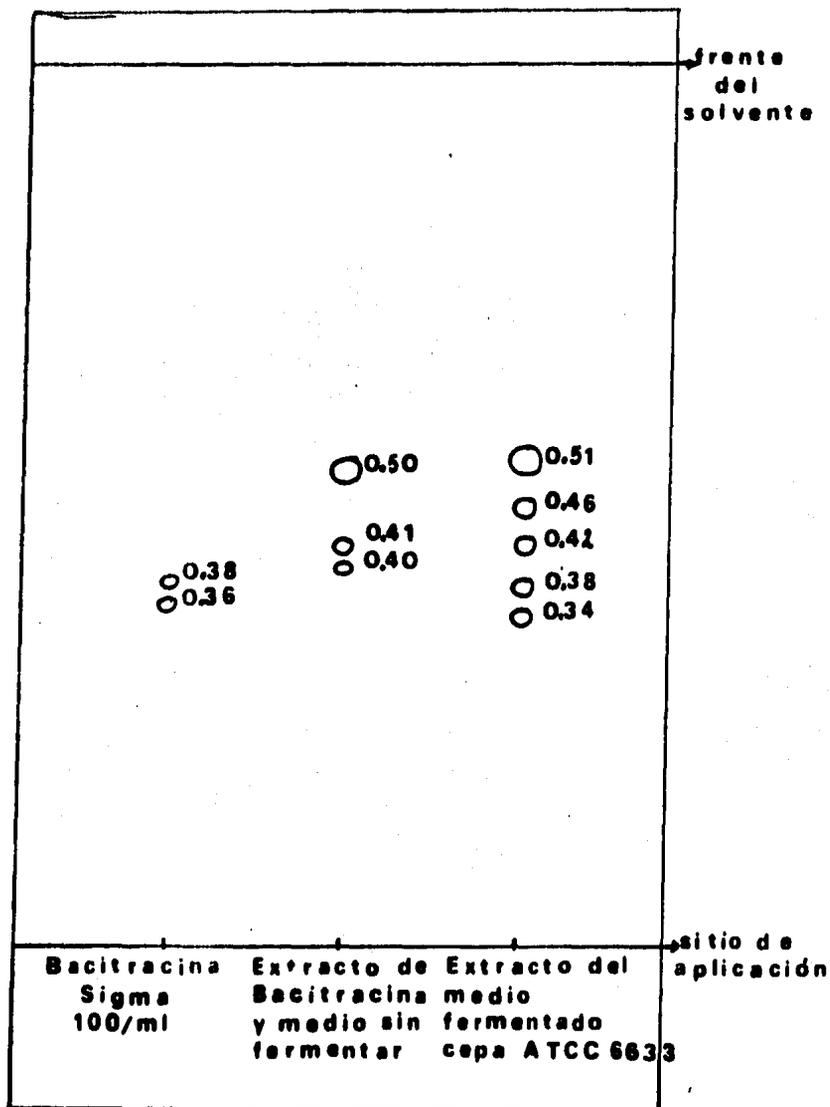
#### D.- Cinética de producción del antibiótico.

Se inocularon cuatro matraces erlenmeyer conteniendo medio de producción con  $10^8$  esporas/ml. Se incubaron a 37°C con agitación fuerte y a las 24, 48, 72 y 96 horas se sacó un matraz para determinar el pH (utilizando papel pH), las Unidades de Bacitracina/ml (utilizando el método ó ensayo cuantitativo microbiológico) y el Número de bacterias/ml (sembrando sobre cajas con medio rico -- A3 diluciones adecuadas del cultivo). Los resultados se muestran en la Tabla No. 5 y para hacerlos más evidentes-

T A B L A No. 4

IDENTIFICACION CROMATOGRAFICA DEL ANTIBIOTICO PRODUCIDO  
POR LA CEPA Bacillus subtilis ATCC 6633

| Muestra                    | Rf   | Color de la Mancha |
|----------------------------|------|--------------------|
| Bacitracina Sigma          | 0.36 | amarilla           |
|                            | 0.38 | amarilla           |
| Extracto de la mezcla de   | 0.40 | marrón             |
| Bacitracina y medio sin-   | 0.41 | marrón             |
| fermentar.                 | 0.50 | marrón             |
| Extracto del medio fermen- | 0.34 | marrón             |
| tado por la cepa 6633      | 0.38 | marrón             |
|                            | 0.42 | marrón             |
|                            | 0.46 | marrón             |
|                            | 0.51 | marrón             |



**Figura No.4 CROMATOGRAMA DEL MEDIO FERMENTADO POR Bacillus subtilis ATCC6633**

se graficaron, obteniéndose la figura No. 5.

Como se puede observar, conforme avanza el --- tiempo de fermentación, el pH del medio se alcaliniza con siderablemente, comenzando en 6.5 a tiempo cero, llegando hasta 9.0 a las 48 horas y manteniéndose así durante el - resto de la fermentación. La producción de Bacitracina- se inicia a las 24 horas con 1.0 U/ml y llega a su máximo de 2.0 U/ml a las 48 horas, posteriormente la producción baja hasta llegar a cero.

Cabe mencionar que a las 72 y 96 horas se pro- dujeron halos de inhibición del crecimiento de Micrococo, sin embargo su diámetro promedio queda fuera del límite - inferior de la curva tipo y se reportaron como cantidades no detectables de antibiótico. Por otro lado la cinética comienza a tiempo cero con aproximadamente  $10^7$  célu- - las/ml las cuales aumentan hasta llegar a un máximo de --  $10^9$  células/ml a las 72 horas. Esta concentración celu- lar baja un poco después de éste tiempo, como se observa en la figura No. 5

La producción del antibiótico baja a partir de las 72 horas, dato que nos sugiere que la Bacitracina se- va degradando en el transcurso de la fermentación y que - podría, por tanto, formar parte de alguna vía metabólica- que se desarrolla a éste tiempo.

### III.- Obtención de mutantes hiperproductoras - de Bacitracina.

#### A.- Determinación de las condiciones óptimas - de mutación.

T A B L A No. 5

CINETICA DE PRODUCCION DE BACITRACINA POR LA CEPA  
Bacillus subtilis ATCC 6633

| Tiempo (hr) | pH  | No. bacterias/ml   | Unidades de Bacitracina/ml. |
|-------------|-----|--------------------|-----------------------------|
| 0           | 6.5 | $1.70 \times 10^7$ | 0                           |
| 24          | 8.0 | $3.49 \times 10^9$ | 1.27                        |
| 48          | 9.0 | $6.90 \times 10^9$ | 2.29                        |
| 72          | 9.0 | $3.27 \times 10^9$ | N.D.                        |
| 96          | 9.0 | $1.83 \times 10^9$ | N.D.                        |

N.D. No detectable.

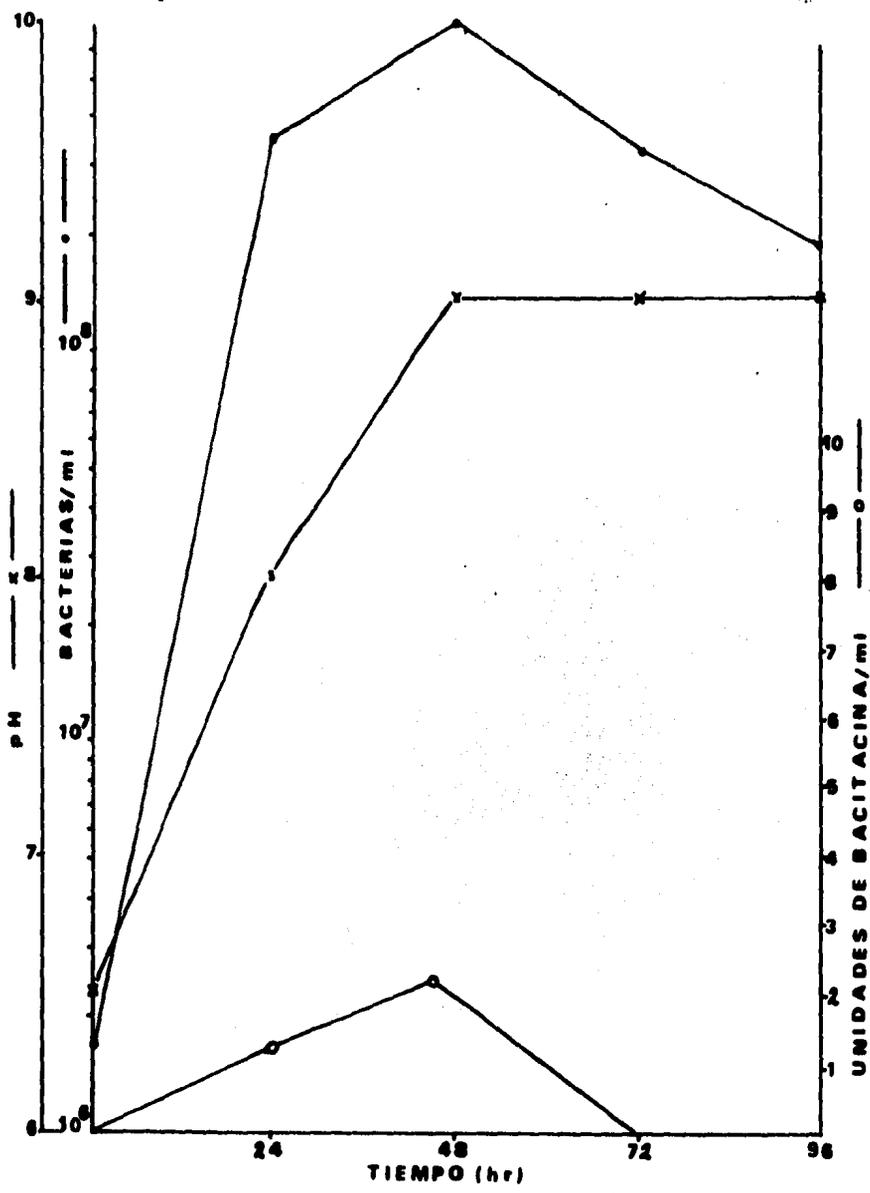


Figura No5 CINETICA DE PRODUCCION DE BACITRACINA POR LA CEPA *Bacillus subtilis* ATCC 6633

Se realizaron experimentos en los cuales se se leccionaron las condiciones óptimas de mutación. Los factores con los cuales se trabajó fueron: tiempo de exposición al mutágeno, fase de crecimiento y concentración del mutágeno. Se variaron éstos parámetros hasta obtener porcentajes de muerte de aproximadamente 95-99 - ya que se ha reportado que hay una elevada probabilidad de mutación cuando los porcentajes de muerte son altos.

El mutágeno utilizado fué la 9- aminoacridina, - el cual produce mutaciones por corrimiento de fase ó mutaciones "frameshift", que se caracterizan por no revertir fácilmente. Los resultados de los experimentos se muestran en la Tabla No. 6.

Como se puede observar el porcentaje de muerte es mayor cuando se utilizan células en fase estacionaria de crecimiento, obteniéndose valores de hasta 99.50% de muerte. Con base en lo anterior se seleccionaron como las condiciones óptimas de mutación: 10 horas de exposición, 10 microgramos/ml de 9- aminoacridina y fase estacionaria de crecimiento, para continuar con la selección de las mutantes.

#### B.- Tratamiento mutagénico y selección de mutantes.

De las clonas sobrevivientes al tratamiento mutagénico se prepararon cultivos de toda la noche, utilizando medio de producción. Posteriormente se inocularon otros tubos conteniendo medio de producción estéril con los cultivos anteriores, llevándolos a 60 unidades klett (U.K.), a partir de los cuales se sembraron seis -

T A B L A No. 6

CONDICIONES DE MUTACION PARA LA CEPA B. subtilis ATCC 6633

| Fase de crecimiento | Concentración de 9-aminoacridina $\mu$ g/ml. | Tiempo de exposición (hr) | % de muerte * |
|---------------------|--|---------------------------|---------------|
| Logarítmica **      | 10   | 10                        | 80.74         |
|                     | 10   | 18                        | N.P.          |
| Estacionaria ***    | 10   | 10                        | 97.32         |
|                     | 15   | 10                        | 99.50         |

N.P. No probada.

\* Los datos son promedios de dos experimentos

\*\* cuatro horas de crecimiento

\*\*\* diez horas de crecimiento.

muestras con una asa calibrada de 0.01 ml, sobre cajas -- con medio para antibióticos No. 2, las cajas se incubaron a 37°C durante 3 horas. Previamente se determinó que éste tiempo era suficiente para que la cepa silvestre comen- zara a producir el antibiótico y éste se difundiera en el agar.

Las cajas con los inóculos se expusieron a va- pores de cloroformo durante 30 minutos y posteriormente - se colocaron sobre la caja 4 ml de medio para antibióti- cos No. 1 inoculado con Micrococcus flavus ATCC 10240, en una concentración de 0.3%. Las cajas se incubaron a --- 37°C durante 24 horas y se midieron los halos de inhibi- ción.

En total se probaron 505 clonas sobrevivien- tes al tratamiento mutagénico, de las cuales 236 no produ- jeron halo de inhibición. Por otro lado como se observa en la Tabla No. 7 el resto de las clonas produjeron halos que van desde 1 hasta 90 mm. Un elevado porcentaje de - las sobrevivientes produjeron halos del mismo diámetro -- que la silvestre e inclusive halos dos veces mayores.

Unicamente 4 clonas produjeron halos de inhi- bición de un poco más del doble que la cepa silvestre y - sólo una produjo un halo del tamaño de toda la caja ( 90 mm ).

Estas clonas se purificaron y se sembraron en tubos con medio para antibióticos No. 2 inclinado y -- posteriormente se les cuantificó el antibiótico producido. En la Tabla No. 8 se muestran los resultados de la cuanti- ficación.

T A B L A No. 7

DETERMINACION CUALITATIVA DEL ANTIBIOTICO PRODUCIDO  
POR LAS CLONAS SOBREVIVIENTES AL TRATAMIENTO  
MUTAGENICO

| Diámetro de halo de inhibición<br>(mm) | No. de clonas  |
|--|----------------|
| 9.0                                    | cepa silvestre |
| 1.0 - 9.0                              | 54             |
| 9.1 - 17.0                             | 210            |
| 18.1 - 24.5                            | 4              |
| 90.0                                   | 1              |

T A B L A No. 8

DETERMINACION CUANTITATIVA DEL ANTIBIOTICO PRODUCIDO  
POR ALGUNAS CLONAS SOBREVIVIENTES AL TRATAMIENTO  
MUTAGENICO DE B. subtilis ATCC 6633

| Clona No. | U de Bacitracina/ml * |
|-----------|-----------------------|
| 40        | 2.97                  |
| 97        | 2.28                  |
| 83        | 3.14                  |
| 86        | 3.28                  |
| 39        | 4.1                   |
| 211       | 10.8                  |
| Testigo   | 2.0                   |

\* Cultivo de 48 horas.

Con base en los datos mostrados en las Tablas-  
No. 7 y 8 se puede concluir que la producción del antibió-  
tico no es proporcional al tamaño del halo de inhibición,  
ya que las clonas sobrevivientes que produjeron halos de  
inhibición del doble de la silvestre produjeron, al hacer  
la cuantificación por el Método Microbiológico cantidades  
no considerables del mismo.

La única clona que produjo una cantidad consi-  
derable de antibiótico, fué la que produjo un halo de to-  
da la caja (90 mm). Esta cepa fué denominada Bacillus -  
subtilis GM 2000.

#### IV.- Caracterización de la cepa mutante GM 2000

##### A.- Morfología colonial y microscópica.

Para determinar la morfología colonial de la -  
cepa, se empleó la técnica que se describió para la cepa-  
silvestre ( Pág. 26 ).

Se observaron colonias idénticas a las de la -  
cepa silvestre ( redondas con bordes irregulares de color  
crema, superficie rugosa, aspecto seco y de consistencia-  
suave mucóide ).

A partir del cultivo puro se tomó una asada --  
del microorganismo para realizar la tinción de Gram. Ob-  
servándose que las colonias están formadas por bacilos --  
Gram + largos en cadenas y con endosporas localizadas a -  
todo lo largo del bacilo.

##### B.- Características de crecimiento.

Las características de crecimiento se analizaron siguiendo el método descrito en el inciso No. II - de Métodos.

Los datos obtenidos que se presentan en la Tabla No. 9 se graficaron obteniéndose la curva que se muestra en la figura No. 6.

Como se puede observar la cepa mutante Bacillus subtilis GM 2000 tarda 60 minutos en iniciar la fase logarítmica de crecimiento, la cual dura aproximadamente 9 horas. Con los datos obtenidos de ésta curva se calculó el tiempo de generación que fué de 0.89 horas.

#### C.- Determinación del carácter auxótrofo ó protótrofo.

La cepa se incubó toda la noche en medio rico A3 con agitación fuerte a 37°C. A partir de éste cultivo se obtuvo una suspensión del microorganismo, con la cual se realizaron las pruebas para establecer el carácter protótrofo ó auxótrofo de la cepa. Determinando se cuenta viable en medio rico A3 y en medio mínimo.

Por otro lado el mismo cultivo se inoculó tanto en medio rico como en medio mínimo líquidos. Estas dos suspensiones se incubaron a 37°C y se dejaron crecer con una agitación fuerte durante 1 y 3 horas, a cada tiempo se determinó el No. de bacterias/ml. Los resultados se muestran en la Tabla No. 10.

Podemos señalar que la cepa mutante disminuye considerablemente su crecimiento cuando crece en me-

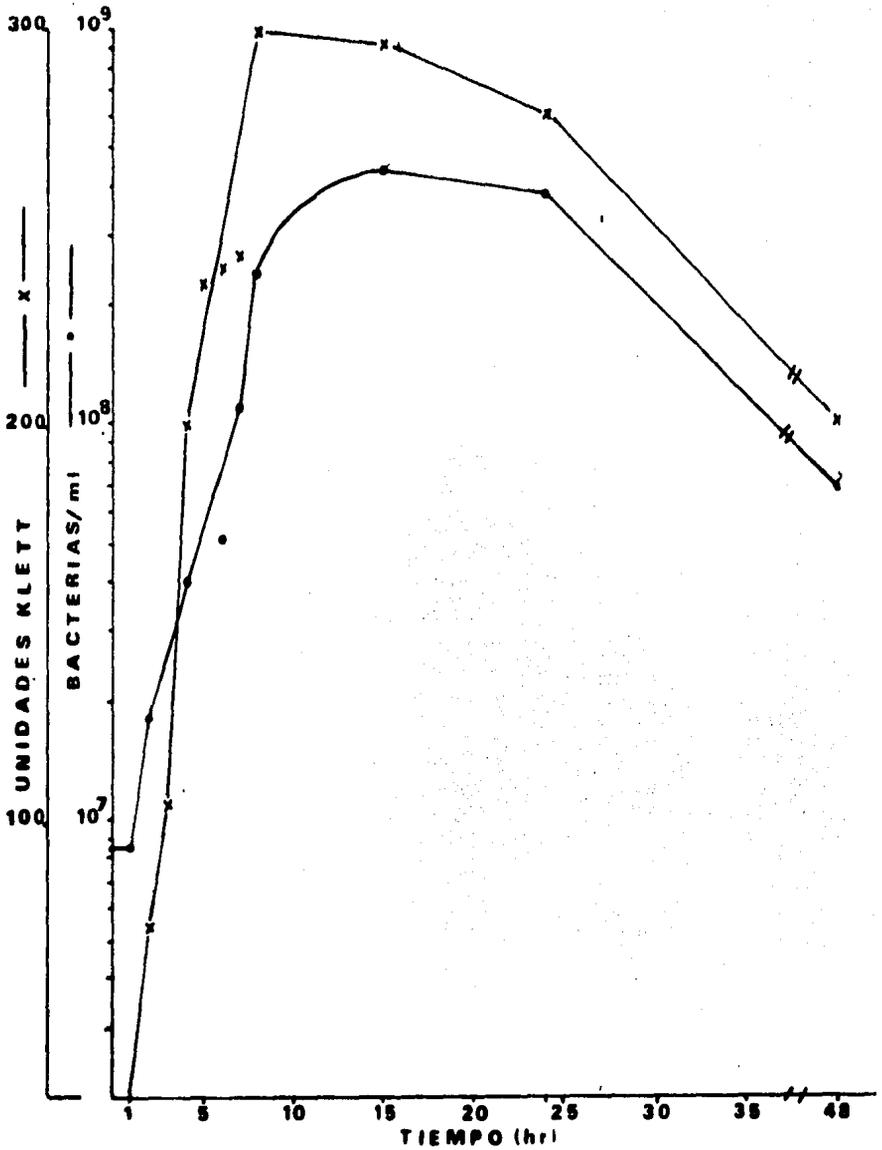


Figura No.6 CURVA DE CRECIMIENTO DE LA CEPA *Bacillus subtilis* GM 2000

T A B L A No. 9

CRECIMIENTO DE LA CEPA Bacillus subtilis GM 2000

| Tiempo<br>(hr) | No. bacterias/ml   | Unidades Klett<br>(U.K.) |
|----------------|--------------------|--------------------------|
| 0              | $8.52 \times 10^6$ | 20                       |
| 1              | -                  | 20                       |
| 2              | $1.80 \times 10^7$ | 55                       |
| 3              | -                  | 115                      |
| 4              | $4.0 \times 10^7$  | 200                      |
| 5              | -                  | 223                      |
| 6              | $5.10 \times 10^7$ | 250                      |
| 7              | $1.10 \times 10^8$ | 264                      |
| 8              | $2.40 \times 10^8$ | 300                      |
| 15             | $4.35 \times 10^8$ | 290                      |
| 24             | $3.75 \times 10^8$ | 260                      |
| 48             | $6.88 \times 10^7$ | 200                      |

T A B L A No. 10

DETERMINACION DE LA PROTOTROFIA O AUXOTROFIA DE LA  
CEPA Bacillus subtilis GM 2000

| Medio de crecimiento | Tiempo de incubación (hr) | No bacterias/ml    |
|----------------------|---------------------------|--------------------|
| Sólido               | A3<br>24                  | $3.95 \times 10^6$ |
|                      | Mfnimo<br>48              | No creció          |
| Líquido              | A3<br>1                   | $1.22 \times 10^8$ |
|                      | A3<br>3                   | $4.61 \times 10^8$ |
|                      | Mfnimo<br>1               | $3.23 \times 10^5$ |
|                      | Mfnimo<br>3               | $4.0 \times 10^5$  |

dio mínimo líquido y no crece en medio mínimo líquido y no crece cuando se siembra en medio mínimo sólido. Esto nos indica que la cepa es auxótrofa, ya que requiere de algún nutriente contenido en el medio rico A3 para su crecimiento total. La comprobación de lo anterior se demuestra en la misma tabla, al crecer la cepa, primero en medio rico y posteriormente inocularla sobre cajas -- con medio mínimo, no se observó crecimiento, ni aún después de 72 horas de incubación.

#### D.- Identificación del antibiótico producido.

Con éste propósito se empleó la técnica descrita en el inciso No. III de Métodos y como se puede observar la Bacitracina Sigma produjo dos manchas de color amarillo con Rf de 0.32 y 0.36, confirmando que es una mezcla de dos tipos distintos de Bacitracina.

Por otro lado se hizo una mezcla de Bacitracina Sigma y medio de producción estéril la cual se extrajo con n-butanol. Los resultados indicaron que el Rf de las manchas se modifican a 0.34 y 0.37, confirmando de nuevo que los componentes del medio interfieren con el corrimiento del antibiótico sobre la placa de silica-gel, debido quizá a que se une con alguna molécula. La Tabla No. 11 muestra también los distintos Rfs que produce el extracto del medio fermentado al tiempo de máxima-producción por la cepa mutante *B. subtilis* GM 2000. Estos datos se muestran en forma gráfica en la figura No. 7.

#### E.- Cuantificación de la Bacitracina.

El método que se siguió para la cuantifica--

T A B L A No. 11

IDENTIFICACION CROMATOGRAFICA DEL ANTIBIOTICO PRODUCIDO  
POR LA CEPA Bacillus subtilis GM 2000

| Muestra   | Rf   | Color de la mancha |
|---|------|--------------------|
| Bacitracina Sigma                                 | 0.32 | amarilla           |
|   | 0.36 | amarilla           |
| Extracto de la mezcla de                          | 0.34 | marrón             |
| Bacitracina y medio sin<br>fermentar.             | 0.37 | marrón             |
|   | 0.41 | marrón             |
|   | 0.46 | marrón             |
|   | 0.49 | marrón             |
| Extracto del medio fermentado por la cepa GM 2000 | 0.27 | marrón             |
|   | 0.29 | marrón             |
|   | 0.40 | marrón             |
|   | 0.45 | marrón             |
|   | 0.50 | marrón             |

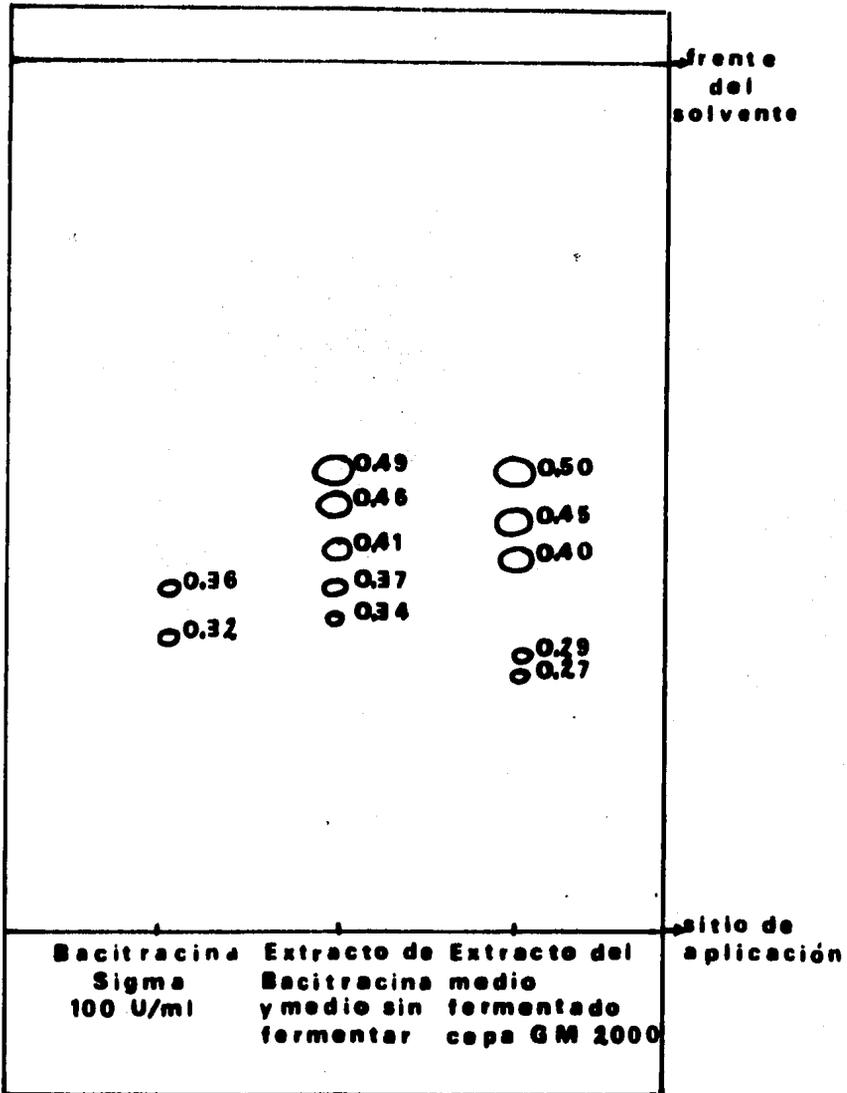


Figura No 7 CROMATOGRAMA DEL MEDIO FERMENTADO POR Bacillus subtilis GM 2000

ción del antibiótico se describió en los incisos IV A, B y C de Métodos. Los resultados indicaron que la cepa comienza a producir el antibiótico a las 24 horas alcanzando un máximo a las 48 horas y posteriormente, a partir de las 72 horas, decae la producción, a concentraciones no detectables. La cepa produce 10.8 U de Bacitracina/ml a las 48 horas de la fermentación. Todos éstos resultados se muestran en la Tabla No. 12.

#### F.- Estabilidad de la mutación.

Para demostrar que la mutación adquirida por la cepa Bacillus subtilis GM 2000 era estable se realizaron resiembras, utilizando tubos con medio para antibióticos No. 2 inclinado. A partir de las diferentes resiembras se realizó un ensayo microbiológico para cuantificar la producción del antibiótico. Los resultados se muestran en la Tabla No. 13.

#### V.- Cinética de producción de Bacitracina por la cepa B. subtilis GM 2000.

Los experimentos para determinar la cinética de producción fueron similares a los realizados con la cepa silvestre.

Los resultados que se presentan en la Tabla No. 14 se graficaron obteniéndose la Figura No. 8. Como se puede observar el pH del medio se alcaliniza considerablemente llegando hasta 10 a partir de las 48 horas de la fermentación. El No. de bacterias/ml aumenta logarítmicamente de las 0 a las 24 horas de incubación, alcanzando un título de  $2.9 \times 10^9$ , luego se mantiene más o menos constante.

T A B L A No. 12

CUANTIFICACION DE BACITRACINA PRODUCIDA POR LA  
CEPA Bacillus subtilis GM 2000

| Tiempo de fermentación<br>(hr) | U. de bacitracina/ml |
|--------------------------------|----------------------|
| 24                             | 10.8                 |
| 48                             | 10.8                 |
| 72                             | N.D.                 |
| 96                             | N.D.                 |

N.D. No detectable.

T A B L A No. 13

CUANTIFICACION DE LA BACITRACINA PRODUCIDA POR  
Bacillus subtilis GM 2000 DESPUES DE VARIAS  
RESIEMBRAS

| Resiembra No. | Unidades Bacitracina/ml |
|---------------|-------------------------|
| 3             | 10.8                    |
| 5             | 10.8                    |
| 10            | 10.0                    |

T A B L A No. 14

CINETICA DE PRODUCCION DE BACITRACINA DE LA CEPA

Bacillus subtilis GM 2000

| Tiempo<br>(hr) | pH   | No. de bacterias/ml | U. bacitracina/ml |
|----------------|------|---------------------|-------------------|
| 0              | 6.5  | $2.03 \times 10^7$  | 0                 |
| 24             | 8.0  | $2.91 \times 10^9$  | 10.8              |
| 48             | 10.0 | $3.36 \times 10^9$  | 10.8              |
| 72             | 10.0 | $2.02 \times 10^9$  | N.D.              |
| 96             | 10.0 | $2.62 \times 10^9$  | N.D.              |

N.D. No detectable.

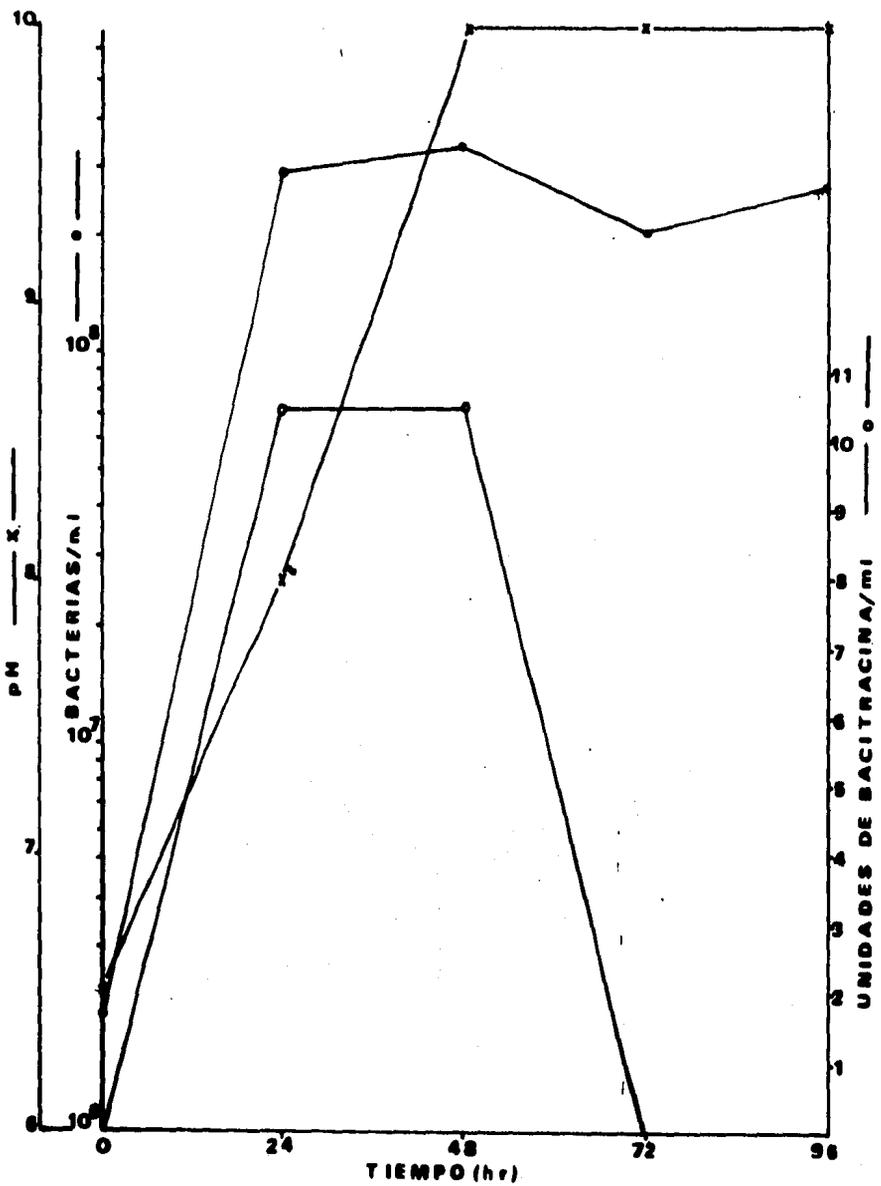


Figura No.8 CINETICA DE PRODUCCION DE BACITRACINA POR LA CEPA *Bacillus subtilis*, GM 2000

Con respecto a la producción de Bacitracina, la producción llega a 10.8/ml a las 24 horas y se mantiene durante 24 horas más, bajando posteriormente a concentraciones no detectables.

VI.- Obtención de mutantes hiperproductoras a partir de la cepa GM 2000.

A.- Determinación de las condiciones óptimas de mutación.

Se realizaron experimentos en los cuales se seleccionaron las condiciones óptimas de mutación.

Al igual que en la selección de la mutante GM 2000, los factores con los cuales se trabajó fueron: tiempo de exposición al mutágeno, fase de crecimiento y concentración al mutágeno.

Se seleccionaron las clonas sobrevivientes obtenidas del tratamiento mutagénico que dió aproximadamente un porcentaje de muerte de 95-99. En éste caso también se utilizó 9-aminoacridina como agente mutagénico. Los resultados experimentales se muestran en la Tabla No. 15.

Como se puede observar los porcentajes de muerte son bastante elevados, ya que fluctúan entre 94 y 97 para fase logarítmica. En cambio para fase estacionaria -- hay una diferencia más marcada, ya que a mayor tiempo de exposición al mutágeno el porcentaje de muerte fué menor -- observándose una fluctuación de 99.57 hasta 54.72.

B.- Tratamiento mutagénico y selección de las mutantes.

T A B L A No. 15

CONDICIONES DE MUTACION DE LA CEPA Bacillus  
subtilis GM 2000

| Fase de crecimiento | Concentración<br>de 9-amino-<br>acridina<br><i>µg</i> /ml/ | Tiempo de<br>exposición<br>(hr) | % de<br>muerte |
|---------------------|--|---------------------------------|----------------|
| Logarftmica         | 15   | 10                              | 97.49*         |
|                     | 15   | 18                              | 94.27**        |
| Estacionaria        | 15   | 10                              | 99.57*         |
|                     | 15   | 18                              | 54.72*         |

\* Los datos son promedios de dos experimentos

\*\* Los datos son promedios de tres experimentos

La metodología seguida para la selección de las mutantes, después del tratamiento 9- aminoacridina se describió en el inciso VI B de Métodos y las condiciones de la mutación fueron fase log.-10 Hrs.-15 g/ml 9AA. La Tabla No. 16 muestra los resultados obtenidos.

Cabe señalar que en éstos experimentos el testigo fué la cepa GM 2000 y en vista de que el primer tratamiento mutagénico produjo halos de inhibición del tamaño de toda la caja, se decidió hacer una dilución del cultivo de 60 U.K. para poder de éste modo continuar con la selección. La dilución elegida fué 1:9 ya que es la que produjo halos de inhibición del mismo tamaño que la solución tipo de Bacitracina de 1.0 U/ml y que fluctúan entre 15.5-16.0 mm.

Sin embargo, al realizar los experimentos se encontró que el cultivo de 60 U.K. producía halos pequeños, de aproximadamente 14.0 mm, por lo que ya no fué necesario hacer la dilución.

En total se probaron 756 clonas sobrevivientes al tratamiento mutagénico, de las cuales 194 no produjeron halos de inhibición sobre la capa de Micrococcus flavus, 399 produjeron halos menores e iguales que el testigo, 162 Produjeron halos mayores que el testigo y sólo una produjo el halo del tamaño de toda la caja.

Las clonas que produjeron halos de inhibición de aproximadamente el doble de la del testigo y la de toda la caja se resembraon y purificaron, pasándose a tubos con medio para antibióticos No. 2 inclinado, para pos

T A B L A No. 16

DETERMINACION CUALITATIVA DEL ANTIBIOTICO PRODUCIDO  
POR LAS CLONAS SOBREVIVIENTES AL TRATAMIENTO MUTAGENICO  
DE LA CEPA GM 2000

| Diámetro del halo de inhibición<br>(mm) | No. de clonas       |
|---|---------------------|
| 14.27                                   | B. subtilis GM 2000 |
| 1.0 - 14.5                              | 399                 |
| 14.6 - 22.5                             | 162                 |
| 90.0                                    | 1                   |

teriormente cuantificar el antibiótico que producen.

En la Tabla No. 17 se presentan los datos obtenidos de la cuantificación del antibiótico producido por las cepas seleccionadas, se emplearon como testigos la cepa silvestre ATCC 6633 y la mutante GM 2000 de la cual --provenían las mutantes a analizar.

Los resultados obtenidos demostraron que la --producción del antibiótico por la cepa GM 2000 había disminuido, es decir se presentó una alteración en su comportamiento que fué atribuida a una posible mutación espontánea, ésta suposición se discutirá posteriormente.

T A B L A No. 17

DETERMINACION CUANTITATIVA DEL ANTIBIOTICO PRODUCIDO  
POR ALGUNAS CLONAS SOBREVIVIENTES AL TRATAMIENTO  
MUTAGENICO DE LA CEPA GM 2000

| Clona          | U. bacitracina/ml * |
|----------------|---------------------|
| Cepa ATCC 6633 | 3.69                |
| Cepa GM 2000   | menos de 1.0        |
| 24             | 0.79                |
| 35             | 0.91                |
| 91             | menos de 1.0        |
| 39             | 3.0                 |

\* Cultivo de 48 horas.

## D I S C U S I O N

La cepa utilizada para el desarrollo del trabajo fué Bacillus subtilis ATCC 6633 la cual fué seleccionada en un trabajo previo (realizado en el laboratorio) por producir el antibiótico en forma natural.

La morfología colonial y microscópica de la cepa correspondieron por completo a las características de las especies del género Bacillus. La curva de crecimiento en medio rico A3 mostró que el microorganismo tiene un tiempo de generación de 0.55 horas y entra a la fase estacionaria después de 4 horas de crecimiento.

Los experimentos para determinar los requerimientos nutricionales de la cepa mostraron que es protótrofa, ya que crece en medio mínimo líquido. El hecho de que la cepa no haya crecido en medio mínimo sólido podría explicarse en base a la suposición de que le fué difícil absorber la fuente de carbono contenida en el agar. A diferencia de cuando la cepa creció en medio mínimo líquido, en donde la fuente de carbono (glucosa) se absorbió fácilmente, ya que el microorganismo se encontraba rodeado por ella, facilitándose su utilización.

Al realizar los experimentos de cromatografía en capa fina se observó, como se muestra en la Tabla No. 4, que algunos componentes del medio de cultivo parecen extraerse con n-butanol y además pueden separarse en cromatografía con el sistema de solventes utilizado.

Por otro lado también se observó que la Baci--

tracina empleada como testigo cambia un poco su Rf cuando se mezcla con el medio de cultivo y la mezcla se extrae con n-butanol; podrfa pensarse que el antibiótico se une con alguna molécula del medio, de tal manera que cambia su estructura y corre en forma distinta sobre la placa de sílica gel.

Otro hecho importante que se observó es que la Bacitracina Sigma empleada como testigo parece ser una mezcla de dos tipos de Bacitracina, ya que produjo dos -- manchas en el cromatograma. La bibliografía indica que los valores de Rf producidos por los diferentes tipos de Bacitracina, van desde 0.3 hasta 0.6. Por ejemplo la Bacitracina A y B tienen un Rf de 0.41 y el color de la mancha va desde el amarillo hasta el naranja. La Bacitracina X tiene un Rf de 0.64 y produce una mancha de color -- púrpura oscuro y la Bacitracina F produce una mancha color rosa con un Rf de 0.47. Tomando en cuenta las observaciones anteriores se identificó en el medio de fermentación de la cepa, un producto con un Rf de 0.42 que se --- cree corresponde al antibiótico en estudio.

Por otro lado la cinética de producción de ésta cepa consistió en la determinación de pH, determinación del número de bacterias/ml y la cuantificación de Bacitracina a las 0, 24, 48, 72 y 96 horas. La figura No. 5 muestra los resultados obtenidos.

El título de bacterias llega a  $6.9 \times 10^9$  a las 48 horas de la fermentación, decayendo a  $1.83 \times 10^9$  a las 96 horas. Esta disminución en el título bacteriano puede deberse a que el microorganismo entró a la fase esta--

cionaria de crecimiento y que inclusive está en plena fase de declinación ó muerte. Podría pensarse, también, que el título bajó a causa de la producción misma del antibiótico. Sin embargo, se realizaron experimentos en donde se adicionaban diferentes concentraciones de Bacitracina (25, 50 y 100 microgramos/ml) al medio de cultivo en el cual se crecía el microorganismo, encontrándose que Bacillus subtilis ATCC 6633 no es susceptible al antibiótico, por lo que la producción de Bacitracina no afecta su crecimiento propio.

El pH aumenta a lo largo de la cinética llegando a un valor de 9.0. Este comportamiento se ha reportado antes (2,3), observándose que la producción de Bacitracina se ve afectada por el pH es demasiado ácido ó básico, la producción disminuye, en algunos casos, hasta concentraciones no detectables.

De ahí que se recomienda controlar el pH para la producción del antibiótico. Esto se ha logrado utilizando un sistema amortiguador, por ejemplo la adición de iones fosfato ó de  $\text{CaCO}_3$  al medio de fermentación (12).

Bernlohr y Novelli (12) reportaron que durante la fermentación de B. licheniformis A5 y utilizando el medio de Hills, el pH del medio no aumenta más allá de 7.5, lo cual nos indica que éste medio contiene un buen sistema amortiguador, a diferencia del utilizado en el laboratorio. Es muy posible que la producción del antibiótico en nuestros experimentos aumente si se utiliza un sistema amortiguador eficaz durante la fermentación.

Por otro lado el ensayo microbiológico para -

cuantificar el antibiótico reveló que la cepa tiene producción máxima de 2.29 U/ml a las 48 horas, decayendo a concentraciones no detectables a partir de las 72 horas, cabe mencionar que la máxima producción de Bacitracina se obtuvo a pH 9.0, por lo que no sería raro pensar que esta producción aumentara si se controla el pH, tal como se mencionó antes. Esta disminución puede deberse también a que la Bacitracina es un intermediario de alguna vía metabólica (8).

Los experimentos realizados para determinar las condiciones óptimas de mutación indicaron que las células en fase estacionaria ó postlogarítmica de crecimiento son más susceptibles al mutágeno, ya que se obtuvieron porcentos de muerte de 99.5 a una concentración de 15 microgramos/ml de 9-aminoacridina, mientras que en fase logarítmica se obtuvieron porcentos de 80.74.

Esto puede explicarse, quizá por el hecho de que la permeabilidad de la pared celular al mutágeno, es mayor en células en fase estacionaria que en células en fase logarítmica. Se sabe que los microorganismos del género Bacillus están sujetos a una serie de cambios en su estructura celular durante la fase postlogarítmica de crecimiento, etapa en la cual ocurre el proceso de esporulación (31). Este proceso se ha estudiado ampliamente, encontrándose que al iniciarse, comienza también la producción de diferentes sustancias, como enzimas proteolíticas y antibióticos peptídicos (28, 31).

Dentro de las enzimas que se producen están las proteasas y amilasas (entre otras) que tienen una ele

vada actividad. Algunas de éstas enzimas se encuentran asociadas a la pared celular del microorganismo (28). Probablemente la producción de éstas enzimas, ahunada a la de los antibióticos peptídicos por el microorganismo estén relacionados con el aumento en la susceptibilidad de las células al mutágeno.

Por otro lado se seleccionaron de las clonas-sobrevivientes al tratamiento mutagénico aquéllas que pudieron haber aumentado su producción de Bacitracina mediante un método que fué estandarizado en el laboratorio. Es necesario puntualizar que el método de selección de las mutantes fué una de las partes más importantes de este trabajo, ya que en ningún trabajo anterior se había reportado. Dentro de las ventajas que tiene con respecto al método tradicional de selección está su abatimiento en el tiempo empleado para la obtención de la mutante y también su disminución en los costos, en cuanto a las desventajas que se le encuentran está la necesidad de medir con exactitud volúmenes muy pequeños del cultivo.

Vitkovic y Sadoff reportaron en 1975 una nueva técnica para la identificación de Bacitracina en la cual el antibiótico se identifica espectrofotométricamente a 253 nm, gracias a que el péptido posee un anillo  $\Delta$ -2-thiazolina que le da la capacidad de absorber a esta longitud de onda (36). Esta forma de identificación del antibiótico podría combinarse con el método de selección empleado para simplificar y abatir el tiempo empleado.

Es importante mencionar que se sabe muy poco-

acerca del mecanismo celular responsable de la sobreproducción de antibióticos por mutantes de distintos microorganismos. Sin embargo, Dulay (11) ha sugerido que posiblemente haya un bloqueo en las vías alternativas de los intermediarios involucrados en la biosíntesis del antibiótico, y que éste bloqueo incremente la producción. Por otro lado Demain (8, 11) indica que quizá se presentan alteraciones en el mecanismo de control para la síntesis -- del antibiótico. Sin embargo, ninguna de las hipótesis ha sido comprobada completamente.

Es evidente que el dilucidar éste problema podría ayudar a simplificar el método de selección de las mutantes hiperproductoras, dado que podrían emplearse métodos de mutación dirigida, emplear algún marcador de auxotrofia en la selección, etc.

Sin embargo como se indicó en resultados, la frecuencia de mutación obtenida es de  $1.9 \times 10^{-3}$  estando dentro de los datos reportados para mutación inducida (1), lo cual indica que el método de selección empleado es adecuado a pesar de la desventaja ya señalada.

A la mutante que produjo la mayor cantidad de antibiótico se le denominó GM 2000 y posteriormente se -- procedió a caracterizarla.

Las características de morfología colonial y microscópica de la cepa GM 2000 fueron similares a la de la cepa silvestre. La curva de crecimiento mostró que el microorganismo tiene un tiempo de generación de 0.89 horas, a diferencia de la cepa silvestre. Además tarda

una hora en entrar a la fase logarítmica de crecimiento - la cual dura aproximadamente 10 horas.

Por otro lado, los experimentos para determinar los requerimientos nutricionales de la cepa mutante - mostraron que es auxótrofa.

Estas mutantes auxótroficas son útiles para - delimitar las vías naturales de síntesis de los compuestos orgánicos. Cada gene controla la actividad de una enzima específica y en consecuencia cualquier mutación - interrumpe un fenómeno ó etapa bioquímica del microorganismo. Las mutantes auxótroficas se pueden emplear, -- por tanto, para identificar y precisar las necesidades - nutricionales del mismo. Estas necesidades se utilizan también como "marcadores de selección".

En base a lo anterior se explica la importancia de obtener mutantes auxótroficas. Podrían emplearse por ejemplo para la selección de cepas hiperproductoras de antibióticos, seleccionando para el "marcador" -- que esté relacionado con el incremento en la producción - del mismo, como se mencionó anteriormente.

La mutación adquirida por la cepa GM 2000 alteró varias características del microorganismo, como son: la producción del antibiótico, las características de -- crecimiento y los requerimientos nutricionales. Por -- tanto se puede pensar que la mutación es de tipo pleio-- trófica.

De hecho algunos autores ya han reportado efectos pleiotróficos de las mutaciones, sobre la produc-

ción de antibióticos y también sobre el proceso de esporulación. Por ejemplo Benner (17) encontró que únicamente el 4% de 400 mutantes monoauxótrofos de Penicillium notatum fueron deficientes en la producción de penicilina; -- por otro lado, Mac Donald (17) demostró que la mayoría de las mutantes auxótrofas para aminoácidos y vitaminas de la Penicillium Chysozeum producen menos antibiótico que la progenitora. En nuestro caso la mutación auxotrófica está relacionada con un aumento de la producción de Bacitracina a diferencia de lo informado para Penicillium, esto sugiere que el cambio en la biosíntesis y la regulación del mismo es diferente en cada microorganismo, esta sugerencia se apoya además si se toma en cuenta que la Bacitracina es un antibiótico peptídico mientras que la penicilina no lo es.

El comportamiento cromatográfico del antibiótico producido por la cepa GM 2000 es semejante al observado con la cepa silvestre. En el medio fermentado por la cepa se identificó una mancha con un Rf de 0.40 valor que posiblemente corresponda al antibiótico.

La cinética de producción de Bacitracina por la cepa GM 2000, mostrada en la figura No. 8 es un poco diferente que la de la cepa silvestre; la producción de Bacitracina comienza cuando la fase exponencial ha pasado, llegando a producir 10.8 U de Bacitracina/ml. La producción se mantiene durante 24 horas, decayendo posteriormente a valores no detectables a partir de las 72 horas.

Este fenómeno ha sido estudiado ampliamente indicándose que, en general, la síntesis de los antibióti-

cos peptídicos comienza cuando el microorganismo ha pasado la fase logarítmica de crecimiento ó "tropofase". La fase de producción del antibiótico (ó metabolito secundario) es llamada "ideofase" y de ahí que las sustancias producidas a éste nivel se denominen ideolitos. Se sabe que el control de la síntesis de antibióticos por los microorganismos es a nivel genético, y que los genes que codifican para su biosíntesis pueden ser cromosomales ó extracromosomales (17). Específicamente la síntesis de Bacitracina se inicia debido a la acción de una enzima, la antibiótico-sintetasa (23). El control de la expresión genética de ésta enzima puede ocurrir por interferencia con la transcripción de la información del DNA al mRNA ya que se ha observado que la producción de Bacitracina puede ser bloqueada adicionando al sistema Actinomicina D, un inhibidor del proceso de transcripción (23).

Por otra parte, la producción del antibiótico puede ser afectada al inhibir el proceso de esporulación del microorganismo. Se ha demostrado que al adicionar Malonato de etilo (un inhibidor del proceso de esporulación) al medio del cultivo, se inhibe casi en un 100% la producción de Bacitracina (2). Esto demuestra que la producción del antibiótico está íntimamente relacionada con el proceso de esporulación.

Como se mencionó en el caso de la producción del antibiótico por la cepa silvestre, la disminución en la cantidad del antibiótico puede deberse a que es un intermediario de algún camino metabólico, al respecto Strange (2) indica que los aminoácidos que constituyen la molécula de Bacitracina se localizan en la pared celular del microorganismo. Dice que los peptidos son liberados de-

la pared celular por acción de enzimas hidrolíticas sobre ella. Además, éstos antibióticos peptídicos se han aislado de cultivos que están en proceso de formación de esporas (2,3), que como ya se mencionó implica cambios metabólicos importantes en la célula bacteriana.

Por otro lado, como se observa en la figura -- No. 8 la producción del antibiótico baja a partir de las 72 horas de fermentación a concentraciones no detectables. Por tanto el rango de síntesis activa de Bacitracina duró aproximadamente 24 horas. Este comportamiento ha sido reportado antes, se menciona que el período de síntesis activa de antibiótico puede ser tan corto como 4 horas y llegar hasta 20 horas. Sin embargo ésta etapa de producción de antibiótico puede ser prolongada por varios días manejando adecuadamente la fuente de carbono (empleando cultivos continuos y manteniendo niveles de fuente de -- carbono no inhibitorios ó no represivos). Por ejemplo, la producción industrial de penicilina es conducida por más de 200 horas y mejor aún por 10 días utilizando un sistema "feedback".

Sin embargo, llega un momento durante el transcurso de la fermentación donde la producción disminuye. Algunos autores dicen que hay tres razones por las cuales cesa la biosíntesis de los antibióticos: primero, la caída irreversible de una ó más enzimas de las vías de síntesis de antibióticos; segundo, el efecto feedback del antibiótico acumulado y tercer, el agotamiento de los precursores intermediarios del antibiótico.

Con respecto al comportamiento del pH durante-

la fermentación por la cepa GM 2000, se observó que es se mejante al presentado por la cepa silvestre, aunque con - la cepa GM 2000 el pH aumentó una unidad con respecto al - que se obtiene durante la fermentación con la cepa silves - tre.

Bernlohr y Novelli indicaron que la Bacitracina es inestable a pH altos. Sin embargo, en el presente trabajo la máxima producción de Bacitracina se obtuvo a - pH 8.0 para la cepa GM 200 y 9.0 para el caso de la cepa - silvestre. Como se sugirió anteriormente pensamos que - la producción ó la estabilidad del antibiótico podrfia au - mentar si el pH del medio se controlará para disminuir la alcalinidad observada.

Haavik (12) demostró, por otro lado, que la -- glucosa inhibe la producción del antibiótico durante las - primeras horas de crecimiento. La glucosa es metaboliza da provocando la formación y acumulación de ácido acético y pirúvico, principalmente, en el medio del cultivo, tra - yendo como consecuencia un abatimiento en el pH. Sin em bargo la cepa empleada es un aerobio estricto en el que - la glucosa debe metabolizarse hasta  $CO_2$  y  $H_2O$  lo cual da - ría un aumento más que un abatimiento del pH.

Como se señaló anteriormente las cepas hiper-- productoras de antibiótico se obtienen después de un lar - go proceso que involucra varios tratamientos mutagénicos - y selección de las cepas cuya producción aumenta debido - a la mutación adquirida, por tanto se procedió a tratar - a la cepa GM 200 con 9- aminoacridina para seleccionar mu tantes cuya producción fuera mayor que la de la cepa GM -

2000. Al cuantificar la producción de las clonas sobrevivientes al tratamiento mutagénico empleando como testigos la cepa ATCC 6633 y GM 2000, se observó que la producción de ésta última era menor que la cepa silvestre, lo cual significa que la cepa GM 2000 revirtió espontáneamente en cuanto a la producción del antibiótico. Este resultado no se esperaba dado que se habfan realizado experimentos (ver resultados) que demostraban que la mutación era estable; consideramos que debido a una serie de problemas que se presentaron durante la conservación de la cepa (específicamente cambios en la temperatura -- del cuarto refrigerador) se presentó la reversión y sugerimos por tanto se tengan cuidados extremos en la conservación de cualquier cepa, aún cuando ésta se conserve en el estado de esporas.

Por otro lado una de las clonas sobrevivientes obtenidas del tratamiento mutagénico de la cepa GM - 2000 produjo aproximadamente 3.0 U de Bacitracina/ml a las 48 horas de fermentación; valor que es superior a lo que produce la cepa silvestre ATCC 6633; por lo tanto podría ser útil para proseguir los tratamientos mutagénicos con objeto de aumentar la producción del antibiótico.

## C O N C L U S I O N E S

- No se observaron diferencias morfológicas entre las cepas silvestre y mutante como en otros casos, en donde se observan cambios en la morfología colonial, que facilitan la selección de mutantes hiperproductoras.
- Se diseñó una metodología que permite determinar la --producción del antibiótico de un número considerable --de clones sobrevivientes al tratamiento mutagénico en un tiempo corto.
- La mutación adquirida por la cepa GM 2000 mostró ser --de tipo pleiotrófico, ya que se alteraron varias caracterfsticas del microorganismo, por ejemplo sus caracterfsticas de crecimiento, tiempo de generación, requerimientos nutricionales, además de la producción del antibiótico.
- Se demostró que la elevación ó alcalinización del pH--del medio de fermentación utilizado trae como conse---cuencia la disminución en la producción del antibióti--co (a concentraciones que ya no es posible interpolar--en la curva tipo Bacitracina), tanto en la cepa silvestre como en la mutante GM 2000. Por lo que se sugiere la utilización de un sistema amortiguador más eficaz --que el utilizado.
- Las concentraciones de antibiótico producidas por la --cepa mutante y la silvestre no fueron lo suficientemente altas como para inhibir su propio crecimiento, por--lo que se concluyó que no son susceptibles a la Baci--tracina.

- Se demostró que la Bacitracina modifica su Rf al correr sobre la placa de sílica gel, cuando se encuentra en el medio de fermentación, sugiriéndose que esto es debido a su unión con alguna molécula del mismo.
  
- Se sugiere que la reversión de la cepa GM 2000 pudo ser debida a cambios de temperatura.

## RESUMEN

Con objeto de obtener una mutante de Bacillus subtilis hiperproductora de Bacitracina se seleccionó a la cepa ATCC 6633 por producir en forma natural el antibiótico. Al caracterizar al microorganismo se encontró que su morfología colonial y microscópica corresponden completamente al género Bacillus. La curva de crecimiento mostró que la cepa tarda menos de una hora en entrar a la fase logarítmica de crecimiento, la cual dura aproximadamente 4 horas. El tiempo de generación calculado fué de 0.55 horas. En cuanto a sus requerimientos nutricionales se encontró que es protótrofa.

El antibiótico producido se identificó por -- cromatografía en capa fina, obteniendo una mancha de color marrón con Rf de 0.40 que corresponde a la producida por el testigo Bacitracina Sigma.

La cinética de producción del antibiótico mostró que el microorganismo produce 2.0 unidades de Bacitracina por ml a las 48 horas de fermentación, bajando posteriormente a concentraciones no detectables.

El título máximo de bacterias se obtuvo a las 48 horas de fermentación con  $6.9 \times 10^9$  bacterias/ml, bajando hasta  $1.83 \times 10^9$  a las 96 horas.

Durante el transcurso de la fermentación el pH del medio se alcalinizó considerablemente, llegando a 9 a partir de las 48 horas y manteniéndose constante hasta las 96 horas de la fermentación.

Por otro lado la cepa silvestre fué sometida a una serie de tratamientos mutagénicos con 9- aminoacridina para obtener las mutantes hiperproductoras. Las condiciones óptimas de mutación utilizadas fueron: 10 microgramos/ml de 9- aminoacridina, fase estacionaria de crecimiento y 10 horas de exposición al mutágeno.

Se seleccionó, mediante una metodología diseñada en el laboratorio, y que permite el análisis en un tiempo corto de un número considerable de clonas sobrevivientes al mutágeno, una cepa que produjo 10.8 U de Bacitracina/ml a las 48 horas de fermentación y que fué denominada GM 2000.

Esta cepa fué caracterizada en forma similar a la cepa silvestre. Su morfología colonia y microscópica fué similar a la cepa silvestre. La curva de crecimiento mostró que requiere una hora para entrar a la fase logarítmica de crecimiento, la cual dura aproximadamente 9 horas. El tiempo de generación calculado fué de 0.89 horas.

Sus requerimientos nutricionales indicaron que es auxótrofa. Por otro lado el antibiótico que producía se identificó por cromatografía en capa fina, obteniendo un Rf de 0.40. La cinética de producción del antibiótico mostro que el microorganismo produce 10.8 unidades de Bacitracina/ml a partir de las 24 horas, manteniéndose durante 24 horas más y bajando posteriormente a concentraciones no detectables. El pH del medio se elevó hasta 10 a partir de las 48 horas, manteniéndose constante hasta las 96 horas de fermentación.

Por otro lado, al igual que la cepa silvestre, y con el fin de incrementar la producción de Bacitracina, - la cepa GM 2000 se sometió a un tratamiento mutagénico con 9- aminoacridina. Las condiciones óptimas de mutación fueron: 15 microgramos/ml de 9- aminoacridina, fase logarítmica de crecimiento y 10 horas de exposición al mutágeno.

De las clonas sobrevivientes se seleccionaron las mutantes hiperproductoras. Sin embargo, ninguna de las clonas probadas produjo un incremento considerable en la -- producción del antibiótico.

Después de checar varias veces la producción - de antibiótico por la cepa GM 2000 se demostró que la pro-- ducción habfa disminuido a concentraciones menores que las-- producidas por la cepa silvestre, este fenómeno fué atribui-- do a una posible reversión de la mutación.

La causa principal de la reversión fué atribui-- da a la temperatura de refrigeración, la cual no fué cons-- tante.

En base a lo anterior se sugiere para trabajos posteriores, el manejo más adecuado de las cepas, por ejemplo su liofilización inmediata.

Por otro lado, al igual que la cepa silvestre, y con el fin de incrementar la producción de Bacitracina, - la cepa GM 2000 se sometió a un tratamiento mutagénico con 9- aminoacridina. Las condiciones óptimas de mutación fueron: 15 microgramos/ml de 9- aminoacridina, fase logarftmica de crecimiento y 10 horas de exposición al mutágeno.

De las clonaz sobrevivientes se seleccionaron- las mutantes hiperproductoras. Sin embargo, ninguna de las clonas probadas produjo un incremento considerable en la -- producción del antibiótico.

Después de checar varias veces la producción - de antibiótico por la cepa GM 2000 se demostró que la pro-- ducción habfa disminuido a concentraciones menores que las- producidas por la cepa silvestre, este fenómeno fué atribui do a una posible reversión de la mutación.

La causa principal de la reversión fué atribui da a la temperatura de refrigeración, la cual no fué cons-- tante.

En base a lo anterior se sugiere para trabajos posteriores, el manejo más adecuado de las cepas, por ejem- plo su liofilización inmediata.

## B I B L I O G R A F I A

- 1.- Auerbach, C. (1976) Mutation Research  
Ed. Chapman and Holl. New York.
- 2.- Bernlohr, R.W., and G.D. Novelli (1960) Some characteristics of bacitracin production by Bacillus licheniformis. Arch. Biochem. Biophys. 87: 232-238
- 3.- Bernlohr, R.W., and G.D. Novelli (1963) Bacitracin biosynthesis and spore formation: The physiological role of an antibiotics. Arch. Biochem. Biophys. 103: 94-104.
- 4.- Cabrera-Juárez E. (1969) Mutación y replicación del DNA. Rev. Lat-amer. Microbiol Parasitol. 11: 219-236
- 5.- Cerdá-Olmedo and P. Rufz-Vázquez (1978) Nitrosoguanidine mutagénesis. In Genétics of Industrial Microorganisms. Ed. A.S.M. p: 15-20
- 6.- Daum, S.J. (1979) New gentamicin-type antibiotics produced mutasynthesis. In Microbiology 1979 ed. A.S.M. p: 312-313.
- 7.- Davis, B.D., R. Dulveco, HN. Eisen, H.S. Ginsberg & W.R. Wood Jr. (1970) Microbiology. 2a. edition  
Ed. Harper & Row Publishers Inc. New York.
- 8.- Demain, A.L. (1973) Mutation and the production of secondary metabolites. Adv. Appl. Microbiol 6: 177-202.

- 9.- Elander, R.P. (1978) Mutations affecting antibiotic-synthesis in fungi producing beta-lactam. In Genetics of Industrial Microorganisms. Ed. A.S.M. p: 21-35.
- 10.- Enrrfquez Ortfz, A. (1983) Tesis. Diseño de un medio de cultivo industrial para la producción de bacitracina por cepas del género Bacillus.
- 11.- Haavik, H.I. and Vessia B. (1978) Bacitracin production by the high-yielding mutant Bacillus licheni---formis strain al: Stimulatory effect of L-leucine. Acta. Path. Microbiol. Scand Sect. B. 86: 67-70
- 12.- Haavik, H.I. (1974) Studies on the formation of bacitracin by Bacillus licheniformis: Effect of glu-cosa. Journal of general Microbiology 81: 383-390.
- 13.- Haavik, H.I. (1974) Studies on the formation of bacitracin by Bacillus licheniformis: Role of catabo lite repression and organic acids. Journal of gene ral Microbiology 84: 321-326.
- 14.- Haavik, H.I. (1974) Studies on the formation of ba citracin by Bacillus licheniformis: Effect of inor ganic phosphate. Journal of general Microbiology 84: 226-230.
- 15.- Haavik, I.I. (1975) Bacitracin production by the - neotype. Acta. Path Microbiol. Scand Sect B 83: 534-540.

- 16.- Hoff, D.A., R.E. Bennett, and A.R. Stanley (1947) - Science 106, 551.
- 17.- Hopwood, D.A., and M.J. Merrick (1977) Genetics of - antibiotics production. Bacteriological Reviews - Vol. 41 No. 3 p: 595-635.
- 18.- Hicker, R.J. (1979) Bacitracin its manufacture and- uses. Progress in Industrial Microbiology p: 95-150
- 19.- Katz, E., and A.L. Demain (1977) The peptide antibio- tics of Bacillus: Chemistry, biogenesis and possible- functions. Bacteriological Reviews. Vol. 41 No. 2- p; 449-474.
- 20.- Kenneth, L.R. Jr. (1979) Mutasyntesis of antibiotics on overview. In Microbiology 1979. Ed. A.S.M. p: 307.
- 21.- Kenneth, L.R. Jr. (1979) Biosynthesis and mutasynthe- sis of aminocyclitol antibiotics. In Microbiology - 1979. Ed. A.S.M. p: 308-311.
- 22.- LANFI (1980) Proyecto 030210. Bacitracina-Zinc.
- 23.- Martfn, J.F. and A.D. Demain (1980) Control of anti- biotic biosynthesis. Microbiological Reviews. Vol. 44 No. 2 p: 230-251.
- 24.- Martfn, J.F., J.M. Luengo, G. Revilla and J.R. Villa- nueva. (1978) Biochemical genetics of the betalactam- antibiotics biosynthesis. In Genetics Of Industrial Mikroorganisms. Ed. A.S.M. p: 83-89.

- 25.- Nuesch, J. (1978) Contribution of genetics to the -- biosynthesis of antibiotics. In Genetics of Industrial Microorganisms. Ed. A.S.M. p: 77-82.
- 26.- Peter, J., L. Daniels and D.F. Rane (1979) Synthe--- tic and mutasynthesis antibiotics related to sisomicin. In Microbiology 1979. Ed. A.S.M. p: 314-317.
- 27.- Priest, F.G. (1977) Extracellular enzyme synthesis - in the genus Bacillus. Bacteriological Reviews. Vol. 41 No. 3 p: 711-753.
- 28.- Sadoff, H.L. (1972) Sporulation antibiotics of Bacillus species. In spore V p: 157-166.
- 29.- Sebek, O.K. (1979) Novobiocin and other antibiotics- as potential mutasynthesis models. In Microbiology 1979. Ed. A.S.M. p: 318-324.
- 30.- Sermonti, G. (1978) Mutation and microbial breeding- In Genetics of Industrial Microorganisms. Ed. ---- A.S.M. p: 10-14.
- 31.- Schaeffer, P. (1969) Sporulation and the production- of antibiotics, coenzymes and exotoxins. Bacterio logical Reviews. Vol 33 No. 1 p: 48-71.
- 32.- Shier, W.T., L.R. Kenneth Jr. and D. Gottlieb (1969) Preparation of four new antibiotics from a mutant of Streptomyces fradiae. Proc. Natl. Acad. Scie. USA - Vol. 63 p: 198-204.

- 33.- Smith, P.F. and Keary (1975) Genetics structure and--  
function. Ed. The Whiterfriars Press Ltd. London.
- 34.- Snell, E.E., P.D. Boyer, A. Heister and C.C. Richard  
son. (1976) Annuals Review of Biochemistry. Ed. ---  
Annual Review Inc. Palo Alto California. Vol. 45 ---  
p: 11-33.
- 35.- Vitkovic, L. and H.L. Sadoff (1977) In vitro produc-  
tion of Bacitracin by proteolysis of vegetative ----  
Bacillus licheniformis cell protein. Journal of -  
Bacteriology Vol. 131 No. 3 p: 897-905.
- 36.- Vitkovic, L. and H.L. Sadoff (1975) Relationshipbet-  
ween sporulation, protease and antibiotics in spo  
rulating Bacillus licheniformis. Spore VI Ed. ---  
A.S.N. p: 362-366.