



109-
29

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

MEJORAMIENTO GENETICO DE UNA CEPA DE
Streptomyces griseus PRODUCTORA DE
ESTREPTOMICINA.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE;

B I O L O G O

P R E S E N T A ;

DANIEL GENARO SEGURA GONZALEZ

TESIS CON
FOLIO DE ORIGEN

MEXICO, D. F.

1990



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.

INDICE

RESUMEN.....	1
INTRODUCCION.....	2
GENERALIDADES.....	4
Biología y Clasificación de <i>Streptomyces griseus</i>	4
Microorganismos productores de estreptomicina.....	4
Características de la estreptomicina.....	5
Via de biosíntesis.....	7
Factores de regulación.....	10
Mecanismo de acción de la estreptomicina.....	12
Resistencia a la estreptomicina en <i>S. griseus</i>	12
Genética de la producción de estreptomicina.....	14
Mutagénesis.....	16
OBJETIVO.....	18
MATERIAL Y METODOS.....	19
RESULTADOS Y DISCUSION.....	34
CONCLUSIONES.....	58
BIBLIOGRAFIA CITADA.....	60

INDICE DE FIGURAS

- Figura 1.- La molécula de estreptomicina.....6
- Figura 2.- Vía biosintética de la estreptomicina.....8
- Figura 3.- Gráficas de crecimiento del microorganismo y producción de antibiótico en diferentes medios de cultivo....35
- Figura 4.- Gráficas de crecimiento del microorganismo y producción de antibiótico en diferentes medios de cultivo....36
- Figura 5.- Resistencia de las esporas de *S. griseus* ATCC 12475 en concentraciones crecientes de estreptomicina.....39
- Figura 6.- Curvas de sobrevivencia del microorganismo y frecuencia de mutantes resistentes a estreptomicina inducidas por el tratamiento con nitrosoguanidina.....41
- Figura 7.- Cinéticas de crecimiento del microorganismo y producción de estreptomicina de la cepa original y de la cepa mutante en medio de Carbajal con 10g/l de glucosa.....45
- Figura 8.- Cinéticas de crecimiento del microorganismo y producción de estreptomicina de la cepa original y de la cepa mutante en medio de Carbajal con 50g/l de glucosa.....46

Figura 9.- Resistencia de las esporas de la cepa original y de la mutante en concentraciones crecientes de estreptomycinina.....	49
Figura 10.- Estabilidad de la cepa mutante.....	51
Figura 11.-Crecimiento y producción de estreptomycinina alcanzados por la cepa original y la cepa mutante con diferentes inoculos.....	54
Figura 12.- Cromatografía del antibiótico producido por la cepa original y por la mutante.....	57

RESUMEN

La estreptomycinina es un antibiótico con amplio espectro de actividad que tiene gran importancia clínica principalmente en el tratamiento contra *Mycobacterium tuberculosis*, por lo que se encuentra dentro del cuadro básico de medicamentos. Este compuesto tiene además gran importancia para la agricultura pues se utiliza para prevenir y combatir algunas enfermedades de plantas de interés económico. Sin embargo, este antibiótico no se produce en México por lo que la totalidad de la demanda se cubre con su importación. Debido a lo anteriormente expuesto resulta interesante la posibilidad de producir estreptomycinina en México, y uno de los factores limitantes en este sentido es la carencia de cepas que permitan niveles de producción adecuados.

El presente trabajo se encaminó hacia la obtención de una cepa de *Streptomyces griseus* que permitiera una mayor producción de estreptomycinina a partir de una cepa resistente a fagos que se tenía disponible, esto por medio de un proceso de mutagénesis con Nitrosoguanidina y la posterior selección del microorganismo mejorado. Dicha selección se vio facilitada por un fenómeno que se presenta frecuentemente en microorganismos productores de antibióticos que consiste en que un incremento en la resistencia hacia su propio producto corresponde a un incremento en la cantidad de antibiótico sintetizada, por lo que al seleccionar mutantes con resistencia a estreptomycinina incrementada se obtuvo una cepa que produce hasta 1100 µg/ml de estreptomycinina, cantidad superior en un 100 % a la sintetizada por la cepa de la cual se partió.

INTRODUCCION

Los metabolitos primarios son moléculas orgánicas que tienen un papel esencial ya sea en el crecimiento o en la reproducción celular. A diferencia de estos compuestos, los llamados metabolitos secundarios no tienen una función aparente para el organismo que los produce. Estos son sintetizados generalmente en las últimas etapas del ciclo de crecimiento (67). Dentro de este grupo de metabolitos se encuentran los antibióticos, que comercialmente son el grupo más importante. Un antibiótico se puede definir como un compuesto orgánico de bajo peso molecular sintetizado por un microorganismo que suprime específicamente el crecimiento o destruye a ciertos microorganismos cuando se encuentra en dilución muy alta (32,1).

En la actualidad se conocen más de 5000 antibióticos, cifra que aumenta a razón de 300 por año aunque la mayoría son tóxicos o inoperantes. De estos, los hongos producen alrededor de un 25% y los actinomicetos un 75% y dentro de este grupo el género *Streptomyces* produce el 75% (21). De la totalidad de los antibióticos conocidos, en el mercado existe solamente alrededor de un centenar, la mayoría obtenido de estreptomicetos, aunque éste está dominado por cefalosporinas y penicilinas las cuales son sintetizadas por hongos (1).

En México se producen ampicilina, cloranfenicol, eritromicina, penicilinas y gentamicina (estos dos últimos se importan parcialmente); por otro lado se importan adriamicina, anfotericina, bacitracina, dicloxacilina, griseofulvina, neomicina, polimixi-

na, rifampicina, kanamicina y estreptomina en mayor proporción además de otros que se importan en cantidades menores.

Debido a que la estreptomina no se produce en México y se encuentra dentro del cuadro básico de medicamentos, resulta interesante la posibilidad de producirla en nuestro país. Sin embargo, no se cuenta con la tecnología apropiada para su adecuada producción.

Cuando un metabolito secundario tiene importancia comercial, como es el caso de la estreptomina, son varias las estrategias que se pueden seguir para optimizar la producción. Mucho se puede hacer alterando la composición del medio, regulando el crecimiento del microorganismo y un instrumento poderoso en la optimización de un proceso es la selección de cepas y su mejoramiento genético (36).

El mejoramiento genético de cepas productoras de metabolitos de interés industrial por medio de métodos empíricos ha sido ampliamente utilizado y ha tenido un éxito considerable desde el descubrimiento de estos productos. En la actualidad, a pesar de que existen numerosas técnicas para el mejoramiento de cepas, las técnicas de genética tradicional siguen siendo de gran utilidad (71).

GENERALIDADES

BIOLOGIA Y CLASIFICACION DE *STREPTOMYCES GRISEUS*.

Los actinomicetos son procariontes Gram positivos que se caracterizan por formar hifas en algún estadio de su desarrollo (67), su reproducción es generalmente asexual aunque existen procesos sexuales. La mayoría son aerobios y saprofiticos y llevan a cabo un importante papel en los suelos al descomponer la materia orgánica y contribuir a la formación de la estructura granular del suelo gracias a sus hifas (30).

El género *Streptomyces* (Waksman y Henrici, 1943), perteneciente a la familia Streptomycetaceae, agrupa unas 600 especies que forman hifas basales y aéreas muy ramificadas. El micelio basal es no fragmentado y el micelio aéreo forma largas cadenas de esporas que se generan por septación regular de las hifas. Estas artrosporas se encuentran encerradas en una vaina delgada y fibrosa. En *Streptomyces griseus* al madurar las esporas y separarse quedan libres de la vaina a diferencia de lo que ocurre en otras especies del género (15).

MICROORGANISMOS PRODUCTORES DE ESTREPTOMICINA.

Streptomyces griseus es el principal microorganismo productor de estreptomicina utilizado en la industria, aunque este compuesto también es sintetizado por *S. bikiniensis*, *S. ornatus*, *S. galbus* y *Streptoverticillium mahuense* (64,24).

CARACTERISTICAS DE LA ESTREPTOMICINA.

La estreptomicina fue descubierta en 1944 por Waksman y col. Fue el primer antibiótico comercialmente exitoso producido por un actinomiceto gracias a su efectividad en el tratamiento de la tuberculosis (19). Además fue el primer miembro reportado de los antibióticos aminoglucósidos, que son sintetizados por varias familias de microorganismos (13).

De acuerdo a la clasificación de Janos Berdy (7), la estreptomicina se encontraría dentro del siguiente grupo:

FAMILIA 1. Antibióticos que contienen carbohidratos en su estructura.

SUBFAMILIA 2. Antibióticos aminoglucósidos, caracterizados por poseer una molécula de aminociclohexanol.

GRUPO 1. Derivados de estreptaminas. *

TIPO 1. Estreptomicinas.

La estructura de este antibiótico fue elucidada por Kuehl y col. en 1947 (13), se trata de un trisacárido compuesto de tres subunidades únicas de D-estreptidina, L-estreptosa y N-metil-L-glucosamina (figura 1)(70).

Existen alrededor de 300 derivados de estreptomicina obtenidos por modificación de la estructura, ya sea por métodos químicos o biológicos. Clínicamente se utilizan únicamente dos de ellos (7). Otras estreptomicinas se ilustran en la figura 1.

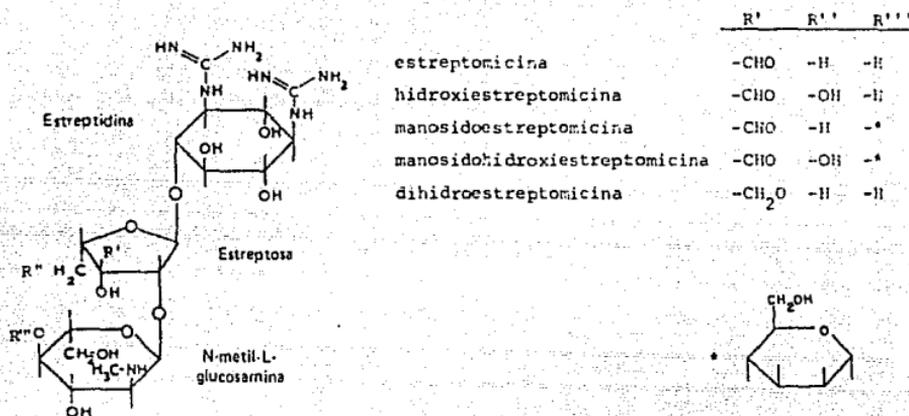


Figura 1. La molécula de estreptomicina (70).

La estreptomicina es un antibiótico con acción bactericida y bacteriostática con amplio espectro de actividad, pues afecta tanto a bacterias Gram positivas como a Gram negativas, por lo que tiene gran importancia clínica principalmente en el tratamiento contra *Mycobacterium tuberculosis*, a pesar de su efecto nefrotóxico y ototóxico (6b).

Este compuesto también tiene importancia en la agricultura, pues se utiliza para prevenir y combatir enfermedades como el tizón bacteriano de la soya (44), la pudrición de la semilla de la papa partida (28), el tizón del nogal (57), el tizón bacteriano del frijol pinto (53), el tizón veloso del frijol (82), el tizón del tabaco (34), la marchitez de Stewart del maíz (69) y la mancha bacteriana del tomate (14), entre otras, así como también para la conservación postcosecha de frutos como el aguacate (3).

BIOSINTESIS.

La estreptomicina puede ser producida en un medio simple de glucosa, amoníaco y sales. La siguiente reacción muestra la conversión total (81) :



S. griseus utiliza la glucosa principalmente por la vía Embden Meyerhof y el ciclo del ácido tricarbóxico; una pequeña parte se metaboliza vía hexosa-monofosfato. El grado de catabolismo de la glucosa es regulado por la transferencia de O_2 y por la concentración de fosfato en el medio (19). De hecho altas concentraciones de fosfato aceleran la utilización de la glucosa por otras vías y provocan una disminución en la producción de este antibiótico.

La vía biosintética de la estreptomicina se puede observar en la figura 2. Los derivados de inositol y los nucleótidos difosforazúcares son los precursores de las tres estructuras anulares de la molécula.

La estriptidina está constituida por una molécula de ciclitol con dos grupos guanidino ($-\text{NH}-\overset{\text{NH}}{\underset{\text{H}}{\text{C}}}-\text{NH}_2$). Para la síntesis de cada grupo guanidino de esta molécula a partir de un grupo hidroxilo del ciclitol se requieren 5 reacciones: primero ocurre una deshidrogenación para formar el cetociclitol, posteriormente se da una transaminación, por medio de la cual el grupo 2-amino de la L-glutamina se une al cetociclitol, luego ocurre una fosforilación del grupo hidroxilo de la posición para al grupo amino, la conversión del grupo amino a guanidino se da por una

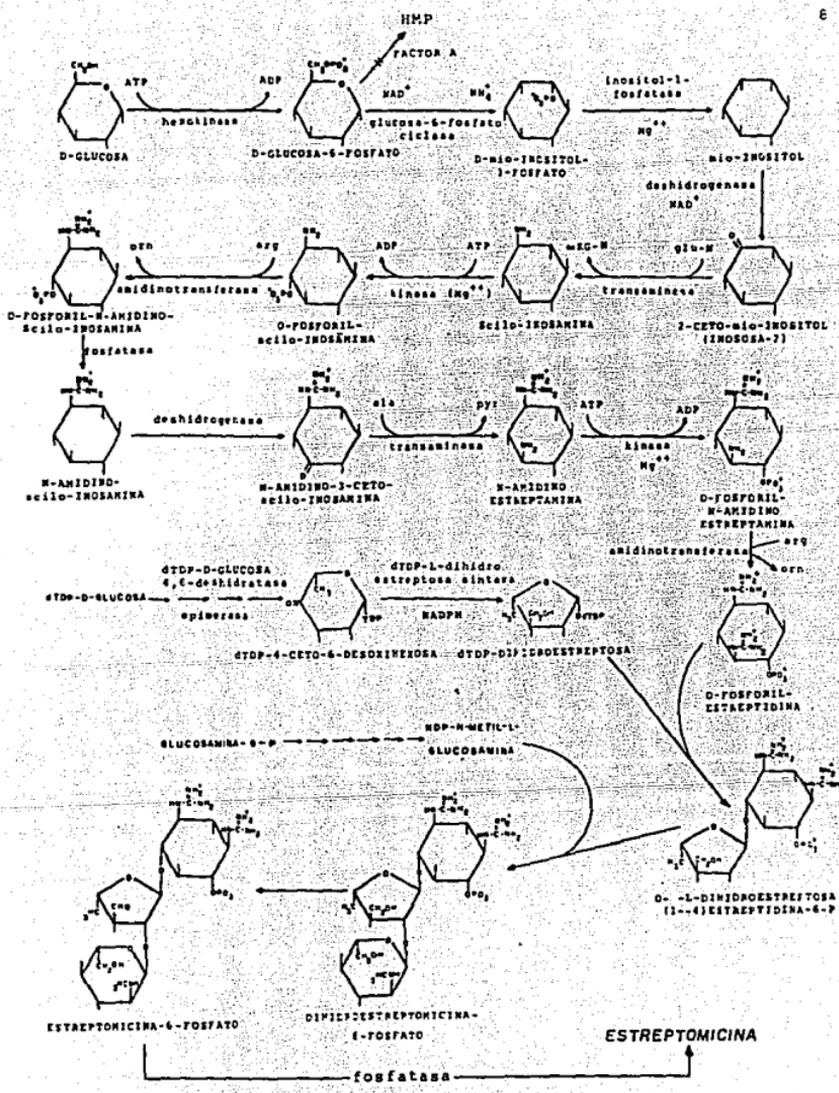


FIGURA No. 2. Vía biosintética de la estreptomina (81, 80, 31, 47, 48).

transamidinación utilizando L-arginina como donador, seguido es- to de una desfosforilación. Esta serie de reacciones ocurre dos veces y al parecer ambas son llevadas a cabo por diferentes en- zimas salvo en el caso de las dos transamidinaciones y posible- mente las dos fosforilaciones que podrian ser catalizadas por una sola enzima en cada caso (80).

La estreptosa de la molécula de estreptomycin proviene de la desoxitimidindifosfo-D-glucosa (dTDP-D-glucosa) la cual es convertida en dTDP-L-dihidroestreptosa por acción primero de la dTDP-D-glucosa-4,6-dehidratasa, luego una epimerasa y finalmente por la dTDP-L-dihidroestreptosa sintasa que se encuentran indi- cadas en la figura 2. El ensamble de los tres componentes de la estreptomycin inicia con la formación del disacárido al ser transferido el dihidroestreptosil de la dTDP-dihidroestreptosa a la estreptidina-6-P, catalizándose este paso por una transferasa (31). Estas enzimas, al igual que las que catalizan la síntesis de la estreptidina-6-P se sintetizan en idiofase, justo antes de la aparición de la estreptomycin en el medio. La N-metil-L-glu- cosamina que se encuentra unida a un nucleótido es transferida al disacárido formándose dihidroestreptomycin-6-P que poste- riormente forma la estreptomycin-6-P (47, 48), la cual no tiene actividad antibiótica. En las etapas tempranas del cultivo la estreptomycin-6-P es convertida en manosidoestreptomycin que es una forma menos activa (41), aunque hacia el final éste la enzima D-manosidasa vuelve a formar la estreptomycin-6-P (36), que finalmente se desfosforila por acción enzimática al pasar por la membrana.

FACTORES DE REGULACION.

Aun cuando un microorganismo posea la información genética para la síntesis de algún antibiótico, la producción de éste depende de numerosos factores como la disponibilidad de fuentes de carbono, nitrógeno y fosfatos (36, 71), así como de las condiciones de cultivo (pH, temperatura, oxigenación, agitación) (36).

Además de los nutrientes, son necesarios ciertos iones para la biosíntesis de estreptomycin, principalmente Na^+ , Zn^{++} , Co^{++} , K^+ , Ca^{++} . Generalmente todos ellos, salvo el Na^+ , se encuentran en concentraciones adecuadas en los medios complejos utilizados normalmente (29, 73, 13).

La glucosa siempre ha sido la fuente de carbono de elección para la producción de estreptomycin (36, 13), a pesar de que con d(+)-manosa y galactosa se obtienen buen crecimiento y producción al igual que con algunos disacáridos como maltosa y lactosa y polisacáridos como las dextrinas y el almidón (27). La concentración de glucosa empleada generalmente es de 10 g/l pues se han reportado bajas en la producción en concentraciones de 15 g/l o mayores (29). Este efecto es debido a la represión de la enzima D-manosidasa que convierte la manosidoestreptomycin, que es una forma menos activa, en estreptomycin (20). Sin embargo, en el medio de Carbajal (11) (medio 5) se emplean concentraciones de 50 g/l sin que se vea disminuida la producción en la cepa *S. griseus* ATCC 12475.

El amonio es una fuente de nitrógeno adecuada debido a que el microorganismo lo utiliza rápidamente (26). Además ejerce un efecto positivo en la formación de este antibiótico al acelerar la oxidación del ácido α -cetoglutarico hasta glutamina cuando se encuentra en concentraciones altas (hasta de 5 g/l) al inicio de la fermentación, permitiendo así una sobreproducción de glutamina, que es el donador de grupos amino para las reacciones de transaminación en la síntesis de la estreptidina y la glucosamina-6-P (43) (figura 3). Sin embargo hay que considerar que las sales de amonio tienen una desventaja al provocar cambios de pH perjudiciales para una buena producción, aunque esto se ha solucionado con la adición de CaCO_3 al medio de cultivo para mantener un pH alto favorable. Son también buenas fuentes de nitrógeno la prolina, la caseína y la harina de soya (26).

El fosfato inorgánico, al igual que en la síntesis de otros antibióticos, ejerce un efecto negativo en concentraciones mayores de 10 mM, a pesar de que el crecimiento es estimulado hasta 300 mM (71, 54, 13). Por ello, la formación de estreptomycin se incrementa bajo condiciones limitantes de P_i (42). Este fenómeno se debe a la inhibición de las fosfatasa, lo que promueve la acumulación de estreptomycin-6P hasta en un 87 % en 17 mM de fosfato (56, 64). La obtención de mutantes resistentes a este efecto negativo posiblemente permitiría incrementar la producción, aun en concentraciones no inhibitorias y tal vez se obtendrían aun mejores rendimientos incrementando la concentración de fosfato para un crecimiento mayor sin el efecto inhibitorio, tal y como ha sido reportado para otros antibióticos (54).

MECANISMO DE ACCION DE LA ESTREPTOMICINA.

La estreptomicina se encuentra dentro del grupo de antibióticos que inhiben la biosíntesis de proteínas bloqueando la traducción a nivel del ribosoma. Todos los compuestos que causan errores de lectura del RNAm actúan sobre la subunidad ribosómica menor. La estreptomicina se une irreversiblemente a la proteína S12 de la subunidad 30S ribosomal, la cual interviene durante la formación del complejo de iniciación. De esta manera los aminoacil tRNA no se pueden unir al sitio receptor que se encuentra distorsionado y se libera la formil-metionina-tRNA. La elongación también es retardada en los ribosomas que ya se encuentran en fase de síntesis (77,68).

RESISTENCIA A LA ESTREPTOMICINA EN *S. griseus*.

Los organismos productores de sustancias antibióticas necesariamente poseen cierta resistencia que los capacita para evitar el daño por su propio producto.

S. griseus es sensible a su propio antibiótico cuando éste se encuentra en concentraciones elevadas, pues interfiere con la síntesis de proteínas en todos los procariontes, y en este microorganismo se ha reportado que el mecanismo de acción es el mismo, sin embargo, la sensibilidad al antibiótico cambia en el transcurso de una fermentación y así, las células de la fase estacionaria, durante la cual se sintetiza este compuesto, son más resistentes que durante la fase de crecimiento debido a que hay una reducción de la permeabilidad a la estreptomicina (12). Aun-

que la resistencia del microorganismo productor es debida principalmente a la actividad de la enzima estreptomicina-6-fosfotransferasa que convierte la estreptomicina a estreptomicina-6P que es una forma inactiva y no tóxica, pues no tiene la capacidad de unirse al ribosoma (61). La actividad de la fosfotransferasa es tambien responsable de la resistencia de los productores de otros antibióticos tipo estreptomicina como la hidroxiestreptomicina y la dihidroestreptomicina. Es importante hacer notar que en todos los casos se observa una correlación entre la resistencia, la actividad de la fosfotransferasa y el rendimiento en la producción del antibiótico (64).

La interacción del microorganismo con su antibiótico establece pues uno de los límites en el rendimiento alcanzado en la fermentación (12). De hecho las cepas mutantes que son resistentes a su propio antibiótico, frecuentemente muestran un elevado rendimiento (1, 10). Sobre la relación producción-resistencia las investigaciones recientes sobre la biología molecular de la biosíntesis de estreptomicina han aportado una explicación interesante para este fenómeno, la cual se expone en la sección referente a los estudios de genética de la producción de estreptomicina.

Por lo que respecta a la resistencia que se presenta en las bacterias de aislados clínicos, la inactivación enzimática es el principal mecanismo responsable, ya sea por fosforilación o por adenilación de la estreptomicina (13).

GENETICA DE LA PRODUCCION DE ESTREPTOMICINA.

Los avances que se han logrado en los últimos años en las técnicas de clonación molecular, han permitido elucidar mecanismos de control de la biosíntesis de antibióticos, lo que ha permitido incrementar su rendimiento. Algunas de las posibilidades brindadas por estas técnicas son la amplificación génica y la producción de nuevos antibióticos por combinación de genes de diferente origen (50). En el caso de la estreptomicina los genes de la biosíntesis son susceptibles para estudios de este tipo dado que la vía está parcialmente elucidada.

Uno de los genes que se ha estudiado por medio de estas técnicas es el que controla la síntesis del llamado factor A (2-iso capriloil-3R-hidroxiacetil- γ -butirolactona) (39), el cual es un factor de regulación de la síntesis de este antibiótico (33, 46) posiblemente debido a su interacción con la actividad de la enzima glucosa-6P-deshidrogenasa, lo que impide la utilización de la glucosa en la vía de las pentosas (55), lográndose canalizar esta molécula hacia la producción de estreptomicina en vez de al metabolismo primario.

De estos estudios de clonación también ha resultado el descubrimiento de que varios (posiblemente todos) de los genes que codifican para las enzimas de la vía de biosíntesis de la estreptomicina tienen una localización adyacente en el genoma de *S. griseus*. Este ligamiento físico de los genes incluye además al gen que codifica para la enzima que confiere la resistencia del microorganismo a su propio antibiótico (fosfotransferasa), así

como a un gen regulatorio positivo, localizándose estos últimos en la región central del agrupamiento (63, 24, 22). Este gen regulatorio se ha demostrado que afecta positivamente al menos al gen de resistencia y al gen de la amidinotransferasa que se encuentran en la vecindad de éste, aunque posiblemente regule también la expresión de otros de los genes de la biosíntesis (63).

Además del gen que codifica para la fosfotransferasa y la amidinotransferasa, se ha demostrado la presencia en esta zona del genoma del gen que codifica para la transferasa que cataliza la unión de la estreptidina-6P y la dihidroestreptosa (63) y es probable que también de varios de los genes involucrados en la biosíntesis de la N-metil-L-glucosamina (50) y varios de los que intervienen en la formación de la estreptidina-6P (23, 24, 22).

La existencia de este arreglo adyacente de genes de biosíntesis, regulatorios y de resistencia parece tener relación con fenómenos de regulación coordinada (9), lo que explicaría la relación observada de mayor resistencia - mayor producción de algunas cepas mutantes productoras de antibióticos (fundamento de la metodología del presente trabajo) y permite adquirir información sobre la regulación de la biosíntesis del antibiótico por medio del estudio de la expresión de la resistencia (78).

El caso de la estreptomycinina no es único ya que se han encontrado arreglos similares en los genes de otros antibióticos como el blialafos en *S. hygrosopicus* (49, 58, 2), la metilnomicina (16), la eritromicina en *S. erythraeus* (74), la actinorrodina (52), la neomicina (9), la hidroxiestreptomycinina en

S. glaucescens (35, 78) y muy probablemente esto ocurra con muchos otros antibióticos, ya que estos arreglos de genes altamente acoplados pueden haber evolucionado en organismos y vías biosintéticas tan diferentes por la alta presión selectiva que implica el que estos metabolitos sean tóxicos para el productor.

MUTAGENESIS.

El mejoramiento genético de cepas tiene gran importancia en el desarrollo comercial de un proceso fermentativo. La ingeniería genética probablemente tendrá una repercusión importante en esta actividad, pero la mutagénesis y selección permanece comparativamente como un procedimiento efectivo y de bajo costo.

Los miembros del género *Streptomyces* al producir numerosas esporas uninucleadas y haploides facilitan el trabajo de mutagénesis. En este género, las condiciones para el tratamiento con N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina (NTG) han sido debidamente reportadas (18).

La NTG es un agente mutagénico que actúa como alquilante del DNA. Induce frecuencias de mutación altas con mortalidad moderada (72). Las condiciones óptimas de tratamiento con este compuesto en el género *Streptomyces* son muy diferentes a las determinadas para otros procariontes, ya que se requiere de tratamientos mas largos e intensos. Así pues, la concentración adecuada para un buen rendimiento de mutantes en estas especies es de 3 mg/ml y los tiempos de tratamiento se encuentran entre 1 y

2 horas, a 30°C y a un pH alto (alrededor de 9)(18). Estas condiciones favorecen la descomposición de la NTG en diazometano, que probablemente es el agente efector de la mutación, al menos en estos valores de pH. Esta afirmación aun es muy discutida, ya que el mecanismo de acción de la NTG no es aun claro (18).

OBJETIVO

MEDIANTE UN PROCESO DE MUTAGENESIS Y SELECCION
OBTENER Y CARACTERIZAR UNA CEPA MUTANTE DE
STREPTOMYCES GRISEUS QUE SEA RESISTENTE A
ESTREPTOMICINA EN ALTAS CONCENTRACIONES Y QUE
PRESENTE UNA MAYOR PRODUCCION DE ESTE ANTIBIOTICO

MATERIAL Y METODOS

MICROORGANISMOS EMPLEADOS.

La cepa productora de estreptomina empleada fue *Streptomyces griseus* ATCC 12475 (American Type Culture Collection) BM-B-231 del cepario del Departamento de Biotecnología del IIBM UNAM. Esta cepa fue obtenida originalmente de un aislado de lodo del río Ohio en Lawrenceburg, Indiana en 1945 y mejorada posteriormente por mutación con luz UV; seleccionando su capacidad de crecer en presencia de estreptomina en bajas concentraciones. Posteriormente, y también por mutación con luz UV se seleccionó la resistencia a fagos de esta cepa (11), característica importante si consideramos los problemas que estos pueden ocasionar en la fermentación (10).

El microorganismo sensible a estreptomina empleado en los bioensayos para la cuantificación del antibiótico fue *Bacillus subtilis* NRRL 3366 (Northern Regional Research Laboratories).

PRESERVACION DE LOS MICROORGANISMOS.

S. griseus ATCC 12475 se obtuvo a partir de un liofilizado, la activación del microorganismo se llevó a cabo en el siguiente medio:

Medio 1.	Extracto de levadura	0.4 %
	Extracto de malta	1.0 %
	Dextrosa	0.4 %
	Agar	1.5 % Ajustado a pH 7

MEDIOS Y CONDICIONES DE CULTIVO PARA
LA PRODUCCION DE ESTREPTOMICINA.

Se comparó la producción de estreptomicina por *S. griseus* ATCC 12475 en varios medios de cultivo.

Los medios probados fueron los siguientes:

Medio 5.- medio de Carbajal (ii) (g/l)

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	10	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.2
Dextrosa	10-50	$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.03
Dextrinas sol.	10	$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.03
K_2HPO_4	1	MnSO_4	0.01
NaNO_3	2	CaCO_3	10
NaCl	3		

Ajustado a pH 7.5 antes de
añadir CaCO_3 y esterilizar.

Medio 6.- medio mínimo para estreptomicetos (g/l)

NH_4Cl	5	$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0.001
K_2HPO_4	1	CaCO_3	3
NaCl	5	Dextrosa	10
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.02	Dextrinas sol.	10
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.05		

Ajustado a pH 7.5

La obtención de las esporas para la conservación de esta cepa se llevó a cabo en placas con medio de esporulación a 29 C:

Medio 2.-

Glucosa	1 %	Lev. de cerveza	2.5 %
NaNO ₃	0.5 %	K ₂ HPO ₄	0.1 %
HgSO ₄ ·7H ₂ O	0.1 %	FeSO ₄ ·7H ₂ O	0.001%
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0.0002%	CaCl ₂	0.01 %
NaCl	1 %	Agar	1.5 %

Ajustado a pH 7

Las esporas se conservaron a -20° C en tubos con tapón de rosca de 16x150 mm con el siguiente medio de conservación:

Medio 3.-

Extracto de levadura	0.4 %
Extracto de malta	1 %
Glicerol	40 %

La densidad óptica a 540 nm de la dilución 1:10 de esta suspensión de esporas fue de 1.2, leída en un espectrofotómetro Spectronic 21, Bausch & Lomb.

El microorganismo de prueba *Bacillus subtilis* NRRL 3366 se conservó en placas del siguiente medio:

Medio 4.-

Extracto de levadura	1 %
Peptona	2 %
Glucosa	1 %
Agar	1.5 %

Medio 7.-

Glucosa	2.5 %
Extracto de carne	4 %
NaCl	0.25 %

Ajustado a pH 7.2

Medio 8.-

Glucosa	1 %
Harina de soya	1 %
NaCl	0.5 %

Ajustado a pH 7

Medio 9.-

Extracto de malta	.1 %
Extracto de levadura	0.4 %
Glucosa	0.4 %

Medio 10.-

Extracto de malta	0.4 %
Extracto de levadura	0.4 %
Glucosa	1 %

Todos los cultivos se llevaron a cabo en matraces de 125 ml conteniendo 25 ml de medio. Se inocularon 2 matraces de cada medio con 0.1 ml de la suspensión de esporas en cada uno. En el caso de los medios 5 y 6, 2 matraces adicionales fueron inoculados con 2 ml del medio 10 en el cual se precreció al microorganismo durante 6 horas. Todos los cultivos se mantuvieron a 29°C y con agitación a 180 rpm en una agitadora de ambiente controlado Psy-

crotherm, New Brunswick Scientific.

Los cultivos fueron muestreados a intervalos de 24 horas tomando alícuotas de 2 ml bajo condiciones asepticas.

ANALISIS DE LAS MUESTRAS.

CUANTIFICACION DEL CRECIMIENTO.

La cuantificación del crecimiento del microorganismo se realizó determinando la cantidad de proteína presente en las muestras para conocer su concentración en el cultivo. Dichas determinaciones se llevaron a cabo por el método de Lowry *et.al.*(51), que se basa en la formación de un complejo colorido entre el grupo fenólico o aromático de la tirosina, triptofano, fenilalanina o histidina, y el ácido fosfowolframomolibdico que oxida al aminoácido en condiciones alcalinas, dando un color azul como producto de la reacción, que se puede cuantificar a 595 nm, lo que permite estimar la concentración de proteína comparando con un estándar de albúmina sérica bovina. Las determinaciones se llevaron a cabo de la siguiente manera: Se prepararon las siguientes soluciones:

Solución A

Na_2CO_3 al 2% en NaOH 0.1 M

Tartrato de sodio y potasio 1%

Solución de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0.5%

En proporción de 9.8:0.1:0.1 en el orden presentado

Solución B

Reactivo de Folin-Ciocalteu diluido en agua 1:3

Las muestras de 2 ml del cultivo se centrifugaron a 5000 rpm durante 10 minutos recuperándose el botón, el cual se resuspendió en 1 ml de ácido tricloroacético al 10%, se centrifugó nuevamente y se le adicionó 1 ml de NaOH 0.4 M. Se agitó para disolver la proteína y se tomaron alícuotas de 100 µl, aforándolas a 1 ml. Las alícuotas de la solución de albumina sérica para la curva patrón igualmente se aforaron a 1 ml. A las muestras y a la curva patrón se les adicionaron 5 ml de la solución A, se agitaron y se dejaron reposar durante 10 minutos, al término de los cuales se adicionaron 500µl de la solución B, se agitó y tras una incubación de 30 min. a temperatura ambiente se leyó a 595 nm en un espectrofotómetro Spectronic 21 Bausch & Lomb.

CUANTIFICACION DEL ANTIBIOTICO EN LAS HUESTRAS.

La producción de estreptomycin se cuantificó por ensayo microbiológico convencional por el método de difusión en agar (25) de la siguiente manera: 25 µl de las muestras del caldo de cultivo se aplicaron en discos de papel Whatman de 7 mm de diámetro, los cuales fueron colocados posteriormente sobre placas conteniendo 10 ml del siguiente medio para bioensayo:

Medio 11.-

Extracto de levadura	0.5 %
Triptona	1 %
NaCl	0.5 %
Agar	1 %

Ajustado a pH 8

El microorganismo sensible fue precrecido en el medio 4 (líquido) a 37 °C y añadido al medio 11 al momento de preparar las placas. Los diámetros de la zona de inhibición de crecimiento de

la cepa indicadora, los cuales tienen una relación logarítmica con la concentración de antibiótico presente, se midieron después de 24 a 48 horas de incubación de las placas a 29°C. Las concentraciones de estreptomycin se estimaron utilizando una curva estándar de sulfato de estreptomycin Sigma a diferentes concentraciones en los discos de papel en las mismas condiciones.

MEDICION DEL pH.

El pH de las muestras se cuantificó en un potenciómetro Beckman digital modelo 3500 utilizando el sobrenadante de cada una de las muestras obtenidas en cada condición experimental.

DETERMINACION DE LA SENSIBILIDAD DE *S. GRISEUS* A LA ESTREPTOMICINA.

La concentración mínima de estreptomycin que inhibe el crecimiento de la cepa productora se determinó en placa. Se sembró 0.1 ml de una suspensión de esporas (aproximadamente 3000 esporas) en cajas de Petri con medio YMG (núm. 1) ajustado a pH 8, el cual contenía sulfato de estreptomycin en concentraciones crecientes (de 0 a 100 µg/ml). Es importante hacer notar que el medio fue ajustado a pH 8, ya que el antibiótico es menos estable en rangos de pH ácidos (26). Además, la tolerancia de *S. griseus* al antibiótico se ve disminuida en medios alcalinos a un pH de alrededor de 8 (12). Previamente a su adición al medio, el antibiótico fue disuelto en amortiguador de fosfatos 0.1 M pH 8 y esterilizado pasándolo por un filtro Millipore tipo HA de 0.45 µm. Las cajas fueron incubadas a 29°C por 4 días, al térmi-

no de los cuales se realizó el conteo de las colonias que lograron crecer en presencia del antibiótico.

MUTAGENESIS.

Para una operación eficiente de búsqueda de mutantes, la dosis óptima del mutágeno es aquella que da una proporción alta del mutante deseado en la población sobreviviente. Por esta razón se elaboró una gráfica de frecuencia de mutantes en la población sobreviviente contra dosis del mutágeno (37).

El agente mutagenico empleado fue NTG a una concentración de 3 mg/ml en un amortiguador Tris-maleatos 0.05 M a pH 9 ajustado con NaOH 10 M (18). Se disolvieron 30 mg de este agente en 6 ml de amortiguador a 4°C, esta solución fue esterilizada por filtración en una membrana Millipore tipo HA de 0.45 μ m y colocada en un matraz de 50 ml estéril. De la suspensión de esporas, descrita en la sección referente a preservación de los microorganismos, se tomaron 4 ml y se colocaron en el mismo matraz. La mezcla fue incubada en un baño de agitación a 30°C y 160 rpm, tomándose muestras de ésta a los siguientes tiempos: 10, 20, 30, 40, 75, 90, 120, 150, 180 y 210 minutos. Al cumplirse cada intervalo de tiempo se tomó 1 ml de muestra, se colocó en un tubo que contenía 9 ml del amortiguador estéril y se centrifugó a 7000 rpm durante 7 minutos, se decantó y el botón fue resuspendido en 10 ml del mismo amortiguador, repitiéndose el lavado y la centrifugación hasta completar 3 veces con el objeto de eliminar la NTG. Tras la última centrifugación, las esporas se colocaron en 10 ml de amortiguador conteniendo 40 % de glicerol para su conservación a -20°C. El control consistió de 0.4 ml de la suspen-

sión de esporas en 9.6 ml de amortiguador con glicerol. Para la elaboración de la curvas de sobrevivencia y frecuencia de mutantes resistentes se plateó 0.1 ml de diferentes diluciones en placas de medio YMG (medio 1) ajustado a pH 8 sin y con estreptomycinina en una concentración de 60 $\mu\text{g/ml}$.

SELECCION DE MUTANTES RESISTENTES.

En base a los resultados de sensibilidad de las esporas de la cepa original a su propio antibiótico y los tiempos de mutagénesis adecuados para una frecuencia alta de mutantes resistentes, se decidió utilizar esporas mutagenizadas de tiempos de tratamiento de 90 minutos y platearlas en placa con medio YMG (número 1) conteniendo inicialmente 60 $\mu\text{g/ml}$ de sulfato de estreptomycinina, aumentándose posteriormente a 75 $\mu\text{g/ml}$ al no obtenerse resultados de producción satisfactorios. Al término de una semana de incubación a 29°C las colonias que lograron crecer se tomaron de las cajas de Petri y fueron transferidas a cajas con el mismo medio y concentración de antibiótico para purificar así las cepas mutantes. A estas colonias posteriormente se les determinó su capacidad de producción de estreptomycinina.

DETECCION DE MUTANTES RESISTENTES CON MAYOR PRODUCCION.

Para identificar las cepas con incremento en la producción de estreptomycinina, las mutantes que resultaron resistentes a 60 y 75 $\mu\text{g/ml}$ del antibiótico fueron probadas en placa. Este método permite probar un gran número de aislados en poco tiempo. El procedimiento seguido fue el siguiente:

Las cepas resistentes ya purificadas se dejaron crecer en medio con antibiótico y una vez esporuladas se transfirieron a una placa conteniendo 20 ml de medio para bioensayo (número 11), realizándose este paso con palillos de madera estériles de 2 mm de diámetro, procurando aplicar las esporas en el nuevo medio de manera que crecieran colonias de forma regular. Después de 5 días de crecimiento de las colonias transferidas (periodo en el que alcanzan un buen desarrollo y hay producción del antibiótico), se preparó una suspensión del microorganismo sensible a estreptomycin en solución salina (NaCl 0.85 %) y se hizo una aspersión de ésta sobre las placas. Las cajas se incubaron 36 horas a 29°C y se midieron los diámetros tanto del halo de inhibición del crecimiento del microorganismo de prueba como el de las colonias productoras para poder obtener la relación diámetro del halo/diámetro de la colonia (índice potencia), la cual permitió una mayor objetividad en la selección al eliminar los efectos producidos por el tamaño de la colonia sobre la producción (72). Así, el índice obtenido se comparó con el de la cepa original.

SELECCION DE LAS MEJORES PRODUCTORAS EN LIQUIDO.

El cultivo en medio líquido reproduce mas cercanamente las condiciones de producción a nivel industrial y permite una selección de resolución mas alta que el cultivo en placa (72), sin embargo, el primero requiere mas atención y tiempo por lo que se pueden probar menos aislados, por esta razón solo se probaron por este método aquellas colonias con mayores posibilidades de presentar una producción mejorada. Este tipo de cultivo permite

además conocer de manera mas precisa cual es el nivel de producción que puede alcanzar una cepa bajo determinadas condiciones. Los cultivos se realizaron en el medio de Carbajal (medio 5) con 10 g/l de glucosa, a 29°C de la manera descrita anteriormente. Todas las fermentaciones se corrieron utilizando simultáneamente la cepa original como control.

CARACTERIZACION DE LA CEPA MUTANTE OBTENIDA.

PRODUCCION.

El incremento alcanzado en los niveles de producción por la cepa mutante seleccionada se determinó al realizar las pruebas de selección en líquido y por comparación con la cepa original, primero en el medio de Carbajal conteniendo 10 g/l de dextrosa y, debido a que en la patente del medio (II) se hace referencia al incremento en la producción que se puede lograr con un aumento de la concentración de dextrosa, se probaron también las dos cepas incrementando la dextrosa a 50 g/l. Las fermentaciones se realizaron de la manera descrita anteriormente, aunque debido a la escasa esporulación de la cepa seleccionada se realizaron modificaciones en cuanto al tipo de inóculo para evitar el manejo de esporas.

INCREMENTO EN RESISTENCIA A LA ESTREPTOMICINA.

La nueva resistencia de la cepa mejorada se determinó en placa con medio YMG (número 1) ajustado a pH 8, de la misma manera descrita para la determinación de la sensibilidad de la cepa

original a la estreptomycinina. Se utilizaron concentraciones de sulfato de estreptomycinina 3 veces mas altas que las empleadas con la cepa original, plateándose también 0.1 ml de una suspensión de esporas del mutante aislado, resultando en 1300 esporas aproximadamente por placa. El conteo de las colonias resistentes para la determinación de la proporción de resistentes se realizó a los 4 días de incubación.

ESTABILIDAD DE LA CEPA.

Es muy frecuente que las cepas mejoradas presenten una degeneración o reversión de las características adquiridas cuando estas son transferidas serialmente sin una presión de selección que impida este fenómeno (66, 59, 62, 79). Es por esto que existe la necesidad de conocer la estabilidad de la nueva cepa y las condiciones necesarias para su conservación.

A partir de las cajas en las que se mantenía la cepa pura se hicieron transferencias a cajas que contenían medio para esporulación (número 2) sin antibiótico. Una vez que el microorganismo creció en estas placas, aproximadamente a los 6 días, se les transfirió a placas nuevas. Este procedimiento se repitió un total de 7 veces, al término de las cuales, de cada una de las placas de cada transferencia, se tomó al microorganismo y se colocó con palillos de madera estériles en placas de 20 ml del medio para bioensayo (número 11), donde se permitió el desarrollo de las colonias durante 5 días para ser rociadas después con el microorganismo sensible y apreciar así la producción de antibiótico del cultivo en placa como se describió anteriormente. De

esta manera se siguió la producción de la cepa tras cada transferencia.

Una presión efectiva contra la reversión es el crecer al microorganismo en presencia de estreptomycin en una concentración adecuada (79), por lo que se realizaron transferencias en medio suplementado con estreptomycin e igualmente se observó el efecto de éstas sobre la producción en placa.

PREPARACION DE INOCULOS CON LA CEPA MUTANTE.

Debido a la mala esporulación de la cepa mutante se decidió probar inóculos preparados con el microorganismo precrecido en el medio 10, tanto de la cepa mutante como de la cepa de colección. Además, debido a la reversión que se podía presentar al precrecer al microorganismo antes de colocarlo en condiciones de producción, se prepararon también inóculos de la cepa mutante precrecida con 50 $\mu\text{g/ml}$ de sulfato de estreptomycin, concentración en la que no hay crecimiento de la cepa original en este medio líquido.

Los inóculos se prepararon a partir de cultivos llevados a cabo en matraces de 125 ml con 25 ml de medio YMG (número 1). Estos cultivos se desarrollaron a partir de esporas hasta lograr un buen crecimiento de los microorganismos. Una vez alcanzado éste, se centrifugó para separar las células, las cuales se colocaron en tubos estériles con medio 3 para su conservación a -20°C . La densidad óptica en espectrofotómetro a 540 nm de estos inóculos fue de alrededor de 1.4. De esta forma se obtuvieron

los inóculos precrecidos de la cepa original y de la cepa mutante crecida en medio sin y con 50 $\mu\text{g/ml}$ de estreptomycin. Además, para fines de comparación, en este experimento también se realizaron fermentaciones de ambas cepas inoculadas con esporas.

PURIFICACION E IDENTIFICACION DEL ANTIBIOTICO PRODUCIDO.

Dado que *Streptomyces griseus* es un organismo que produce no solo estreptomycin sino algunos otros antibióticos como la cefamicina (65) y la candidicina (54), se planteó la necesidad de demostrar que la actividad antibiótica que se encontraba en el caldo de cultivo del mutante correspondiera efectivamente a la estreptomycin, lo cual, a pesar de ser lo más probable puesto que es el antibiótico producido por la cepa de la cual se partió, necesitaba ser corroborado.

El antibiótico del caldo de fermentación se purificó en una columna de intercambio iónico. El intercambiador empleado fue amberlita IRC-50 Sigma, Ho.A-5893, que es una resina de ácido carboxílico, por lo que el grupo guanidino de la estreptomycin, que es fuertemente básico, lleva a cabo las reacciones de intercambio (75, 6, 4, 5, 60). Esta resina se lavó previamente con una solución al 10 % de H_2SO_4 y se activó a la forma Na con NaOH al 5 %. Una vez activada se empacó la columna y se lavó con agua destilada. Las dimensiones y características de la columna fueron las siguientes:

Diámetro	1.5 cm
Altura	15 cm
Flujo	1.6 ml/min

Se purificó tanto el antibiótico producido por la cepa mutante como el de la cepa ATCC 12475, los cultivos empleados para este fin se llevaron a cabo en medio 5 y el tiempo de fermentación fue de 120 horas. Como control se empleó sulfato de estreptomicina, disuelto en medio de cultivo previamente esterilizado, el cual, se utilizó como estándar para la identificación. El volumen empleado fue de 25 ml en los tres casos, y en cada uno de ellos se llevó a cabo el siguiente procedimiento: se acidificó el caldo a pH 3 con H_2SO_4 al 10 %, lo cual precipita proteínas y permitió su remoción por centrifugación a 5000 rpm durante 10 minutos. El pH del sobrenadante se reajustó a 7, pasándolo posteriormente por la columna. Una vez terminado este proceso la columna se lavó pasando agua destilada. El antibiótico, que quedó adsorbido en la columna, se eluyó con una solución de H_2SO_4 al 10 %. Las fracciones colectadas se ajustaron con Na_2CO_3 a un pH de 8 y se cuantificó el antibiótico presente por bioensayo.

La identificación del antibiótico se realizó por cromatografía en papel Whatman 3MM utilizando la siguiente mezcla de solventes (8): n-butanol- ácido acético -agua (2:1:1). Para el revelado se roció el cromatograma por aspersión con una solución de ninhidrina 0.25 % en piridina-acetona (1:1) y se calentó durante aproximadamente 10 minutos a $105^\circ C$ (8). Esta cromatografía se corrió con un estándar de sulfato de estreptomicina, el antibiótico purificado de *S. griseus* ATCC 12475, el antibiótico purificado de la cepa mutante, el antibiótico recuperado del medio de cultivo estéril y mezclas del antibiótico de las 2 cepas con el estándar. En todos los casos las muestras colocadas en el papel contenían aproximadamente 12 μg del antibiótico.

RESULTADOS Y DISCUSION

SELECCION DE UN MEDIO DE CULTIVO ADECUADO PARA LA PRODUCCION DE ESTREPTOMICINA.

De los 6 medios de cultivo que se compararon, el 5 y el 6 se probaron con dos tipos de inóculo (0.1 ml de la suspensión de esporas y 2 ml del microorganismo precrecido), el resto se inoculó únicamente con esporas. Como se puede observar en las figuras 3 y 4 en todos los medios probados el microorganismo logró un buen crecimiento, aunque en el medio 9 (gráfica E) no es tan alto como en los otros medios. En el medio 7 (gráfica G) se observó la mayor cantidad de biomasa pero prácticamente no hay producción de estreptomicina. Tampoco en el medio 6 (gráfica C) se observó síntesis del antibiótico. En todos los medios en los que hubo producción del antibiótico es notoria la caída en la cantidad de proteína en el momento en que la concentración de éste se incrementa. Este fenómeno muy probablemente es debido a la lisis celular, pues el microorganismo es sensible al antibiótico producido y a pesar de que se ha reportado que a lo largo de la fermentación la resistencia se va incrementando (12), para el momento en que aparece la estreptomicina esa resistencia no se está expresando por completo, como sucede en etapas posteriores en las que inclusive se observan ligeros incrementos en el crecimiento. Esta disminución en la biomasa no se debió a cambios de pH, pues éste no sufrió cambios considerables.

De acuerdo a las producciones alcanzadas en estos medios se seleccionó el de Carbajal con 10 g/l de glucosa (medio 5), pues

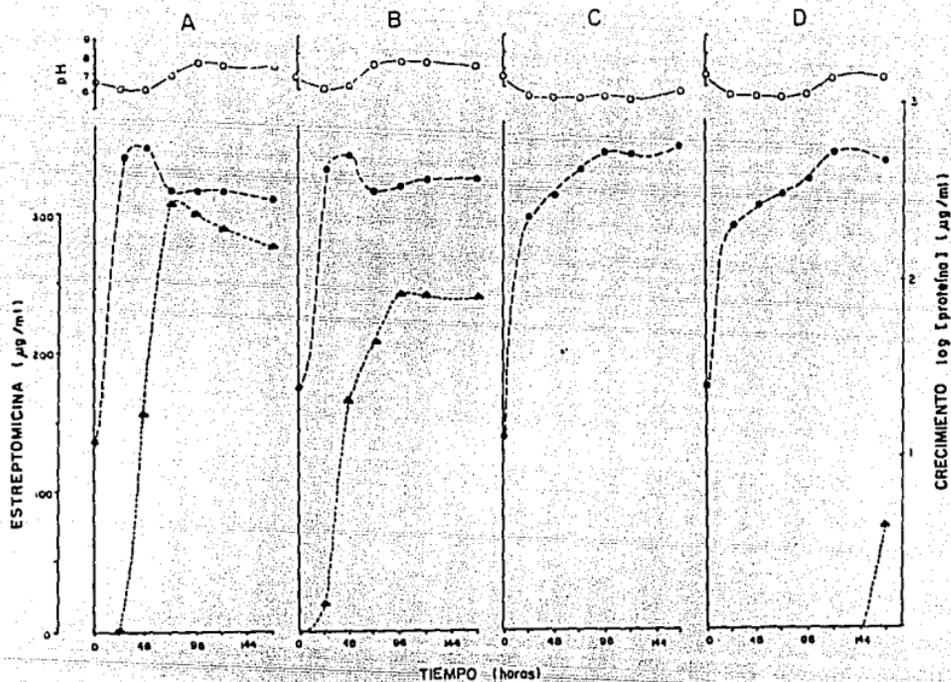


FIGURA No. 3. Gráficas de crecimiento del microorganismo (●) y producción de estreptomina (▲) en diferentes medios de cultivo. Gráfica A: medio 5 inoculado con esporas; gráfica B: medio 5 con inóculo precrecido; gráfica C: medio 6 con inóculo de esporas; gráfica D: medio 6 con inóculo precrecido.

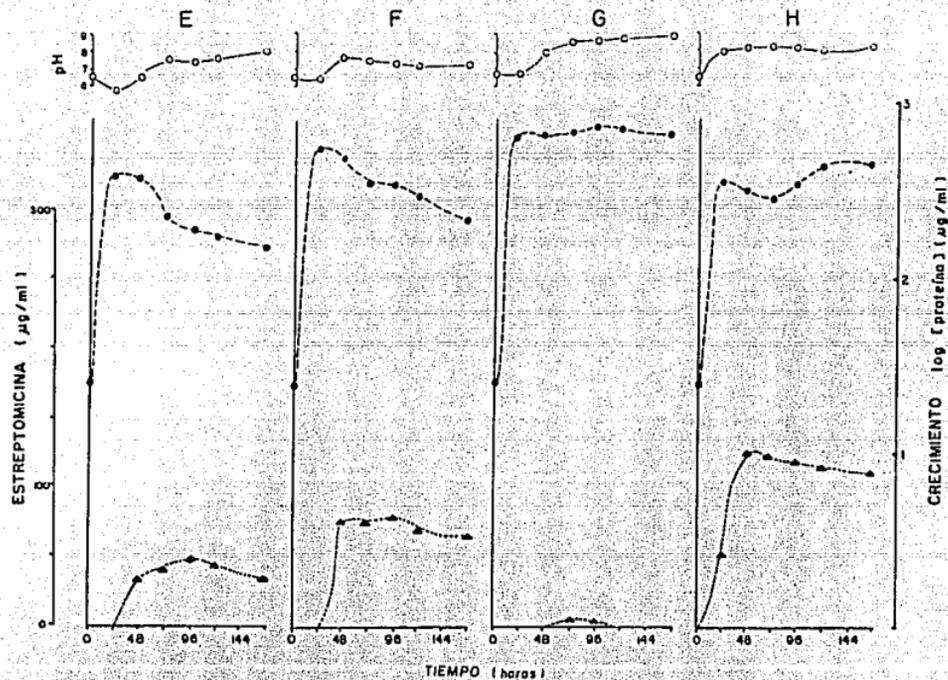


FIGURA No. 4. Gráficas de crecimiento del microorganismo (●) y producción de estreptomcina (▲) en diferentes medios de cultivo. Gráfica E: medio 9; gráfica F: medio 10; gráfica G: medio 7; gráfica H: medio 8. Todos estos cultivos fueron inoculados con esporas.

tanto con inóculo de esporas como con inóculo precrecido se alcanzaron producciones muy superiores a las de los medios restantes. En el caso del inóculo de esporas (gráfica A), la producción alcanzó en los duplicados y en la repetición de este experimento los 300 $\mu\text{g/ml}$ de estreptomycin entre las 72 y 96 horas de cultivo, por esta razón se decidió emplear la formulación de este medio para las pruebas de producción en medio líquido de las mutantes que se obtuvieron y para su comparación con la cepa de la cual se originaron. En todos los casos se emplearon esporas como inóculo, aunque una vez que se obtuvo la cepa mejorada fue necesario hacer modificaciones ya que resultó poseer una capacidad de esporulación muy disminuida.

SENSIBILIDAD DEL MICROORGANISMO PRODUCTOR AL ANTIBIOTICO.

Con la finalidad de conocer la concentración adecuada de estreptomycin para la selección de mutantes con un incremento apreciable en su resistencia, se determinó la sensibilidad de *S. griseus* a su propio antibiótico cuantificando el porcentaje de germinación de esporas en placas conteniendo concentraciones crecientes de sulfato de estreptomycin.

La determinación de una concentración que inhibiera completamente la germinación de las esporas se vió dificultada por el hecho de que algunas de las esporas presentan mayor resistencia por lo que la tolerancia máxima está relacionada directamente con la cantidad de esporas presentes. Si el número de éstas es muy grande la concentración que impide la germinación de todas ellas se incrementa notablemente, aun cuando en términos de por-

centaje los valores no son muy variables. Por esta razón es conveniente manejar porcentajes de germinación a distintas concentraciones, o bien tomar en cuenta, para cualquier conclusión, el número de esporas inoculadas.

Otro hecho digno de tomarse en consideración es que la resistencia presentó variaciones dependiendo de si se utilizaban esporas o micelio y además el estado fisiológico de la célula. Una explicación se encuentra en lo reportado sobre las variaciones tanto en la permeabilidad al antibiótico como en la actividad de la fosfotransferasa dependiendo de si el micelio proviene de la fase de crecimiento o de la fase estacionaria del cultivo (12). Esto sugiere una explicación a algunas dificultades que se presentaron en la reproducibilidad de los resultados en experimentos preliminares.

En la figura 5 se grafican los porcentajes de germinación obtenidos en las concentraciones probadas. Se puede observar que a partir de una concentración de 30 $\mu\text{g/ml}$ los porcentajes de germinación son inferiores al 1 %, y para la cantidad de esporas utilizada, el desarrollo de colonias a los 4 días de incubación es nulo en 60 $\mu\text{g/ml}$ de estreptomycin.

De los resultados obtenidos se concluyó que concentraciones de estreptomycin 60 $\mu\text{g/ml}$ o mayores, en placa, son las adecuadas para buscar variaciones en los niveles de resistencia al antibiótico en las cepas mutantes. Es importante hacer notar que esto es cierto para los casos en los que se utilizan esporas y en el mismo medio, pues la resistencia de células de micelio

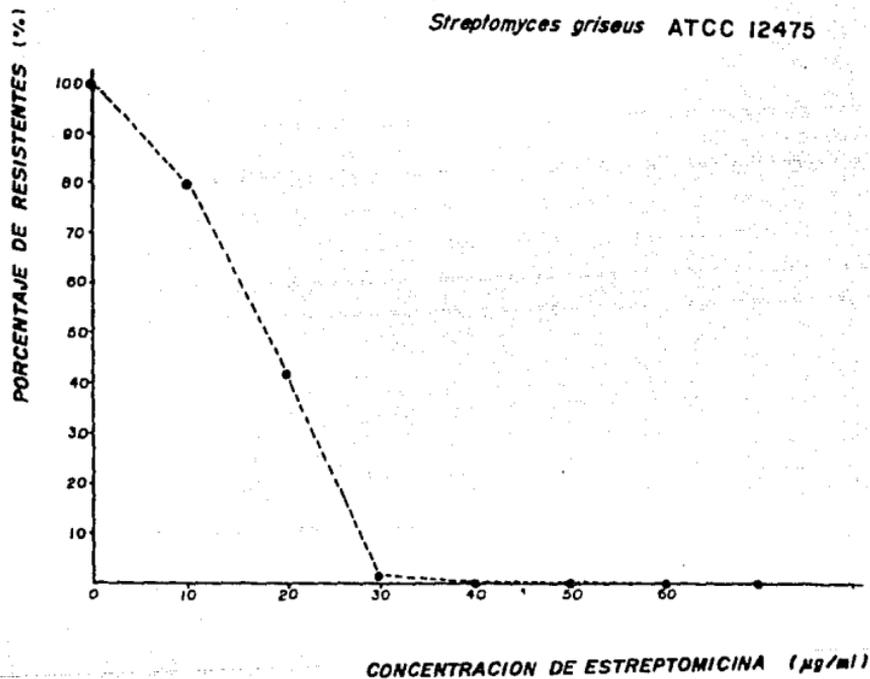


FIGURA No. 5. Resistencia de las esporas de *Streptomyces griseus* ATCC 12475 a concentraciones crecientes de estreptomicina en medio 1 ajustado a pH 8.

que se transfieren a placas con antibiótico fué muy superior, y probablemente otros medios de cultivo proporcionen resultados diferentes, ya que incluso el mismo medio sin agar resultó en una concentración inhibitoria muy diferente.

MUTAGENESIS.

Los tiempos de tratamiento con NTG permitieron obtener altas proporciones de mutantes resistentes dentro de la población sobreviviente. Como se puede observar en la figura 6, los tiempos de tratamiento de 90 a 180 minutos incrementaron el porcentaje de resistencia a mas de 2 % de resistentes a 60 µg/ml de estreptomomicina. De acuerdo con estos resultados se decidió utilizar esporas tratadas con NTG durante 90 minutos para la búsqueda de resistentes para las pruebas de producción, ya que tiempos más largos probablemente resultarían también en mutaciones de otro tipo. A pesar de obtener buenos rendimientos de mutantes y de estar basados en lo existente en la bibliografía para microorganismos de este género (18), los tiempos manejados fueron muy severos de acuerdo a los resultados de sobrevivencia mostrados en la gráfica. La mortalidad que se alcanzó después de los 40 minutos de exposición fue superior al 99.9 %, esto incrementa las probabilidades de que las mutantes obtenidas presenten además mutaciones indeseables en genes no relacionados con la producción del antibiótico. Sin embargo, las proporciones obtenidas de mutantes resistentes en tiempos de exposición mas cortos resultaron muy bajas, lo que dificultaría encontrar mutantes con diferencias importantes en resistencia y producción del antibiótico. Es probable que para mejorar estas características en el

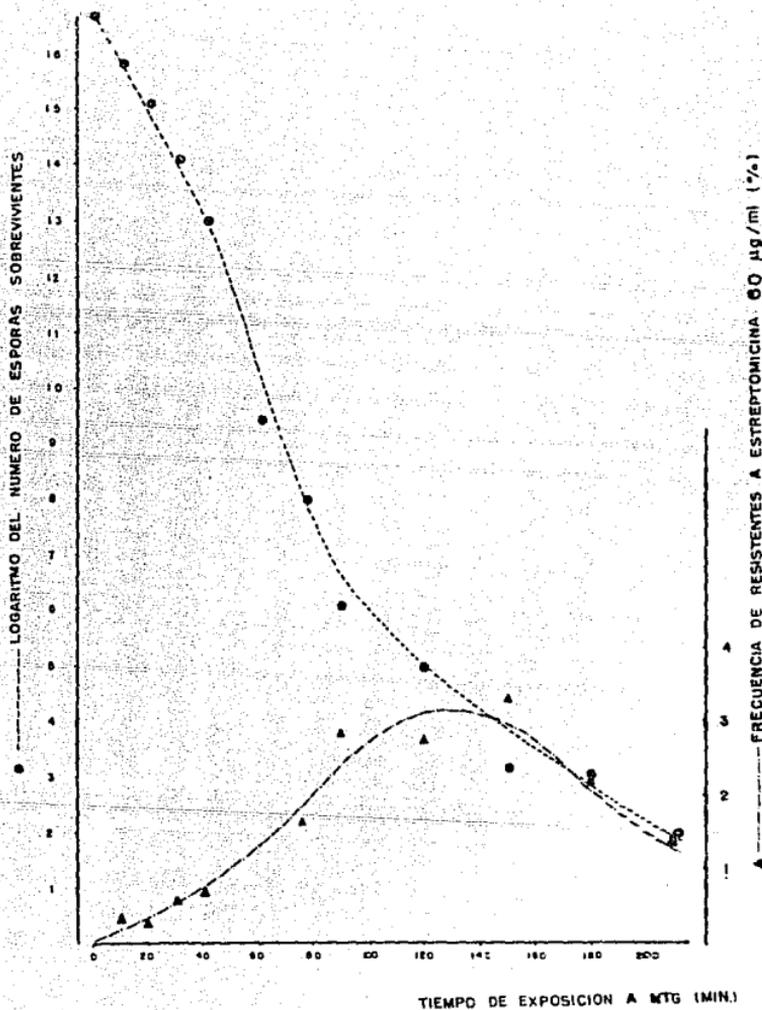


FIGURA No. 6. Mutagénesis. (●) Curva de sobrevivencia de las esporas en función del tiempo de tratamiento con NTG a una concentración de 3 mg/ml en amortiguador tris maleatos 0.05 M a pH 9 y 30°C. (▲) Frecuencia de mutantes resistentes a 60 µg/ml inducida por el mutágeno.

microorganismo sea necesario que se presente mas de una mutación en los genes involucrados, por lo que el tratamiento deba ser mas intenso para lograrlo, aun cuando se afecten otras regiones del genoma. Además, el perfil de la curva de porcentaje de resistentes es el típico obtenido para mutaciones que provocan incrementos en el rendimiento de un producto en la que se observa un pico óptimo y una posterior caída en el porcentaje a altas dosis del agente mutagénico (16). Esto parece sugerir que efectivamente esos tiempos sean los mas favorables para la obtención de este fenotipo, aun cuando pueda parecer muy largo el tratamiento con NTG.

SELECCION DE MUTANTES RESISTENTES.

Como se mencionó en la metodología, se utilizó una concentración de 75 $\mu\text{g/ml}$ de estreptomina en placas de medio 1, en la cual prácticamente no hay germinación de esporas de la cepa de colección, por lo que aquellas colonias que lograron crecer presentaron un notable incremento en su resistencia y consecuentemente una mayor probabilidad de mejor producción. Así, para las esporas tratadas durante 90 minutos con NTG la frecuencia de mutantes resistentes obtenido fué de alrededor del 0.7 %, es decir, de las 5×10^{16} esporas/0.1 ml que aproximadamente existían al tiempo 0, a los 90 minutos de tratamiento sobrevivieron 1×10^6 y de ellas alrededor de 7000 podrían ser resistentes a esta concentración de antibiótico.

Inicialmente se emplearon 60 $\mu\text{g/ml}$ de estreptomina para la selección, obteniéndose varios cientos de mutantes resistentes.

La producción de 50 de estas cepas mutantes fue probada en placa no observándose diferencias con la cepa original. Por esta razón y para disminuir el número de cepas a probar se decidió aumentar la concentración del antibiótico a 75 $\mu\text{g}/\text{ml}$, lo cual permitió la obtención de aislados con una notable diferencia en su resistencia y, como se discute a continuación, con mejor producción.

MUTANTES RESISTENTES CON MAYOR PRODUCCION DE ESTREPTOMICINA.

La selección en placa de las cepas con producción incrementada resultó ser efectiva. En las mutantes seleccionadas en 60 $\mu\text{g}/\text{ml}$ no se pudieron observar incrementos en la producción, tal vez debido a que las diferencias fueran pequeñas o a que no existiera entre las cepas probadas alguna con esta característica, ya que existe la posibilidad de que el incremento en resistencia presentado fuera debido a mutaciones diferentes a las que se buscaban, pues la resistencia al antibiótico también puede darse por modificaciones no relacionadas con el gen de la fosfo-transferasa y su regulación. Además, hay que considerar que es posible que en estas condiciones de producción (en placa y con un medio diferente), no se esté expresando el incremento en la producción, aun cuando pudiera existir la información genética para esto. Sin embargo, de las 80 mutantes resistentes a 75 $\mu\text{g}/\text{ml}$ probadas, resultaron 3 cepas con una relación diámetro del halo/diámetro de la colonia mas alta que la de la cepa original que tuvo un valor de 3. Una de ellas presentó una relación de 5.3, la cual es considerablemente mas alta. Este resultado se repitió al probarlas nuevamente.

Antes de haber establecido esta técnica de selección en placa se probó la producción de algunas mutantes resistentes en medio líquido, entre ellas esta cepa, que en esas condiciones igualmente superó a la cepa original. Ambos resultados sugerían que esta mutante tenía una muy buena capacidad de producción de estreptomycin por lo que se realizaron nuevas pruebas en medio líquido.

Inicialmente las pruebas de producción en matraces de 125 ml se realizaron en medio 5 con 10 g/l de glucosa. En estas condiciones la cepa original produjo entre 200 y 300 $\mu\text{g/ml}$ del antibiótico partiendo de inóculos de esporas. Para las cepas mutantes se procuró obtener inóculos semejantes a los de la cepa de colección para poder establecer comparaciones. De las tres cepas con índice potencia alto solo una mostró diferencias considerables con respecto al control. En la figura número 7 se grafican los resultados de un cultivo en el que se comparó la cepa mutante con la que le dió origen. Como se puede observar, la producción de la cepa mutante fue de alrededor de 400 $\mu\text{g/ml}$, aunque en otros experimentos alcanzó 500 $\mu\text{g/ml}$, manteniéndose aproximadamente el doble de producción que la del control en todos los casos.

Al realizar modificaciones al medio en cuanto a la concentración de glucosa (el agregar 50 g/l en lugar de 10 g/l) tiene un efecto positivo sobre la producción del antibiótico en ambas cepas. En la figura 8 se ilustra un cultivo en el que *Streptomyces griseus* ATCC 12475 con esta concentración de fuente de carbono logró producciones de 500 $\mu\text{g/ml}$ del antibiótico mientras

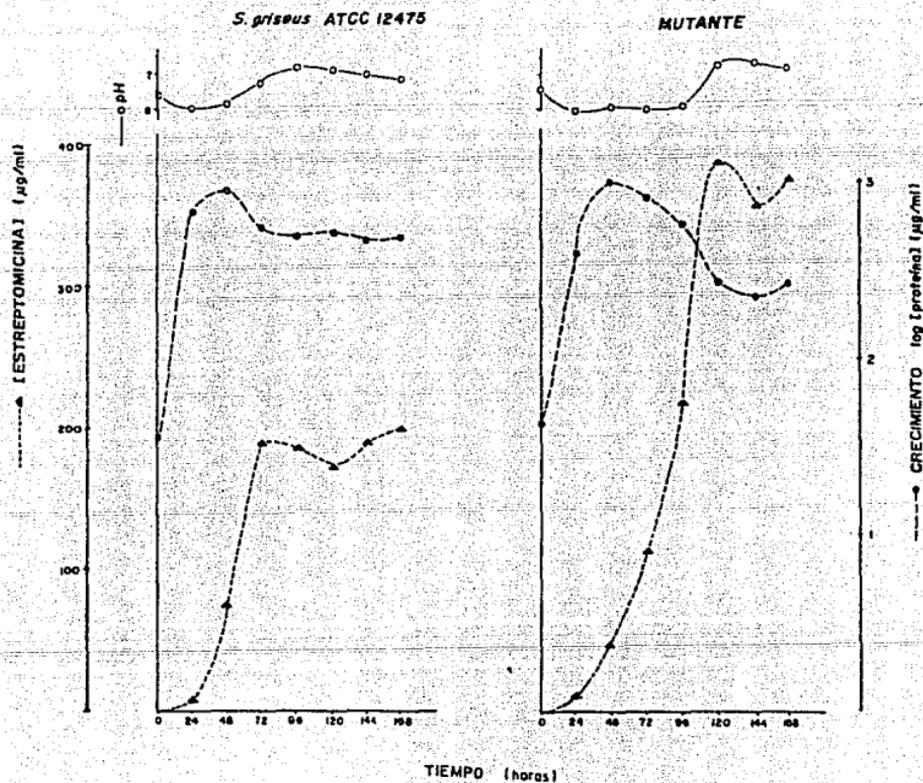


FIGURA No. 7. Cinéticas de crecimiento (●) y producción de estreptomicina (▲) de la cepa original y de la cepa mutante en el medio de Carbajal con 10 g/l de dextrosa (medio 5) (11).

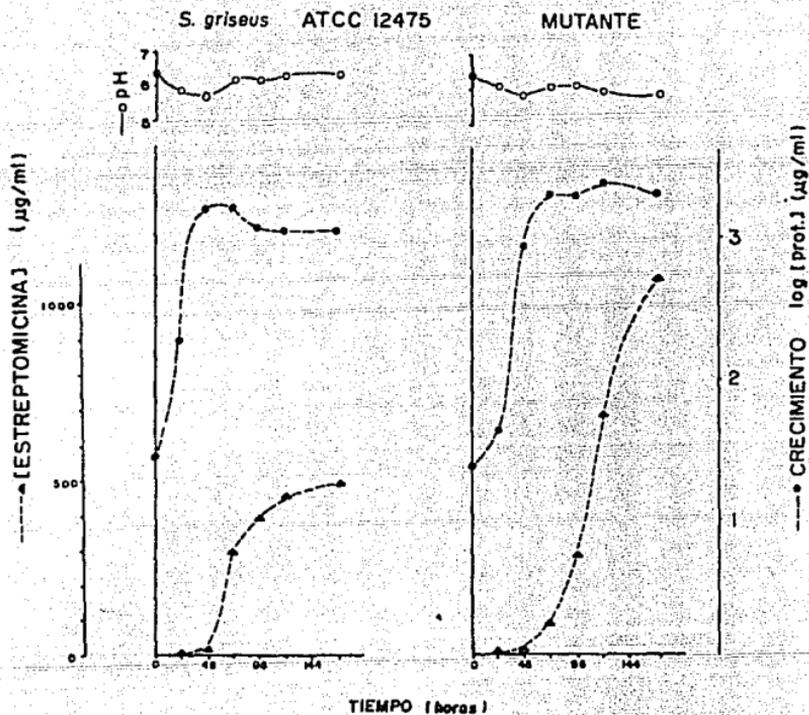


FIGURA No. B. Cinéticas de crecimiento (●) y producción de antibiótico (▲) de la cepa original y de la cepa mutante en el medio de Carbajal con 50 g/l de dextrosa (medio C) (11).

que la cepa mutante alcanza los 1100 $\mu\text{g/ml}$. Resulta interesante el hecho de que esta concentración de glucosa estimule la producción de estreptomycin, ya que ha sido reportado el fenómeno de represión de la D-manosidasa (29), en concentraciones de 15 g/l o mayores con la consecuente disminución de la concentración de antibiótico producida. Este resultado posiblemente tenga una explicación en el hecho de que en el reporte mencionado se trata de cepas de *S. griseus* diferentes y probablemente en la cepa con la que se realizó este trabajo no se presente este efecto negativo, pues como ya se ha mencionado es una cepa que ha sido sometida a mejoramiento genético (11).

Con las concentraciones de glucosa de 50 g/l nuevamente se repitió el resultado observado de una producción de aproximadamente el doble de la cepa original por lo que se procedió a determinar algunas otras características de esta mutante.

NUEVA RESISTENCIA A LA ESTREPTOMICINA.

En la figura 9 se encuentran graficados los porcentajes de germinación en presencia de estreptomycin de la cepa mutante. Como ya se mencionó, las esporas de la cepa original no fueron capaces de germinar en presencia de 50 $\mu\text{g/ml}$ del antibiótico. Por el contrario, la cepa mutante presentó una resistencia mucho mayor, ya que aun en 100 $\mu\text{g/ml}$, que es casi el doble de la concentración que prácticamente inhibe el crecimiento de la primera cepa, un 4 % de las esporas logró germinar y desarrollar colonias. Concentraciones de 150 $\mu\text{g/ml}$ permiten un 2 % de resistencias y es arriba de 200 $\mu\text{g/ml}$ de estreptomycin cuando no se ob-

servó crecimiento alguno. Esto significa que la resistencia se incrementó mas de tres veces. Además, se necesitan mayores incrementos en la cantidad de antibiótico presente para lograr cambios apreciables en el porcentaje de resistentes, a diferencia de la cepa original cuya resistencia cayó rápidamente al incrementar la concentración 30 $\mu\text{g/ml}$.

Resultó interesante el que al hacer transferencias con asa microbiológica de la cepa mutante de placas sin antibiótico a otras con 250 $\mu\text{g/ml}$ haya un buen desarrollo de micelio, contrariamente al escaso crecimiento que se esperaría y resulta desconcertante el hecho de que en esta concentración también la cepa original logró desarrollarse bien si se hacen las transferencias de esta manera. Este fenómeno posiblemente encuentre explicación en el hecho de que con el asa se está transfiriendo además de esporas micelio, que se encuentra metabólicamente activo a diferencia del estado de latencia de las esporas en medio con glicerol. Además, la cantidad de esporas que se toman con el asa es varios ordenes de magnitud mas grande que la de la suspensión de esporas utilizada en los experimentos de la figura 9, por lo que a pesar de ser un porcentaje de germinación muy bajo, fue suficiente para el desarrollo del microorganismo en la placa.

La resistencia de la esporas en medio 10 líquido con antibiótico fué también diferente. Bajo estas condiciones la cepa mutante crece hasta en 50 $\mu\text{g/ml}$ de estreptomycin y concentraciones superiores difícilmente permiten su desarrollo. La cepa original resistió concentraciones mucho más bajas que la mencionada en las mismas condiciones.

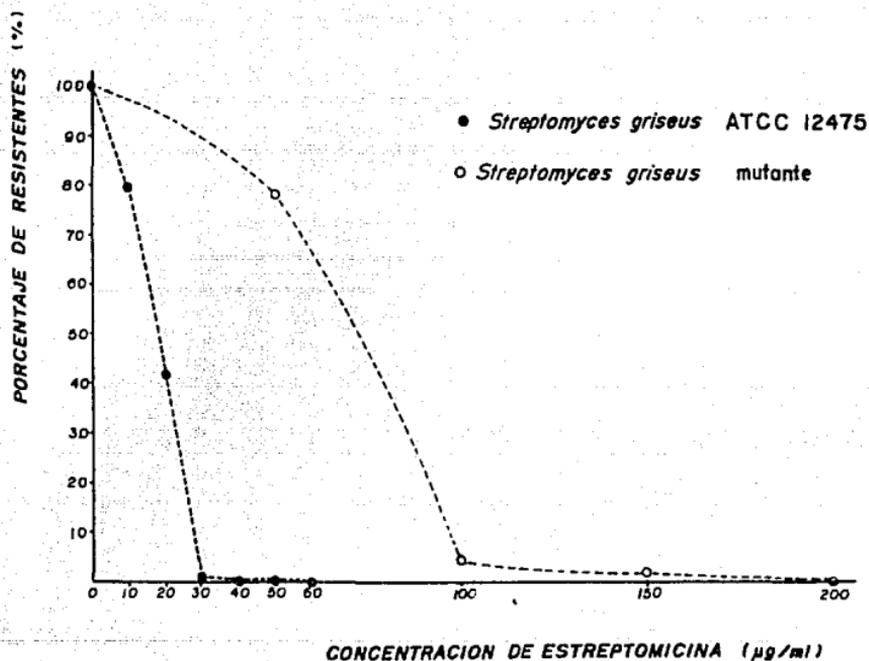


FIGURA No. 9. Resistencia de las esporas de la cepa original (●) y de la cepa mutante (○) a concentraciones crecientes de estreptomicina en medio l ajustado a pH 8.

ESTABILIDAD DE LA CEPA OBTENIDA.

La cepa mutante resultó ser inestable al transferirla serialmente en medios en los que no hay estreptomycin, tendiendo a revertir al fenotipo original. Este fenómeno se ilustra en la gráfica de la figura 10. Como se puede observar, la producción en placa va disminuyendo en cada transferencia aproximándose al valor del índice potencia de la cepa de la cual se partió, el cual es de 3.

A pesar de que este resultado no es el mas deseable, hay que tener en cuenta que el añadir estreptomycin a las placas de medio 2 en una concentración de 2000 $\mu\text{g/ml}$ impide esta reversión. Al realizar 7 transferencias en estas condiciones y llevar a cabo un cultivo en medio 5 con las esporas provenientes de la última de ellas no se observó disminución en la producción. De esta manera fue posible conservar a la cepa mejorada sin reversión, lo cual resulta importante.

Como ya se mencionó anteriormente, es frecuente que las cepas mejoradas reviertan si no son mantenidas en condiciones especiales, sobre todo si la información de interés se encuentra codificada en plásmidos (lo que no sucede en el caso de la estreptomycin en este microorganismo). Existen reportes de cepas mejoradas productoras de estreptomycin que presentan este fenómeno de reversión y de como la presencia de estreptomycin en el medio impide la pérdida de la información de la cepa (79), lo que concuerda con los resultados obtenidos y es lógico esperar si tomamos en cuenta la regulación coordinada del gen de resis-

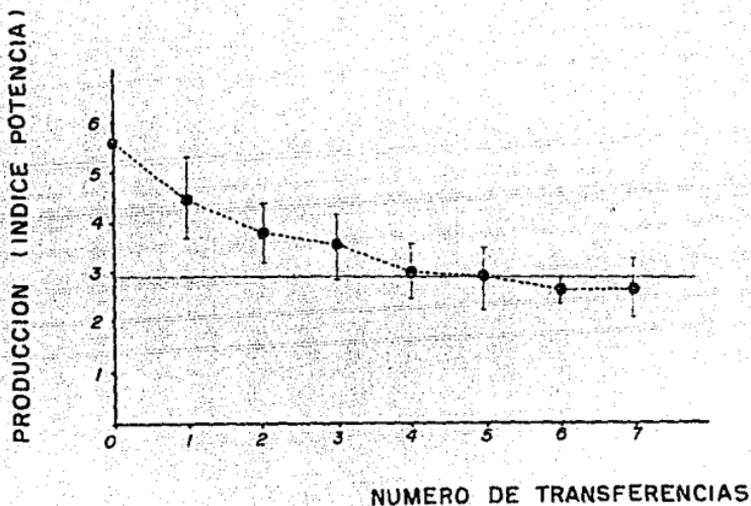


FIGURA No. 10. Estabilidad de la cepa mutante. Efecto de las transferencias seriales en ausencia de estreptomicina sobre la producción en placa, expresada como índice potencia (diámetro del halo/ diámetro de la colonia). La línea con tinua indica el índice de la cepa original.

tencia y los de biosíntesis, posible por el arreglo de éstos en el genoma.

INOCULOS PRECRECIDOS.

El resultado del experimento en el que se precreció al mutante con y sin antibiótico se encuentra graficado en la figura número 11. Las gráficas A y B corresponden a cultivos con la cepa original inoculados con esporas y con el microorganismo precrecido respectivamente. Al igual que en el experimento en el que se compararon distintos medios de cultivo, en este, el inocular esporas permitió alcanzar mayores concentraciones del antibiótico en la fermentación (420 contra 310 $\mu\text{g/ml}$). Lo mismo ocurrió con el cultivo de la cepa mutante a partir de esporas que alcanzó los 1070 $\mu\text{g/ml}$ de estreptomycin (gráfica C). Como se observa en la gráfica D, si esta cepa es precrecida en medio sin estreptomycin al parecer presenta un fenómeno de reversión, pues su producción alcanzó apenas los 395 $\mu\text{g/ml}$, concentración similar a la sintetizada por la cepa original. Esto no sucede en los cultivos en los que se utilizó como inóculo el mutante precrecido en el medio con 50 $\mu\text{g/ml}$ del antibiótico. Bajo estas condiciones, la producción, aunque mas baja que la del cultivo de esporas, siguió siendo muy superior a la de la cepa de la cual se partió, alcanzando los 870 $\mu\text{g/ml}$ (gráfica E).

El precrecer a la cepa mutante en presencia de estreptomycin permitió obtener inóculos con facilidad, evitando así el manejo de esporas de esta cepa que presenta una escasa esporulación. Tal vez sea posible obtener producciones similares a las de los

cultivos de esporas si se realizan modificaciones de las condiciones empleadas para obtener los inóculos precrecidos. Una de esas posibles modificaciones es la del medio empleado para el precrecimiento y esto dependiendo del medio que se utilizará para la producción del antibiótico, ya que el cambio de un medio de cultivo a otro de diferente composición tiene una repercusión importante sobre el metabolismo del microorganismo como lo demuestra el experimento de la figura 11. En esas gráficas se observa un claro retraso en el crecimiento del microorganismo en los casos en los que se inoculan células precrecidas en un medio complejo y no esporas (gráficas B, D y E). Además, la producción del antibiótico se vió también notablemente retrasada, alcanzándose las máximas concentraciones hasta las 168 horas, siendo posible que aun después de ese tiempo se incrementen, ya que no se siguió el cultivo después de ese tiempo.

Otra modificación que podría repercutir en la cantidad de estreptomocina producida es la del tamaño del inóculo, ya que en otros experimentos se ha vió que éste la afecta notablemente y durante el presente trabajo esta variable no fue optimizada.

Una tercera variable que puede tomarse en cuenta es la cantidad de estreptomocina a añadir en el medio de precrecimiento, pues también es posible que esto afecte la producción alcanzada, y en este experimento simplemente se utilizó una concentración en la que no se permitía el crecimiento de la cepa original para evitar la reversión de la mutante. Hay que tener presente además que esto dependerá de los medios de cultivo empleados.

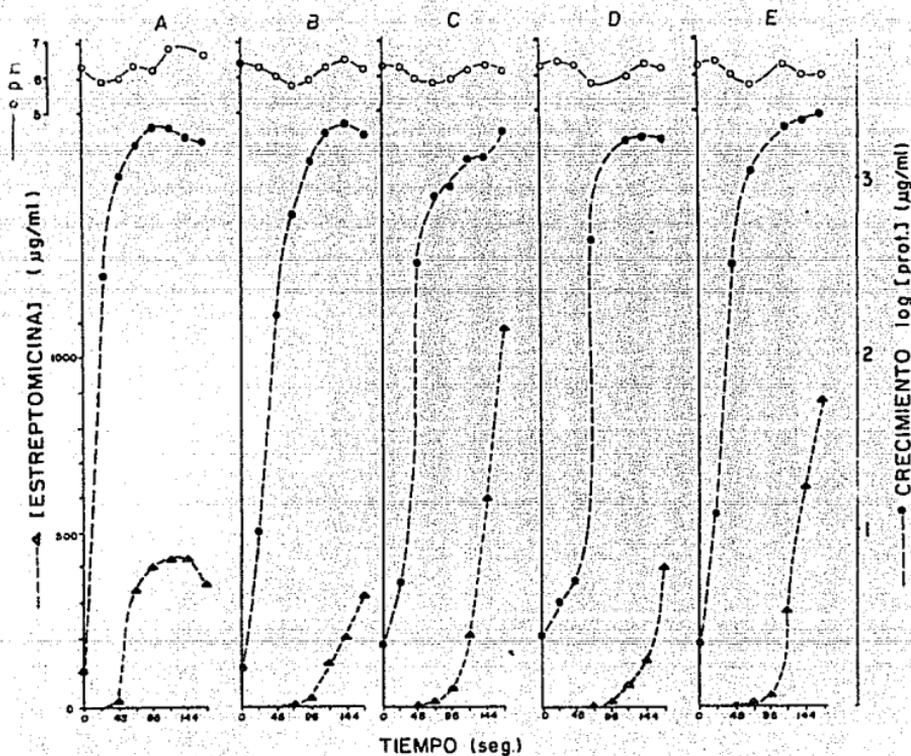


FIGURA NO. 11. Comparación del crecimiento (●) y la producción de antibiótico (▲) alcanzados con diferentes inóculos en la cepa original y en la cepa mutante. Las gráficas A y B corresponden a cultivos de la cepa original con inóculos de esporas y precrecido sin antibiótico respectivamente. Las gráficas C, D y E corresponden a la cepa mutante con inóculos de esporas, precrecido sin antibiótico y precrecido con 50 µg/ml de estreptomicina. El medio empleado para los cultivos fue el número 5 con 50 g/l de dextrosa.

IDENTIFICACION DEL ANTIBIOTICO

PRODUCIDO POR LA CEPA MUTANTE.

Previamente a la identificación del antibiótico fue necesario realizar su purificación para eliminar otras moléculas del caldo de cultivo que podrían interferir al realizar la cromatografía en papel y dificultar la identificación. Este proceso se llevó a cabo de una manera efectiva en la amberlita IRC-50, pues no se observó antibiótico al llevar a cabo el bioensayo de los caldos de cultivo que fueron pasados por la columna, mientras que en las fracciones colectadas durante la elución con ácido se demostró la presencia de este compuesto. El flujo de la columna fue de aproximadamente 1.8 ml/min., aunque este fue disminuyendo al cambiar el pH de la resina, pues al acidificarse ésta se compactó retardando así el paso del eluyente.

Resulta inconveniente en la técnica empleada el que al reajustar el pH de las fracciones a 6 para la detección del antibiótico se formó una cantidad muy grande de sales por la neutralización del ácido, ya que muchas de las fracciones presentaban un pH demasiado bajo (inferior a 1). Posiblemente sería más conveniente utilizar una menor concentración de ácido para la elución, ya que aun en pHs de 3 y 4 el antibiótico fue recuperado.

La cromatografía en papel se realizó previamente con sulfato de estreptomicina disuelta en amortiguador fosfatos 0.1 M de pH 8 para determinar el Rf de esta molécula con la mezcla de solventes empleada (n-butanol-ác. acético-agua; 2:1:1) y probar el re-

velado del cromatograma con la ninhidrina. El Rf del sulfato de estreptomycinina a pH 8 fue de 0.62, los resultados de la cromatografía se pueden apreciar en la figura 12.

En el carril 1 se colocó un estándar de sulfato de estreptomycinina disuelto en amortiguador, en los carriles 2 y 5 el estándar recuperado del medio de cultivo, en el carril 3 el antibiótico producido por *S. griseus* ATCC 12475, en el 4 el de la cepa mutante y en el 6 y 7 la mezcla del estándar recuperado con el antibiótico de la cepa original y el de la mutante respectivamente.

Como se puede apreciar en la figura 12, los Rf son muy similares en todos los casos y de alrededor de 0.62, además, en los carriles en los que se colocaron mezclas de sulfato de estreptomycinina con el antibiótico de las cepas, únicamente apareció una mancha, por lo que se puede afirmar que el antibiótico producido por la cepa mutante efectivamente es estreptomycinina como era de esperarse, ya que la producción de estos metabolitos es cepa-especifica y el microorganismo del cual se partió es un productor de estreptomycinina. La cromatografía que se muestra presenta las manchas correspondientes al antibiótico un tanto dispersas debido a que las sales contenidas en las muestras se depositan en el papel y dificultan el corrimiento de las muestras, ocasionando que el antibiótico se disperse ligeramente.

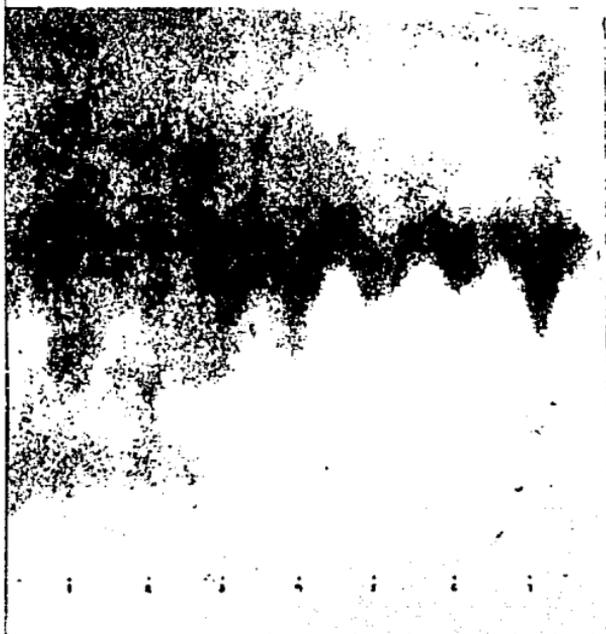


FIGURA No. 12. Cromatografía en papel del antibiótico producido por las dos cepas. En el carril 1 se encuentra un estándar de sulfato de estreptomina disuelto en amortiguador. Los carriles 2 y 5 corresponden a un estándar recuperado del medio de cultivo. En el carril 3 se encuentra el antibiótico - producido por la cepa original. En el carril 4 se observa el de la cepa mutante y los carriles 6 y 7 corresponden a la mezcla del estándar y los productos de la cepa original y de la mutante respectivamente.

CONCLUSIONES

- La metodología empleada para la mutagénesis de *Streptomyces griseus* permitió obtener la cepa deseada, aunque con mortalidades muy altas.
- La cepa mutante obtenida produce aproximadamente el doble de la cantidad de antibiótico sintetizada por la cepa de la cual se partió.
- De los medios de cultivo probados, el medio de Carbajal resultó ser el más adecuado para la producción de estreptomycinina en matraces de 125 ml.
- En el medio de Carbajal con 10 g/l de dextrosa *S. griseus* ATCC 12475 produjo de 250 a 300 µg/ml del antibiótico, mientras la cepa mutante alcanzó los 500 µg/ml.
- El agregar 50 g/l de dextrosa a este medio no provocó un efecto negativo sobre la producción, como se ha reportado, sino que la estimuló en ambas cepas, lográndose alcanzar en la cepa original 500 µg/ml y en la cepa mutante 1100 µg/ml.
- La resistencia de este microorganismo a la estreptomycinina se incrementó en más de tres veces, tanto en esporas como en micelio y lo mismo en placa que en medio líquido, aunque en cada caso las concentraciones inhibitorias fueron diferentes y dependientes del medio de cultivo empleado.

- La cepa obtenida es inestable y se presentó la reversión de las características adquiridas al manejarla sin una presión de selección. Sin embargo, fué posible impedir este fenómeno manteniendo a la cepa en placas del medio número 2 con 2 mg /ml. de estreptomycinina.
- La cepa mejorada presentó una notable disminución en su capacidad de esporulación. Esta dificultad en el manejo de la cepa se pudo salvar precreciendo micelio en presencia de estreptomycinina para la obtención de inóculos.
- Se comprobó que el antibiótico producido por la cepa mutante es estreptomycinina y no otro de los sintetizados por esta especie.

BIBLIOGRAFIA CITADA:

- 1.-Aharonowitz, Y., G.Cohen. (1981). Producción microbiológica de fármacos. *Inv. y Ciencia*. 62,78-93.
- 2.-Anzai, H., T.Murakami, S.Imai, A.Sato, K.Nagaoka, C.Thompson. (1987). Transcriptional regulation of bialaphos biosynthesis in *S. hygrosopicus*. *J.Bacteriol* .169,3482-4488.
- 3.-Barrera, M.R., G.V.Bejarano. (1957). Pruebas preliminares de tratamiento postcosecha de frutos de aguacate. *Plant Disease Reporter*. 41.
- 4.-Bartels, R.Ch., B.Berk, W.L.Bryan. (1953). U.S.Patent 2765302.
- 5.-Bartels, R.C., W.L.Bryan, Westfield. (1956). U.S.Patent 2868-779.
- 6.-Belter, P.A. (1985). Ion exchange recovery of antibiotics. p. 473-480. En Moo-Young (ed.), *Comprehensive Biotechnology*. I. Pergamon Press.
- 7.-Bérdy, J. (1974). Recent developments of antibiotic research and classification of antibiotic according to chemical structure. *Adv. in App. Microbiol.* 18,309-406.
- 8.-Betina, V. (1975). Paper chromatography of antibiotics. p.100-172. En Hash, J. (ed.), *Methods in enzymology*. Academic Press.
- 9.-Bibb, M.J., G.R.Jansen, J.M.Ward. (1985). Cloning and analysis of the promoter region of the erythromycin resistance gene (ermE) of *Streptomyces erythraeus*. *Gene*.38,215-226.
- 10.-Carbajal, F. (1953). Phage problems in streptomycin fermentation. *Mycologia*. 45,209-234.
- 11.-Carbajal, F. (1957). U.S. Patent 2808364.
- 12.-Cella, R., L.C.Vining. (1975). Resistance to streptomycin in a producing strain of *S. griseus*. *Can.J.Microbiol.* 21,463-472.
- 13.-Claridge, C.A. (1979). Aminoglycoside antibiotics. p.151-238. En Rose, A.H.(ed.), *Economic microbiology. Secondary products of metabolism*.3. Academic Pres.
- 14.-Coc, D.M. (1955). Progress report on the use of streptomycin for the control of the bacterial spot of tomatoes under field conditions on south Florida sandy soils. *Plant Disease Rep.* 39,215-218.
- 15.-Cross, T. (1973). Taxonomy and classification of the Actinomycetes. p.11-112. En Sykes, G., F.Skinner (eds.), *Actinomycetes*. Academic Press.
- 16.-Chater, K.F., C.J.Bruton. (1985). Resistance, regulatory and biosynthetic genes for the antibiotic methylenomycin are

clustered. *EMBO J.* 4,1893-1897.

- 17.-Davies, J., C.Houk, M.Yagisawa, T.White. (1979). Occurrence and function of aminoglycoside-modifying enzymes. p.166-169. En Sebek, O.K., A.L.Laskin (eds.), Genetics of Industrial Microorganisms. Am.Soc.Microbiol.
- 18.-Delic, V., D.A.Hopwood, E.J.Friend. (1970). Mutagenesis by N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (NTG) in *Streptomyces coelicolor*. *Mutation. Res.* 9,167-182.
- 19.-Demain, A.L. (1970). Biochemistry and regulation of streptomycin and mannostreptomycinase formation. *Bacteriol Rev.* 34,1-19.
- 20.-Demain, A.L., E.Inamine. (1970). Biochemistry and regulation of streptomycin and mannostreptomycinase formation. *Bacteriol. Rev.* 34,1-19.
- 21.-Demain, L.D., N.A.Solomon. (1981). *Microbiologia Industrial. Inv. y Ciencia.* 62,10-21.
- 22.-Distler, J., C.Braun, A.Ebert, W.Piepersberg. (1987). Gene cluster for streptomycin biosynthesis in *Streptomyces griseus*: Analysis of a central region including the major resistance gene. *Mol.Gen.Genet.* 208,204-210.
- 23.-Distler, J., K.Klier, K.Piendl. (1985). Streptomycin biosynthesis in *Streptomyces griseus* I. Characterization of streptomycin-idiotropic mutants. *FEBS Microbiol.Lett.* 30,145-150.
- 24.-Distler, J., K.Mansouri, W.Piepersberg. (1985). Streptomycin biosynthesis in *Streptomyces griseus*. II. Adjacent genomic location of biosynthetic genes and one of two streptomycin resistance genes. *FEBS Microbiol.Lett.* 30,151-154.
- 25.-Doery, H.H., C.Mason, D.E.Weiss. (1950). Estimation of streptomycin in fermentation broth. *Anal.Chem.* 22,1038-39.
- 26.-Dulaney, E.L. (1948). Observations on *Streptomyces griseus*. Nitrogen sources for growth and streptomycin production. *J.Bacteriol.* 56,305-313.
- 27.-Dulaney, E.L. (1949). Observations on *Streptomyces griseus*. Carbon sources for growth and streptomycin production. *Mycologia.* 41,1-10.
- 28.-Epps, W. (1957). Control de la pudrición de la semilla de la papa partida en Carolina del sur. *Plant Disease Reporter* 41.
- 29.-Garner, H.R., H.Koffer. (1953). Factors affecting streptomycin yields. *Am.J.Bot.* 40,289-296.
- 30.-Gottlieb, P. (1973). General consideration and implication of

- the Actinomycetales. p.1-10. En G.Sykes & F.Skinner (ed.) Actinomycetales. Academic Press.
- 31.-Grisebach,H., B.Kniep. H.Wahl. (1981). Biosynthesis of streptomycins. 95-99.
 - 32.-Hammond,M.S., P.Lambert. (1978). Antibiotics and antimicrobial action. Edward Arnold Publishers.
 - 33.-Hara,O., T.Beppu. (1982). Mutants blocked in streptomycin production in *Streptomyces griseus*. The role of A-factor. *J.Antibiot.* 35,349-358.
 - 34.-Heggstad,H.E., H.O.Reas, J.Crosso. (1956). Comparison of various streptomycin dusts and spray treatments for wildfire control in tobacco plant beds. *Plant Disease Reporter.* 40,48-50.
 - 35.-Hinterman,G., R.Cramerl, M.Vogtl, R.Huter. (1984). Streptomycin sensitivity in *S. glaucescens* is due to deletions comprising the structural gene coding for a specific phosphotransferase. *Mol.Gen.Genet.*196,513-520
 - 36.-Hockenull,D.J. (1960). The biochemistry of streptomycin production. En Hoeckenull,D.J. (ed.), Progress in Industrial Microbiology. Heywood Co.
 - 37.-Holt,G., G.Saunders. (1985). Genetic Modification of Industrial Microorganisms. p.51-76. En Moo-Young (ed.), Comprehensive Biotechnology. Pergamon Press.
 - 38.-Hopwood,A.D. (1981). Programación genética de microorganismos industriales. *Inv.y Ciencia.* 62,41-65.
 - 39.-Horinouchi,S., Y.Kumada, T.Beppu. (1984). Unstable genetic determinant of A-factor biosynthesis in streptomycin-producing organisms: cloning and characterization. *J.Bacteriol.* 158,481-487.
 - 40.-Hotta,K., A.Takahashi, Y.Okami, H.Umezawa. (1983). Relation between antibiotic resistance and antibiotic productivity in actinomycetes which produce aminoglycoside antibiotics. *J.Antibiot.* 36,1789-1791.
 - 41.-Inamine,E., B.D.Lago, A.L.Demain. (1969). Regulation of mannosidase, an enzyme of streptomycin biosynthesis. En D. Perlman (ed.), Fermentation Advances. Academic Press.
 - 42.-Inoue,S., Y.Nishizawa. (1982). Stimulation of streptomycin formation by *S.griseus* grown in a phosphate deficient culture. *J.Ferment.Technol.* 60,417-422.
 - 43.-Inoue,S., Y.Nishizawa, S.Nagai. (1983). Stimulatory effect of ammonium on streptomycin formation by *S. griseus* growing on a glucose minimal medium. *J.Ferment.Technol.* 61, 7 - 12
 - 44.-Kaufmann,M.J., D.W.Chamberlain. (1957). Efecto de los anti-

- bióticos contra el tizón bacteriano de la soya causado por *Pseudomonas glycinea* (Coerper) Stapp. *Plant Disease Reporter*. 41.
- 45.-Kavanagh, F., E.Grinnan, et.al. (1960). Dihydrostreptomycin produced by direct fermentation. *Appl.Microbiol.* 160-162.
- 46.-Khokhlov, A.S. (1957). A-factor responsible for the biosynthesis of streptomycin by a mutant strain of *Actinomyces streptomycini*. *Dokl.Akad.Nauk.SSSR*. 177, 232-235.
- 47.-Kniep, B., H.Grisebach. (1980). Biosynthesis of streptomycin. *Fur.J.Biochem.* 105, 139-144.
- 48.-Kniep, B., H.Grisebach. (1980). Biosynthesis of streptomycin. Enzymatic formation of dihydrostreptomycin-6-P. *J.Antibiot.* 33, 416-419.
- 49.-Kumada, Y., H.Anzai, E.Takano. (1988). The bialaphos resistance gene plays a role in both self defense and bialaphos biosynthesis in *Streptomyces hygroscopicus*. *J.Antibiot.* 41, 1838-1845.
- 50.-Kumada, Y., S.Horinouchi, T.Uozumi, T.Beppu. (1986). Cloning of a streptomycin gene directing synthesis of N-methyl-L-glucosamine. *Gene*. 42, 221-224.
- 51.-Lowry, O.H., W.J.Rosebrough, A.L.Farr, R.J.Randall. (1951). Protein measurement with the Folin-phenol reagent. *J. Biol.Chem.* 193, 265-275.
- 52.-Malpartida, F.H., D.A.Hopwood. (1984). Molecular cloning of the whole biosynthetic pathway of a *Streptomyces* antibiotic and its expression in a heterologous host. *Nature*. 309, 462-464.
- 53.-Marlatt, R.B. (1955). Effectiveness of streptomycin as a control for the common bacterial blight of pinto bean. Arizona Agricultural Experiment station. Technical paper No.352.
- 54.-Martin, J.F., G.Nahrro, P.Liras, J.Villanueva. (1979). Isolation of mutants deregulated in phosphate control of taidicidin biosynthesis. *J.Antibiot.* 32, 600-606.
- 55.-McCann, P., McCormick. (1981). Endogenous factors involved in aerial mycelium formation in Actinomycetes p.348-351. En D.Schlessinger (ed.), Microbiology. Am.Soc.Microbiol.
- 56.-Miller, A., J.Walker. (1970). Accumulation of streptomycin-P in cultures of streptomycin producers grown on a high phosphate medium. *J.Bacteriol.* 104, 8-12.
- 57.-Miller, P.W. (1956). Preliminary comparison of Agri-micin 100 and copper compounds for the control of walnut blight in Oregon. p.626-627.

- 58.-Murakami,T., H.Anzai ,S.Imai, A.Sato, K.Nagaoka, C. Thompson. (1986). The diphospho biosynthetic genes of *Streptomyces hygroscopicus*: Molecular cloning and characterization of the gene cluster. *Mol.Gen.Genet.* 205,42-50.
- 59.-Musilek,V. (1963). Prevention of loss of streptomycin production on repeated transfer of *S. griseus*. *J.Appl. Microbiol.* 11,28-29.
- 60.-Nager,F., F.Dursch. (1969). U.K. Patent 1256475.
- 61.-Nimi,O., H.Sugiyama, H.Kameoka. (1981). Fate of streptomycin in mycelium of the producer organism. *Biotech.Lett.* 3,239-244.
- 62.-Nomi,R. (1963). Variations in strains of *S. griseus* isolated from a degenerating streptomycin-producing culture. *J.Appl.Microbiol.* 11,84-89.
- 63.-Ohnuki,T., T.Imanaka, S.Aiba. (1985). Self cloning in *S. griseus* of streptomycin gene cluster. *J.Bacteriol.* 164, 85-94.
- 64.-Ono,H., R.Cramerl. (1983). Hydroxystreptomycin production and resistance in *S. glaucescens*. *J.Gen.Microbiol.* 129,529-537.
- 65.-Parag,Y. (1979). Mapping and plasmid control in *S. griseus* producer of cephamycin. p.258-262. En O.Sebek, A.Laskin (eds.), Genetics of Industrial Microorganisms. Am.Soc. Microbiol.
- 66.-Perlman,D., R.B.Greenfield, E.O'Brien. (1954). Degeneration of a *S. griseus* mutant on repeated transfer. *Appl. Microbiol.* 2,199-202.
- 67.-Phaff,J.H. (1981). Microorganismos industriales. *Inv. y Ciencia.* 62,22-37.
- 68.-Pogwizd,S.M., S.A.Lerner. (1984). Mechanisms of action of antimicrobial agents. p.299-316. En Lasking & Lechevalier (eds.), Handbook of Microbiology. Growth and Metabolism. IV CRC Press Inc.
- 69.-Rich,S. (1956). Comparison of various compounds in corn seedling against Stewart's wilt. *Plant Disease Reporter.* 40,48-50.
- 70.-Rinehart,K.L., E.H.Stroshane. (1976). Biosynthesis of aminocyclitol antibiotics. *J.Antibiot.* 29,319-334.
- 71.-Rose,H.A. (1979). Production and industrial importance of secondary products of metabolism. p.2-32. En A.H. Rose (ed.), Secondary Products of Metabolism. Academic Press.

- 72.-Rowlands,R.T. (1984). Industrial strain improvement: mutagenesis and random screening procedures. *Enzyme Microb. Tech.* 6,2-10.
- 73.-Shiroh,S., H.Motoyama. (1986). Fermentation studies with *S. griseus*. *Appl.Microbiol.* 14,706-710.
- 74.-Stanzak,R., P.Matsushima, R.Baltz, R.N.Rao. (1986). Cloning and expression in *S.lividans* of clustered erythromycin biosynthetic genes from *S. erythraeus*. *Bio/Technol.* 4, 229-232.
- 75.-Umezawa,H., S.Kondo. (1975). Ion exchange chromatography of aminoglycoside antibiotics. p.263-278. En J.H.Hash (ed.), *Methods in Enzymology.* 63.
- 76.-Vallins,W., S.Baumberg. (1985). Cloning of a DNA fragment from *Streptomyces griseus* with direct streptomycin phosphotransferase activity. *J.Gen.Microbiol.* 131, 1657-69.
- 77.-Vázquez,D. (1981). Inhibidores de biosíntesis de proteínas. *Inv. y Ciencia.* 62,130-144.
- 78.-Vogtli,M., R.Hutter. (1987). Characterization of the hydroxy streptomycin phosphotransferase gene (sph) of *Streptomyces glaucescens*. Nucleotide sequence and promoter analysis. *Mol.Gen.Genet.* 208,195-203.
- 79.-Waksman,S.A., H.C.Reilly, D.B.Johnstone. (1946). Isolation of streptomycin producing strains of *S. griseus*. *J. of Bacteriol.* 52,393-397.
- 80.-Walker,J.B. (1978). Biosynthesis of aminocyclitols and guanidinocyclitols. p.423-438. En D.Wells & F.Eisenberg (eds.), *Cyclitols and phosphinositides.* Academic Press.
- 81.-Walker,J.B., M.S.Walker. (1982). Enzymatic synthesis of streptomycin as a model system for study of the regulation and evolution of antibiotic biosynthetic pathways. p.271-281. En Krumphanz et al. (eds.), *Overproduction of Microbial Products.* Academic Press.
- 82.-Zaumeyer,W.J., R.E.Wester. (1956). The control of downy mildew of lima beans with streptomycin. *Plant Disease Reporter.* 40,776-780.