



UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS FÍSICAS Y MATEMÁTICAS

DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA QUÍMICA,
BIOTECNOLOGÍA Y MATERIALES

OPTIMIZACIÓN DEL CRECIMIENTO CELULAR DE *STREPTOMYCES*
SP. DEL SALAR DE TARA; EVALUACIÓN DE PARÁMETROS

MEMORIA PARA OPTAR AL TÍTULO DE INGENIERO CIVIL EN
BIOTECNOLOGÍA

SEBASTIÁN IGNACIO GUERRERO CASSANELLO

PROFESOR GUÍA:

JUAN A. ASENJO DE LEUZE

MIEMBROS DE LA COMISIÓN:

BÁRBARA ANDREWS FARROW

MARÍA ELENA LIENQUEO CONTRERAS

PABLO RAMÍREZ RIVAS

SANTIAGO DE CHILE

2019

RESUMEN DE LA MEMORIA PARA OPTAR AL

TÍTULO DE: Ingeniero Civil en Biotecnología

POR: Sebastián Ignacio Guerrero Cassanello

FECHA: 2019

PROFESOR GUÍA: Juan Asenjo de Leuze

OPTIMIZACIÓN DEL CRECIMIENTO CELULAR DE *STREPTOMYCES SP.* DEL SALAR DE TARA; EVALUACIÓN DE PARÁMETROS

Este trabajo de título es motivado por la búsqueda de nuevos anticancerígenos y antibióticos provenientes de microorganismos de ambientes naturales y extremos, como los provenientes del Desierto de Atacama. Por lo cual, se busca optimizar el crecimiento celular de cepas de *Streptomyces* del Salar de Tara, maximizando su biomasa final y minimizando su tiempo de crecimiento. Además, realizar una reflexión ética sobre los alcances del trabajo realizado y su relación con la ética profesional.

En la metodología a emplear, en primer lugar, se buscó corroborar el comportamiento alcalífilo de estas cepas y probar una fuente de carbono alternativa al almidón. Luego, se realizaron pruebas para encontrar el pH y T° óptimos, para después determinar la cinética del microorganismo en estas condiciones. Posteriormente, se escaló el cultivo a un biorreactor de un 1 L, realizando en 1° lugar una fermentación controlando la T° y agitación, para luego realizar un segundo cultivo manteniendo constante el pH del medio. Además, se realizó una discusión ética mediante un marco conceptual, abordando las características de la actividad tecnocientífica desde el autor Javier Echeverría y el principio de responsabilidad de Hans Jonas, como el Principio Precautorio de la UNESCO, la Declaración de Singapur y un análisis de los fines de la actividad profesional.

Los resultados del trabajo permiten corroborar que las cepas del Salar de Tara presentan un crecimiento alcalífilo, como también, que el almidón es una mejor fuente de carbono frente a la glucosa. Para los estudios posteriores se trabajó con la cepa más prometedora, desde un punto de vista terapéutico, la ST2-7A. Se encontró el pH y la T° óptima, siendo 10 y 33°C, respectivamente. Al escalar a un biorreactor de 1 L se redujo la fase exponencial de 12 a 3 horas, un aumento de 10 veces de la tasa máxima de crecimiento y un incremento de un 99% de la biomasa al llegar al estado estacionario, frente a las mismas condiciones en un volumen menor. Al controlar el pH a 10 se inhibió el crecimiento celular, teniendo una biomasa final un 45% menor frente al caso anterior.

Además, se reflexiona sobre los alcances del trabajo realizado, reconociendo a la biotecnología como una actividad tecnocientífica, planteando la problemática de encontrar nuevos compuestos con fines terapéuticos provenientes un ambiente natural. Realizando así un análisis desde el principio de responsabilidad y su extensión a uno axiológico, como la necesidad de incorporar en los fines de la actividad profesional, de científicos e ingenieros, el principio de responsabilidad en un marco axiológico de la acción tecnocientífica.

De esta forma, se propone seguir investigando el mejor pH para el cultivo y seguir añadiendo variables al control de este, como sería encontrar la agitación y la presión de oxígeno óptimas, además de estudiar las fases posteriores del proceso de crecimiento.

Agradecimientos

De antemano, quiero agradecerle a todos los que han permitido llegar hasta este momento personal y profesional que me permitirá cerrar una etapa de mi vida, pero abrir muchas otras más.

En primer lugar, a mis padres César y Eugenia, ya que ambos han sido los hombros de gigantes que me han permitido crecer, aprender y formarme como un profesional y persona integral con valores, sin su apoyo y motivación no hubiera sido posible llegar hasta este momento.

En segundo lugar, agradezco a mi prometida Karen, la cual ha sido un pilar fundamental que no solo me ha ayudado a seguir mi camino universitario, sino que proyectarme a futuro como profesional y tener horizontes ambiciosos y realistas.

Luego, agradecer a toda mi familia y amigos que han estado en esos momentos extraacadémicos, siendo un espacio emocional que me enseña que la universidad ha sido una etapa importante en mi vida, pero no la única, donde dar espacio al descanso y al ocio permiten mantener un ritmo de vida saludable.

Además, agradecer a los miembros de mi comisión evaluadora, los que me han brindado su asesoría experta y consejos prácticos para resolver y discutir los resultados de mi trabajo, siendo posible los grandes avances logrados. En especial, a mi Profesor Guía Juan Asenjo, el cual me brindó su apoyo y conocimiento para resolver los puntos más críticos de esta memoria.

También, quiero agradecer al Profesor Pablo Ramírez, el que me ha mostrado la importancia de una formación donde la ética y las humanidades son parte fundamental de un profesional integral.

Por último, agradezco al Centro de Biotecnología y Bioingeniería (CeBiB), el que me ha permitido ser parte de un gran proyecto para buscar nuevas soluciones a problemas tan serios como la falta de nuevos antibióticos y anticancerígenos, pero a partir de nuestro ecosistema nacional, el cual aún guarda muchos descubrimientos. Como también el acceso a sus laboratorios y las valiosas personas que trabajan en el Centro, como el estudiante de doctorado Carlos Cortés que me guio en el trabajo previo a esta memoria, y quienes trabajan en sus instalaciones que estuvieron dispuestos a ayudarme en momentos de necesidad.

Tabla de Contenido

1. Introducción y motivación	1
2. Antecedentes.....	3
2.1 La búsqueda de nuevos antibióticos	3
2.2 El combate internacional contra el cáncer	3
2.3 <i>Streptomyces</i> y sus características	3
2.4 Estudios desarrollados en el Desierto de Atacama.....	4
2.5 Potenciales nuevas especies de <i>Streptomyces</i> del Salar de Tara	4
Cultivo de <i>Streptomyces</i>	6
2.6 Marco conceptual de ética.....	8
2.6.1 Actividad tecnocientífica	8
2.6.2 Principio de Responsabilidad	10
2.6.3 Principio Precautorio	10
2.6.4 Declaración de Singapur	11
2.6.5 Ética Profesional.....	12
2.6.6 Cierre marco conceptual	2
3. Objetivos.....	3
3.1 Objetivo general.....	3
3.2 Objetivos específicos	3
4. Metodología	4
4.1 Técnicas de cultivo y mantención de <i>Streptomyces</i>	4
4.2 Prueba pH preliminar	4
4.3 Medio a base de glucosa o almidón	5
4.4 Ajuste de pH y temperatura.....	5
4.5 Cinética de crecimiento.....	7
4.6 Escalamiento a un biorreactor	8
5. Resultados y discusión	11
5.1 Ajuste de pH preliminar y fuente de carbono	11
5.2 Análisis de resultados de parámetros óptimos	12
5.3 Cinética de crecimiento y estado estacionario.....	13
5.4 Evaluación de parámetros en el biorreactor.....	15
5.5 Reflexión ética acerca de la ingeniería en biotecnología	20
6. Conclusiones	22
7. Bibliografía	24
8. Anexos.....	27

8.1 Anexo A. Datos experimentales	27
8.2 Anexo B. Deducción para tasa máxima de crecimiento	29

Índice de Figuras

Figura 1. Árbol filogenético de <i>Streptomyces</i> sp. del Salar de Tara, en azul las cepas estudiadas y en celeste las cepas ya descritas en expediciones anteriores al Desierto de Atacama (Guerrero, S & Riquelme et al., 2017).....	5
Figura 2. Optimización de agitación para minimizar el área proyectada del pellet de <i>Streptomyces livians</i> (Koepff et al., 2017).....	7
Figura 3. Fotografías de cepas estudiadas cultivadas a pH 7 (izquierda), pH 10 (centro) y pH 12 (derecha).....	11
Figura 4. Fotografías de la misma cepa cultivada en un medio a base de glucosa (izquierda) y a base de almidón (derecha). Se puede apreciar una menor esporulación (textura blanca como polvo) del cultivo a base de glucosa.	12
Figura 5. Resultados de biomasa mediante absorbancia de <i>Streptomyces</i> ST2-7A ajustado a pH 9, 10 y 11 a 28°C.....	12
Figura 6. Resultados de biomasa mediante absorbancia de <i>Streptomyces</i> ST2-7A ajustado a pH 9, 10 y 11 a 30°C.....	13
Figura 7. Resultados de biomasa mediante absorbancia de <i>Streptomyces</i> ST2-7A ajustado a pH 9, 10 y 11 a 33°C.....	13
Figura 8. Resultados de biomasa mediante absorbancia de <i>Streptomyces</i> ST2-7A en triplicado en un volumen de 1 mL, ajustado a pH 10 y a 33°C. La línea punteada representa cada triplicado y la línea continua el promedio de estas.	14
Figura 9. Resultados de biomasa mediante absorbancia de <i>Streptomyces</i> ST2-7A en su fase exponencial en triplicado, ajustado a pH 10 y a 33°C. Solo se muestra el promedio de las muestras y su ajuste exponencial de los datos experimentales.	14
Figura 10. Variación del pH en el tiempo del cultivo de <i>Streptomyces</i> ST2-7A en un volumen de 1 L, ajustado a pH inicial de 10, a 33°C y 500 rpm.....	15
Figura 11. Variación de la presión de oxígeno en el tiempo del cultivo de <i>Streptomyces</i> ST2-7A en un volumen de 1 L, ajustado a pH inicial de 10, a 33°C y 500 rpm.....	16
Figura 12. Resultados de biomasa mediante absorbancia de <i>Streptomyces</i> ST2-7A en un volumen de 1 L, ajustado a un pH inicial de 10, a 33°C y 500 rpm.....	16
Figura 13. Resultados de biomasa en su fase exponencial mediante absorbancia de <i>Streptomyces</i> ST2-7A en un volumen de 1 L, ajustado a un pH inicial de 10, a 33°C y 500 rpm. Mostrando un ajuste exponencial a los datos experimentales.....	17
Figura 14. Variación de la presión de oxígeno en el tiempo del cultivo de <i>Streptomyces</i> ST2-7A en un volumen de 1 L, ajustado a pH constante de 10, a 33°C y 500 rpm.....	17
Figura 15. Resultados de biomasa mediante absorbancia de <i>Streptomyces</i> ST2-7A en un volumen de 1 L, ajustado a un pH constante de 10, a 33°C y 500 rpm.	18
Figura 16. Resultados de biomasa en su fase exponencial mediante absorbancia de <i>Streptomyces</i> ST2-7A en un volumen de 1 L, ajustado a un pH constante de 10, a 33°C y 500 rpm. Mostrando un ajuste exponencial a los datos experimentales.....	19
Figura 17. Comparación del crecimiento celular de la cepa ST2-7A a distintos volúmenes y temperaturas. Las siglas S.C es Sin Control y C.C. es Con Control	19

Índice de Tablas

Tabla 1. Tabla con reducción de biomasa de líneas celulares cancerígenas ante extracto crudos de cepas <i>Streptomyces</i> sp. del salar de Tara. El valor positivo (verde) representa aumento del crecimiento celular respecto al inicial, el valor negativo (amarillo, anaranjado y rojo oscuro) representa inhibición del crecimiento celular.....	6
Tabla 2. Radios de pellet y su realación con la velocidad de agitación (Gamboa-Suasnavart et al., 2013).....	8
Tabla 3. Datos experimentales de la absorbancia registrada de la cepa ST2-7A a distintos pHs a 28°C (izquierda), a 30°C (centro) y a 33°C (derecha).	27
Tabla 4. Datos experimentales de la absorbancia registrada de la cepa ST2-7A a 33°C y pH 10, en triplicado (muestras A, B y C), con su promedio y desviación estándar.	27
Tabla 5. Datos experimentales del cultivo de <i>Streptomyces</i> ST2-7A en un volumen de 1 L, ajustado a pH inicial de 10, a 33°C y 500 rpm. Se muestra la variación de pH (izquierda) y presión de oxígeno (derecha).	27
Tabla 6. Datos experimentales de la absorbancia registrada del cultivo de <i>Streptomyces</i> ST2-7A en un volumen de 1 L, ajustado a pH inicial de 10, a 33°C y 500 rpm, fraccionando en 3 la muestra de forma homogénea (muestras A, B y C), con su promedio y desviación.	28
Tabla 7. Datos experimentales del cultivo de <i>Streptomyces</i> ST2-7A en un volumen de 1 L, controlando el pH constante a 10, a 33°C y 500 rpm. Se muestra la variación de presión de oxígeno.....	28
Tabla 8. Datos experimentales de la absorbancia registrada del cultivo de <i>Streptomyces</i> ST2-7A en un volumen de 1 L, controlando el pH constante a 10, a 33°C y 500 rpm, fraccionando en 3 la muestra de forma homogénea (muestras A, B y C), con su promedio y desviación.	28

1. Introducción y motivación

En las últimas dos décadas se ha incrementado la preocupación internacional por el aumento de microorganismos patógenos resistentes a los antibióticos (Cumberland, Chaib, & Bagozzi, 2017), lo cual ha generado incentivos gubernamentales e internacionales en salud pública para intensificar la búsqueda y producción de nuevos antibióticos, en particular los capaces de ser usados como última instancia ante estos patógenos multirresistentes (Talbot et al., 2006).

Además, otra de las preocupaciones de la salud pública es la prevalencia de cáncer en la población, siendo una de las primeras causas de muerte. Se espera que cerca de un 38,4% de la población recibirá un diagnóstico de cáncer en algún momento de sus vidas. El índice general de muertes por cáncer ha disminuido sostenidamente en las últimas 3 décadas, pero la diversidad de tipos de esta enfermedad ha mostrado que el índice de algunos cánceres se ha estabilizado o hasta han aumentado. Esto principalmente asociado al descubrimiento de nuevos tipos de cáncer, como el mayor envejecimiento de la población y prevalencia de hábitos de vida perjudiciales (como el tabaquismo y alcoholismo) (Instituto Nacional del Cáncer, 2018), lo cual incentiva mantener la búsqueda de nuevos compuestos anticancerígenos que contribuyan al combate contra el cáncer.

Uno de los enfoques empleados para encontrar nuevos compuestos bioactivos es estudiar microorganismos de entornos naturales y extremos (Goodfellow & Fiedler, 2010). En particular en el país se han realizado diversas investigaciones en la última década en el Desierto de Atacama, desarrolladas por el Centro de Biotecnología y Bioingeniería (CeBiB, 2018). Los cuales han encontrado nuevas especies de *Actinomicetos* productores de nuevos antibióticos capaces de eliminar bacterias multirresistentes (Okoro et al., 2009) (Busarakam et al., 2014), como también nuevos compuestos anticancerígenos (Elsayed et al., 2015).

Esto motiva la investigación de nuevas cepas de *Streptomyces* encontradas en el Desierto de Atacama, recolectadas de muestras en la última expedición a fines del año 2016 al Salar de Tara. Para ello, durante el año 2017 se realizó un Trabajo Guiado con la Profesora Bárbara Andrews con los microorganismos en cuestión, logrando caracterizar microbiológica (cultivos axénicos) y molecularmente (mediante el gen ribosomal 16S) mostrando su potencial de ser nuevas especies (Guerrero, S & Riquelme et al., 2017).

Por lo anterior, es de interés mejorar y optimizar el cultivo de estos microorganismos, los cuales tienen una lenta tasa de crecimiento y tienden a generar micelios, lo que permite su aglomeración y menor transferencia de nutrientes con el medio, siendo difícil su estudio y posibles escalamientos a nivel industrial. Por lo cual, este trabajo busca contribuir a una nueva metodología para continuar posteriormente el estudio de estas cepas a nivel productivo, una vez alcanzado su máxima masa celular.

Para ello, se estudiarán las distintas modificaciones al medio y condiciones de cultivo, principalmente el diseño del medio de cultivo, temperatura, agitación, niveles de oxígeno

y pH. Además, se realizará una discusión y reflexión ética a partir de los alcances de la investigación realizada, como de la investigación científica como una actividad tecnocientífica y su relación con la ética profesional.

2. Antecedentes

2.1 La búsqueda de nuevos antibióticos

La Organización Mundial de la Salud ha fijado como una de sus prioridades la búsqueda de nuevos antibióticos ante el incremento de microorganismos patógenos resistente a antibióticos. Por ejemplo, la tuberculosis resistente mata alrededor de 250.000 personas cada año, ante la ausencia de tratamientos efectivos, ya que en los últimos 70 años solo se han desarrollado solo 2 nuevos antibióticos capaces de combatir esta enfermedad (Cumberland et al., 2017).

Además de la tuberculosis, ya 12 clases de patógenos han sido catalogado como prioritarios, entre ellos enfermedades más comunes como neumonía e infecciones urinarias. Estos registros se relacionan con el uso indebido de antibióticos en los tratamientos médicos, como el uso intensivo en los sectores ganaderos y agricultores (Cumberland et al., 2017).

Esto ha motivado en la última década distintos incentivos financieros de instituciones gubernamentales e internacionales para priorizar la búsqueda de nuevos antibióticos, como su llegada efectiva al mercado, ya que, al ser antibióticos de última línea, su dosificación es estrictamente controlada y reducida, lo cual genera bajos retornos de inversión (Talbot et al., 2006).

2.2 El combate internacional contra el cáncer

El cáncer es una enfermedad de carácter internacional, el cual tiene 439 casos por cada 100.000 personas a nivel mundial. Además, se prevé que cerca de un 38% de la población recibirá un diagnóstico de cáncer en algún momento de sus vidas (Instituto Nacional del Cáncer, 2018).

Los tumores malignos representan la segunda causa de muerte en Chile, solo detrás de las enfermedades cardiovasculares, con una tasa de mortalidad de 139 por cada 100.000 habitantes. Los tumores más frecuentes, desde un punto de vista de la mortalidad, son de estómago, pulmón, y vesícula. Si bien en conjunto la mortalidad del cáncer en el país ha bajado, estas disminuciones han sido relevantes en los cánceres de esófago, cérvico uterino, entre otros. Sin embargo, otros tipos han aumentado o mantenido su tasa, como son el cáncer de endometrio, colon, pulmón y próstata (Ministerio de Salud, 2016).

Dentro de los factores de riesgo asociados a muertes por cáncer se encuentran malos hábitos de la población, como son el tabaquismo y alcoholismo. Además, se han relacionado también factores dietéticos, como el aumento en el índice de masa corporal, la baja ingesta de frutas y verduras, como la falta de actividad física (Organización Mundial de la Salud, 2018).

2.3 *Streptomyces* y sus características

Las bacterias del género *Streptomyces* pertenecen al filo de las *Actinobacterias* o *Actinomycetos*, son Gram positivas y se encuentran predominantemente en suelos o vegetación. Gran parte de ellas generan filamentos ramificados en forma de micelios, lo que permite una aglomeración natural de los mismos, además, gran parte de ellas son

capaces de generar esporas (Rosenberg, DeLong, Lor, Stackebrandt, & Thompson, 2014).

Se caracterizan por tener un metabolismo secundario complejo, lo que les permite desarrollar una gran y distinta gama de compuestos bioactivos que han sido descritos con actividad antibiótica, antifúngica, anticancerígeno e inmunosupresores. Pocas especies han sido identificadas como patógenas, tanto en humanos como en plantas (Rosenberg et al., 2014).

En las últimas décadas se ha intensificado la investigación y usos de *Streptomyces* para la generación de compuestos terapéuticos, como su capacidad de producir proteínas recombinantes como reemplazo de bacterias más tradicionalmente usadas como *E. coli* o *Bacillus subtilis* (Brawner, Poste, Rosenberg, & Westpheling, 1991).

2.4 Estudios desarrollados en el Desierto de Atacama

El Desierto de Atacama está ubicado al Norte de Chile, con una superficie aproximada de 105.000 km², colindando con el Océano Pacífico y la Cordillera de los Andes. Es considerado el desierto no polar más árido del mundo en su sector central, además de poseer grandes cambios de temperatura entre la noche y el día. Las condiciones descritas permiten que la radiación solar sea muy alta en el lugar, en especial la ultravioleta (Okoro et al., 2009).

Distintas investigaciones se han desarrollado en la búsqueda de nuevas especies microbianas capaces de vivir ante condiciones tan adversas. Un estudio realizado el año 2008 encuentra una gran diversidad de *Actinomicetos* presentes en muestras de tierra (Okoro et al., 2009), mediante la colaboración posterior de distintos investigadores se logran identificar nuevas especies de *Streptomyces* provenientes del Desierto de Atacama, tales como *S. desertii*, *S. bullii*, *S. leeuwenhoekii* y *S. asenjonii* (Busarakam et al., 2014; Goodfellow et al., 2017; Santhanam et al., 2012, 2013).

La más estudiada es la *Streptomyces leeuwenhoekii*, la cual demostró la capacidad de eliminar bacterias multirresistentes a antibióticos como la *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 y *Escherichia coli* ATCC 25922, estos nuevos compuestos bioactivos se caracterizaron y denominaron chaxamicinas A-D (Rateb et al., 2011). También, se encontró un lazo péptido que se denominó chaxapeptina, con actividad anticancerígena contra líneas celulares de cáncer pulmonar humano A549 (Elsayed et al., 2015). Un problema identificado en ambos tipos de metabolitos es que estos son generados en una baja concentración, siendo necesaria una gran cantidad de biomasa para obtener los efectos estudiados.

2.5 Potenciales nuevas especies de *Streptomyces* del Salar de Tara

La última expedición realizada por el CeBiB al Desierto de Atacama en la búsqueda de nuevas especies se realizó a fines del año 2016 en el Salar de Tara. Estas muestras fueron estudiadas en una unidad de investigación compuesta por el estudiante de doctorado Carlos Cortés y los estudiantes de pregrado Sebastián Guerrero y Constanza Riquelme.

Se logró aislar microbiológicamente 18 cepas y caracterizar mediante el gen ribosomal 16S a 9 de estas. Al momento de construir un árbol filogenético con las secuencias moleculares anteriores, mediante los algoritmos de Neighbour Joining y Jukes-Cantor con 1.000 iteraciones de boothstraps, se encontró que todas las cepas molecularmente reconocidas eran del género *Streptomyces* y su pariente filogenético más cercano era el *S. alkaliphilus*, una característica del resultado fue que la divergencia genética fue en un solo conjunto, siendo un potencial nuevo clúster de la especie (Guerrero, S & Riquelme et al., 2017), como se muestra en la siguiente figura.

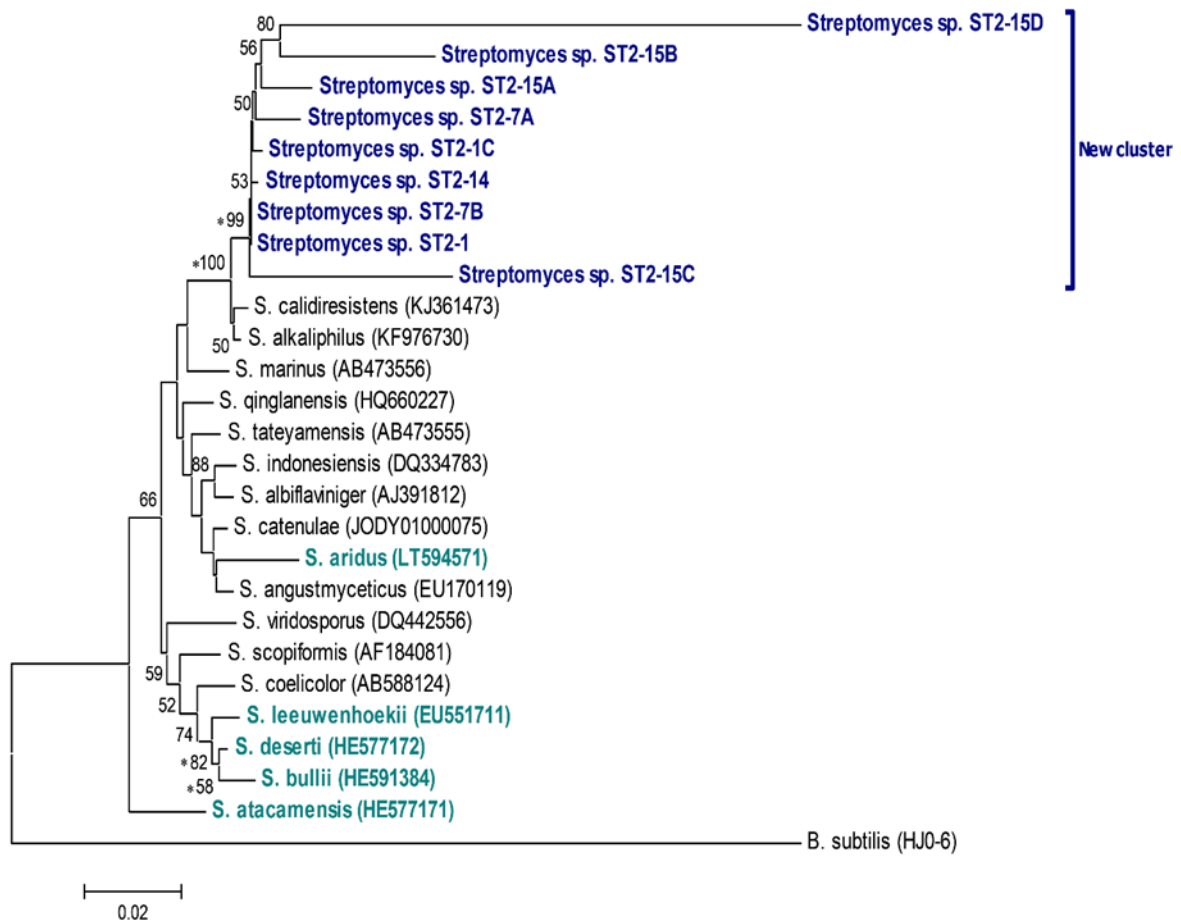


Figura 1. Árbol filogenético de *Streptomyces* sp. del Salar de Tara, en azul las cepas estudiadas y en celeste las cepas ya descritas en expediciones anteriores al Desierto de Atacama (Guerrero, S & Riquelme et al., 2017).

Al estudiar la *Streptomyces alkaliphilus* se encuentra que esta es capaz de crecer a un pH básico (entre 9-11) (Akhwale et al., 2015), lo cual no es común en las especies de *Streptomyces*, pero también ha sido descrito anteriormente por otras investigaciones (Antony-Babu & Goodfellow, 2008). Lo anterior motiva la búsqueda de nuevas características en el crecimiento de las cepas estudiadas, pudiendo alcanzar mejores tasas de crecimiento a un pH alcalino, ya que anteriormente fueron cultivadas a un pH neutro como describía la bibliografía previa de especies encontrados en el Desierto de Atacama.

Además, se realizaron bioensayos de 7 cepas en cuestión contra distintas líneas celulares de cáncer humano, estos se muestran en la Tabla 1, donde la cepa ST2-7A muestra un mejor desempeño al disminuir el crecimiento de células cancerígenas de melanoma, hígado y pulmón. Por otro lado, la cepa ST2-15 D muestra un buen desempeño ante células de hígado, seno y melanoma. Por lo anterior, y para permitir una metodología más expedita ante los tiempos para realizar este trabajo de titulación, se ha escogido la cepa ST2-7A para realizar los distintos estudios de esta memoria.

Tabla 1. Tabla con reducción de biomasa de líneas celulares cancerígenas ante extracto crudos de cepas Streptomyces sp. del salar de Tara. El valor positivo (verde) representa aumento del crecimiento celular respecto al inicial, el valor negativo (amarillo, anaranjado y rojo oscuro) representa inhibición del crecimiento celular.

Nombre cepa	Conc [mg/mL]	Pulmón	Melanoma	Hígado	Seno	Páncreas
ST2-1	200.000	-7	-3	-55	20	1
ST2-7B	200.000	-11	-12	-67	0	2
ST2-14	200.000	-14	-13	-73	12	7
ST2-7A	200.000	-72	-88	-85	-8	0
ST2-15B	200.000	-41	-57	-7	29	-15
ST2-15C	200.000	1	-54	-92	-13	-2
ST2-15D	200.000	-41	-59	-93	-72	-24

Cultivo de *Streptomyces*

Existen distintos antecedentes respecto a las dificultades que poseen los cultivos en estado líquido de *Streptomyces*, donde una de sus causas principales es la aglomeración y la formación de pellets por sus filamentos, lo que genera dificultades en la práctica como:

- Mala transferencia de masa y oxígeno con el medio de cultivo.
- Dificultad en la toma de muestras representativos del cultivo.
- Necesidad de romper pellets mediante técnicas mecánicas agresivas.
- Acumulación de agua y otros compuestos del medio entre sus micelios.

Por lo cual, es difícil obtener cinéticas en estado líquido que sean replicables o consistentes entre sí, solo mediante agentes mecánicos que impidan la aglomeración de las bacterias (polímeros o agitación mecánica) se permiten superar estas dificultades (Koepff et al., 2017).

Distintos trabajos han estudiado realizar micro cultivos de *Streptomyces* y evaluar si las tasas de crecimiento y el comportamiento celular son similares a otras escalas, como alternativas ante las dificultades ya descritas, los beneficios esperados son:

- Un crecimiento celular con baja o controlada aglomeración celular.
- Permite la medición mediante espectrofotometría, en vez de peso seco, lo cual genera resultados más consistentes entre sí (la medición por peso seco puede ser contaminada por compuestos sólidos del medio y perder material volátil).

- Se puede trabajar con todo el cultivo al momento de la medición, lo que permite tener una muestra representativa.

Estos estudios han concluido que la replicabilidad de los datos obtenidos en micro cultivos, en comparación con cultivos a mayor escala (1 L y 4 L) son altos (Koepff et al., 2017; Minas, Bailey, & Duetz, 2001). Se ha podido observar un error de un 1.1% en las etapas de crecimiento celular del cultivo, comparando un reactor de 1 L y micro cultivos de 1 mL, lo cual se corroboró con la medición de OD y pH (Koepff et al., 2017). Esto también se comprobó mediante cultivos de 4 L y micro cultivos de 1 mL, donde se encontraron tasas de máximo crecimiento con menor variación entre los distintos replicados a menor volumen, como tasas similares de producción de metabolitos secundarios a los escalas probadas (Minas et al., 2001).

Un factor clave al realizar cultivos en biorreactores es la agitación utilizada, en estudios previos se ha determinado una correlación inversa entre el diámetro de los agregados filamentosos de *Streptomyces* y las revoluciones por minuto (Gamboa-Suasnavart et al., 2013; Koepff et al., 2017). Como se indican en las siguientes figuras y tablas.

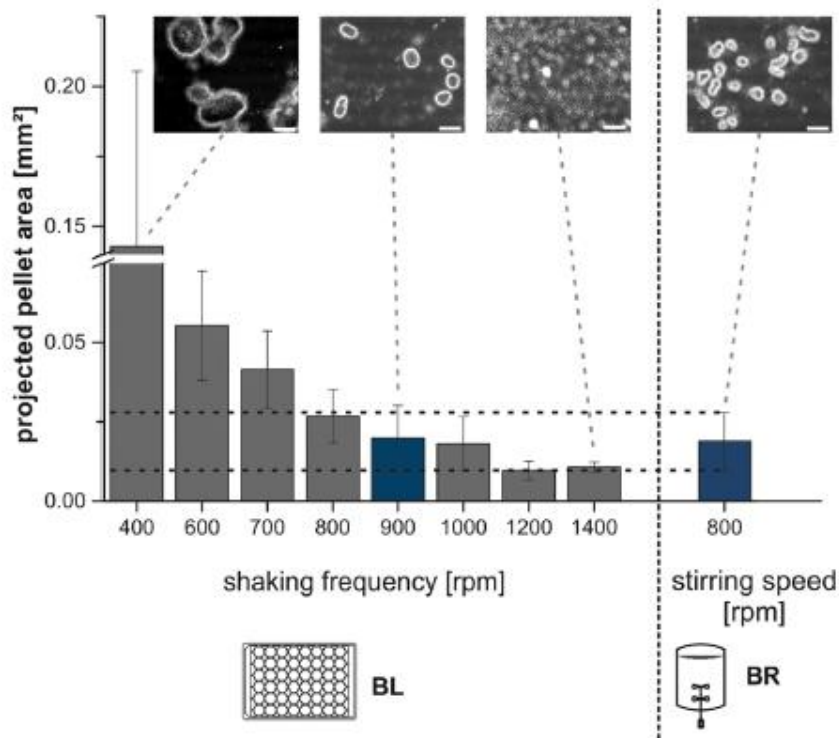


Figura 2. Optimización de agitación para minimizar el área proyectada del pellet de *Streptomyces livians* (Koepff et al., 2017)

Tabla 2. Radios de pellet y su relación con la velocidad de agitación (Gamboa-Suasnavart et al., 2013)

Agitation speed (rev/min)	Data derived from Tough and Prosser			
	Pellet radius (mm)*			
	Exp. Data		Modelled data	
	Mean	SD	Mean	SD
250	ND	ND	0.16	0.034
500	0.12	0.02	0.14	0.031
750	0.09	0.018	0.10	0.038
999	0.06	0.01	0.07	0.032

Por lo anterior, existen experiencias previas que permiten validar la realización de una cinética en micro cultivos, los cuales podrán obtener datos más consistentes entre sí, como su posible replicación en un biorreactor con mejor agitación.

2.6 Marco conceptual de ética

Para realizar una reflexión ética sobre los alcances del trabajo realizado, el contexto en el cual se enmarca y su relación con los fines de la actividad es necesario clarificar el marco conceptual a utilizar. Para ello, se expondrán las temáticas a abordar y su discusión.

2.6.1 Actividad tecnocientífica

La ciencia y la tecnología han sufrido grandes transformaciones en los últimos siglos, desde la entrada a la modernidad y la revolución industrial, y por los desarrollos realizados en el S.XX. (Echeverría, 2003).

Por un lado, tradicionalmente la ciencia posee valores epistémicos, donde la contribución al conocimiento se realiza de una forma “neutral” ante problemáticas morales. De forma análoga, la tecnología se rige por valores técnicos asociados a la eficiencia y la producción de lo útil. Ambos campos del saber convergerían en la revolución industrial europea, donde los desarrollos tecnológicos tendrían mayor impacto al poseer teorías científicas que les permitan sustentarse y mejorar. Además, esta nueva combinación de disciplinas amplía los valores bajo los cuales se desarrolla la investigación y desarrollo.

En esta perspectiva, un punto cúlmine en el desarrollo de la ciencia ocurre en la primera mitad del S.XX. donde las Guerras Mundiales muestran el poderío militar de las naciones con un fuerte desarrollo científico tecnológico. De esta forma, luego de la 2° Guerra Mundial en Estados Unidos se entra en una etapa llamada de Macrociencia (Big Science), que posee las siguientes características (Echeverría, 2003):

- Integración de la ciencia y la tecnología, a nivel de políticas públicas nacionales y universitarias, como de centros de estudios.

- Financiamiento estatal de la actividad científica y tecnológica mediante Políticas de Ciencia y Tecnología (PCyT).
- Enfoque en el desarrollo militar y económico.

Dicho marco llega a su etapa final en la década de los 70, asociado a la derrota sufrida por Estados Unidos en la Guerra de Vietnam y el cuestionamiento público al desarrollo militar y científico. De esta forma en la década de los 80 se genera una nueva relación entre ciencia y tecnología, de forma más intensa hasta una fusión de ambos campos del saber, que se denominará tecnociencia, la cual tendrá las siguientes características (Echeverría, 2003):

- Financiamiento empresarial, cambiando el enfoque militar a uno económico asociado a la innovación, la transferencia tecnológica y su capitalización en el mercado. Esto se verá reflejado en PCyT para que las empresas desarrollen I+D+i mediante rebajas impositivas, como nuevos fondos para centros de estudios.
- Reciprocidad entre ciencia y tecnología, se realiza una fusión de ambas disciplinas al buscar conocimiento útil y a la vez tecnología necesita un sustento científico.
- Empresas tecnocientíficas, al existir financiamiento empresarial para la tecnociencia, nace un mercado asociado no solo a las patentes, sino a la gestión y rentabilización del conocimiento. De esta forma, un valor que se integra es el económico, a veces preponderando más que los valores epistémicos y tecnológicos. Esto se ve reflejado en la investigación (valor epistémico), desarrollo (valor tecnológico) e innovación (valor económico).
- La tecnociencia rompe con el esquema del laboratorio aislado y lo cambia por una conexión de equipos de investigadores, empresas y países. Donde las acciones más elementales comenzarán a estar mediadas por las nuevas tecnologías de información y comunicaciones (TIC), pero sin reemplazar el trabajo tradicional.
- La tecnociencia, en comparación de la ciencia, necesita de las PCyT para desarrollarse y existir, sea público o privado. De esta forma se realiza un vínculo entre la ciencia, la política y el poder, tomando nuevos valores a nivel político y jurídico para poder desenvolverse en este nuevo escenario.

De esta forma, la tecnociencia representa una disciplina pluralista a nivel axiológico y los agentes que la desarrollan, donde no solo bastan científicos e ingenieros, sino abogados, economistas, políticos, humanistas, etc. De esta forma, pasamos del sujeto individual al equipo investigador multidisciplinario, o en estados más complejos y avanzados, inter y transdisciplinarios.

Además, dos valores se integran a nivel axiológico con el pasar las décadas. Por un lado, se tienen los valores sociales, donde el repudio y críticas a la actividad tecnocientífica asociada a la actividad militar en la década de los 70 impone una necesidad de informar y educar a todos los estratos de la sociedad, no solo a las cúpulas que antiguamente tomaban las decisiones, teniendo nuevos controles a niveles de gasto, publicidad y relaciones entre tecnología y sociedad, como también añadiendo nuevos agentes a los equipos multi e interdisciplinarios, como sociólogos, filósofos y profesionales humanistas. Además, en el S.XXI este valor toma relevancia ante los niveles de desigualdad social y

material, los cuales han sido cuestionados, en particular, por el acceso a los productos desarrollados por la tecnociencia y sus avances.

Por otro lado, la naturaleza es vista como un agente pasivo donde las transformaciones sobre ella toman nuevas escalas, por lo cual, la tecnociencia es vista como una amenaza medioambiental, lo que genera diversos grupos organizados contra la tecnología. Esto genera un nuevo estándar para el pluralismo axiológico tecnocientífico de hacer propio los valores ecológicos. La integración de estos valores se ven reflejados en el S.XXI en el enfoque sustentable y sostenible de los nuevos proyectos de ingeniería, donde cada vez más son exigidos como mínimos ante la opinión pública y las comunidades afectadas.

2.6.2 Principio de Responsabilidad

Las éticas desarrolladas en Occidente se han caracterizado por ser antropocéntricas, donde la ética queda circunscrita exclusivamente a las relaciones humanas. Además, se centra en el presente de las acciones y no en un lapso posterior en el futuro, donde ellas y sus consecuencias son dejadas a la fortuna y el azar (Jonas, 1995).

De esta forma, la naturaleza se presenta como un actor pasivo y vulnerable ante las acciones humanas, donde las actuales intervenciones realizadas en ella han tomado una escala global.

Por lo anterior, nace la búsqueda de un nuevo imperativo moral que busque reflexionar ante el impacto de las acciones en lo extrahumano, como además las consecuencias que trae para la misma perpetuación de la especie humana. Como referente se tiene el imperativo categórico desarrollado por el filósofo alemán Kant que dice *“obra sólo según una máxima, tal que puedas querer al mismo tiempo que se torne en ley universal”* (Kant, 1921). De forma análoga, Jonas desarrolla una versión del imperativo categórico, el cual es uno solo, pero se puede formular de las siguientes cuatro formas (Jonas, 1995):

- *“Obra de tal modo que los efectos de tu acción sean compatibles con la permanencia de una vida humana en la Tierra.”*
- *“Obra de tal modo que los efectos de tu acción no sean destructivos para la futura posibilidad de vida.”*
- *“No pongas en peligro las condiciones de la continuidad indefinida de la humanidad en la Tierra.”*
- *“Incluye en tu elección presente, como objeto también de tu querer, la futura integridad del hombre.”*

2.6.3 Principio Precautorio

Durante el S.XIX y S.XX. se han podido constatar diversos daños a personas y el medio ambiente por causa de la actividad humana, como el uso del plomo en la gasolina, el amianto en Europa, entre otros, en todos estos casos existían pocas pruebas científicas a un inicio para prever los daños que producirían, pero con el tiempo aparecieron motivos estaban e hicieron falta voluntades para hacerse cargo de ellas a tiempo.

Por lo anterior, urge definir y consensuar un Principio Precautorio (PP) que sea práctico y logre adecuarse a distintas situaciones. Una definición propuesta es la de la Commission on the Ethics of Scientific Knowledge (2005):

*“Cuando las actividades humanas puedan acarrear un daño **moralmente inaceptable** que es **científicamente plausible**, pero **incierto**, se adoptarán **medidas** para evitar o disminuir ese daño”*

Para ello, es necesario definir algunas palabras clave (Commission on the Ethics of Scientific Knowledge, 2005):

- Un daño moralmente inaceptable consiste en el infligido a seres humanos o al medio ambiente que sea: una amenaza contra la salud o la vida humana, o grave y efectivamente irreversible, o injusto para las generaciones presentes o futuras, o impuesto sin tener debidamente en cuenta los derechos humanos de los afectados.
- El juicio de plausibilidad deberá basarse en un análisis científico, este tendrá que ser permanente de modo que las medidas resueltas puedan reconsiderarse.
- La incertidumbre podrá aplicarse a la capacidad o a los límites del posible daño, pero no se circunscribirá necesariamente a esos elementos.
- Las medidas constituyen intervenciones iniciadas antes de que sobrevenga el daño y que procuran evitarlo o disminuirlo. Siendo medidas proporcionales a la gravedad del daño potencia, tomando en cuenta sus consecuencias negativas y positivas.

Se puede pensar que el PP atenta y frena la innovación o el desarrollo científico, pero este busca en su espíritu tomar en cuenta los daños y el largo plazo de todo desarrollo tecnocientífico, como también abrir un nuevo espacio de innovación centrado en la disminución o evitar perjuicios al medio ambiente, a los seres humanos y futuras generaciones, como son actualmente las energías renovables no convencionales, nuevos medicamentos y procesos sustentables y sostenibles.

También es necesario tomar en cuenta que el PP no significa riesgo cero, sino que apunta a minimizarlos o que sean aceptables bajo estándares basados en la ética, ya que busca ser una norma racional aplicada a procesos complejos, no un algoritmo inapelable. Debiendo ser estudiado caso a caso y quizás pueda ser distinto en cada contexto y situación.

2.6.4 Declaración de Singapur

La investigación científica, como se ha descrito anteriormente, ha buscado en el S.XX. y S.XXI ampliar sus valores epistémicos y ha tomado niveles internacionales, donde la interconexión ha mostrado diferencias entre países y disciplinas. Por lo cual, se han realizado diversos esfuerzos para organizar dicha actividad, como plantear principios y responsabilidades fundamentales que la sustenten.

De esta forma, en la 2° Conferencia Mundial sobre la Integridad en la Investigación del año 2010 en la ciudad de Singapur, se logra generar una guía global para la conducta responsable en la investigación.

De esta, se desprenden 4 principios fundamentales (2° Conferencia Mundial sobre Integridad en la Investigación, 2010):

- *“Honestidad en todos los aspectos de la investigación.”*
- *“Responsabilidad en la ejecución de la investigación.”*
- *“Cortesía profesional e imparcialidad en las relaciones laborales.”*
- *“Buena gestión de la investigación en nombre de otros.”*

Además, se desprenden 13 responsabilidades que todo investigador debe considerar y promover (2° Conferencia Mundial sobre Integridad en la Investigación, 2010):

- | | |
|---|---|
| 1. Integridad | 9. Conflictos de intereses. |
| 2. Cumplimiento de Normas | 10. Comunicación pública. |
| 3. Métodos de investigación | 11. Denuncia de prácticas irresponsables en la investigación. |
| 4. Documentación de la investigación. | 12. Respuesta a prácticas irresponsables en la investigación. |
| 5. Resultados de la investigación. | 13. Ambiente para la investigación. |
| 6. Autoría. | 14. Consideraciones sociales. |
| 7. Reconocimiento en las publicaciones. | |
| 8. Revisión por pares. | |

A pesar de no ser un documento regulador o políticas oficiales de los países que suscriban a dicha declaración, se mantiene como eje rector para la investigación científica y abre las puertas para futuras mejoras para seguir elevando los estándares de la investigación.

2.6.5 Ética Profesional

En primera instancia, antes de hablar sobre ética profesional es necesario definir qué se entiende por actividad profesional. De entre las muchas acepciones de la misma, se utilizará en este trabajo la que considera las siguientes características (Cortina, 2006):

- Una profesión es una actividad humana social, mediante la cual se presta un servicio específico a la sociedad y de forma institucionalizada. Este servicio debe ser único, claramente definido e indispensable para la sociedad.
- La profesión se considera una vocación y misión, por lo que se espera que el profesional se entregue a esta e invierta su tiempo libre para prepararse para ejercer la tarea encomendada, siendo esta preparación lo más actualizada posible.
- Los profesionales pueden formar colectivos que buscan tener el control sobre el ejercicio de la actividad, cerciorando la certificación académica de sus miembros y velando por quienes pueden ejercerla.
- Para acceder al ejercicio de la profesión se debe pasar por un largo proceso de capacitación teórica y práctica, estudios reglados que deben acreditar o dar una licencia a la persona para ejercer.

De esta forma, las profesiones como prácticas humanas poseen ciertos valores y fines sin los cuales no se podrían definir la profesión en particular. Estos valores y fines serán denominados “bienes internos”, los cuales le dan legitimidad social y no buscan generar un producto, puesto que son lo que define a la actividad de la que se trate, y son un fin en sí mismos. Además, existen otros aspectos de la actividad profesional que no son o

debiesen ser la parte esencial de dicha práctica, pero sin los cuales no sería posible ejercer, estos se denominarán “bienes externos”, como son un salario o remuneración, fama o prestigio, etc. (Macintyre, 1987) (Cortina, 2006)

Estos bienes internos y externos fundan una definición teleológica de la ética profesional, donde en función de fines (*télos*) se puede realizar una caracterización de la actividad profesional como una actividad social, donde se tienen tres agentes principales: profesional, los beneficiarios directos (clientes, pacientes, etc) y la sociedad. Donde será este último, en conjunto con las instituciones colegiadas de profesionales, los que realizarán una actualización de dichos fines ante los cambios que surjan de la conciencia moral de cada época y contexto (Cortina, 2006).

2.6.6 Cierre marco conceptual

Al leer y estudiar los contenidos ya descritos, se puede apreciar como la biotecnología es parte del desarrollo tecnocientífico, dado que los alcances de la investigación realizada buscan la producción de un conocimiento que sea útil para grandes problemas que aquejan a la sociedad contemporánea. Además, un análisis a nivel de los valores que presenta dicha actividad es complejo y plural, donde la ética y la responsabilidad son criterios a integrar a la ingeniería y ciencias. De esta forma, se realizará una reflexión y discusión utilizando los elementos trabajados en este marco conceptual.

3. Objetivos

3.1 Objetivo general

El objetivo principal de la memoria es:

- Estudiar el aumento teórico y experimental del crecimiento celular de *Streptomyces sp.* del Salar de Tara mediante el desarrollo de mejoras en sus condiciones de cultivo a nivel de laboratorio y biorreactor. Además, a partir de los alcances de la investigación, realizar una reflexión ética de la profesión y la investigación científica.

3.2 Objetivos específicos

Los objetivos específicos son:

- Estudiar modificaciones y diseño del medio de cultivo de *Streptomyces sp.* del Salar de Tara para aumentar su crecimiento celular.
- Analizar ajustes a las condiciones de cultivo, como temperatura, agitación, nivel de oxígeno y pH de *Streptomyces sp.* del Salar de Tara para aumentar su crecimiento celular.
- Estudiar y ajustar las modificaciones al medio y condiciones de cultivo al escalar de un volumen a nivel de laboratorio a un biorreactor de 1 litro.
- A partir de los alcances de la investigación realizada como una actividad biotecnológica, realizar una discusión y reflexión ética.

4. Metodología

4.1 Técnicas de cultivo y mantención de *Streptomyces*

Para realizar una correcta mantención de la cepa, es necesaria mantener inóculos activos para posteriores usos, como resguardarla para futuro. Para ello, se realiza la siguiente metodología genérica.

Materiales:

- Placas de SCA ajustado a pH (Kuster & Williams, 1964).
- Inóculo previo de la cepa ST2-7^a.
- Asa calibrada de 0,01 mL.
- Pipetas Pasteur.
- Mechero.
- Campana de flujo laminar.
- Estufa para cultivo.

Pasos a seguir:

1. Preparar placas con medio sólido de almidón y caseína (SCA), ajustadas a un pH óptimo.
2. Inocular cada placa con un inóculo, dependiendo si es medio líquido o sólido el inóculo original:
 - a. Si proviene de un medio líquido, tomar muestra con asa calibrada y distribuir en la placa con una pipeta pasteur.
 - b. Si proviene de un medio sólido, tomar muestra con asa calibrada y distribuir con la misma asa.
3. Poner las placas a 30°C, sin agitación.
4. Esperar 10 días y observar el crecimiento celular y la esporulación, si el crecimiento es aceptable, resguardar a 4°C.

4.2 Prueba pH preliminar

Para probar la relación de los resultados moleculares obtenidos, donde se relacionó filogenéticamente la *S. alkaliphilus* con las estudiadas, se realiza una prueba preliminar para verificar el comportamiento alcalófilo de estas.

Materiales:

- Placas de SCA a pH 7, 10 y 12 (Kuster & Williams, 1964).
- Inóculo previo de la cepa ST2-7A.
- Pipeta de 1.000 uL.
- Pipetas Pasteur.
- Mechero.
- Campana de flujo laminar.
- Estufa para cultivo.

Pasos a seguir:

1. Preparar placas con medio sólido de almidón y caseína (SCA), dividir el grupo en 3, ajustando uno a pH 7, otro a pH 10 y el último a pH12.
2. Inocular una placa de cada medio a cada pH con una cepa a estudiar.
3. Poner las placas a 30°C, sin agitación.
4. Esperar 10 días y observar el crecimiento celular y la esporulación.

4.3 Medio a base de glucosa o almidón

Para conocer el carbohidrato que podría ser óptimo para mantener y cultivar las cepas estudiadas, entendiéndose permitir un crecimiento celular abundante y la generación de esporas, se realizará el siguiente experimento.

Materiales:

- Placas de SCA (Kuster & Williams, 1964).
- Placas de Horikoshi-1 (Culture, 2007).
- Inóculo previo de la cepa ST2-7A.
- Pipeta de 1.000 uL.
- Pipetas pasteur.
- Mechero.
- Campana de flujo laminar.
- Estufa para cultivo.

Pasos a seguir:

1. Preparar placas con medio sólido de almidón-caseína (SCA) y a base de glucosa para especies alcalinas (Horikoshi-1), ambos ajustado al pH óptimo de la prueba anterior.
2. Inocular una placa de cada medio con una cepa a estudiar.
3. Poner las placas a 30°C, sin agitación.
4. Esperar 10 días y observar el crecimiento celular y la esporulación.

4.4 Ajuste de pH y temperatura

Para conocer las mejores condiciones de crecimiento, es necesario conocer el pH y temperaturas óptimas que permiten un mayor crecimiento celular. Para ello, se realizará el siguiente experimento.

Materiales:

- Tubos de 1,5 mL estériles.
- Agua miliQ estéril.
- Inóculo en cultivo sólido.
- Vórtex.
- Parafilm.
- Medio de cultivo de triptona de soya estéril (Goodfellow & Fiedler, 2010).
- Inóculo previo de la cepa ST2-7A.

- Thermoshaker.
- Congelador a -80°C.
- Estufa a 60°C.
- Centrífuga.
- Baño de ultrasonido.
- Espectrofotómetro.

Procedimiento para inocular:

1. Usando un cultivo en estado sólido con buena esporulación (mínimo 10 días a 30°C), usar 2 mL de agua miliQ estéril y raspar el cultivo con cuidado para obtener las esporas.
2. Depositar las esporas en un tubo de 1,5 mL, centrifugar a 14.000 rpm durante 5 minutos.
3. Descartar sobrenadante y lavar en 1 mL de agua miliQ estéril, centrifugar 14.000 rpm durante 5 minutos.
4. Descartar con cuidado alrededor de 0,25 mL del agua estéril.
5. Homogeneizar el stock obtenido mediante vórtex y agitación manual.
6. Preparar 24 tubos de 1,5 mL con 500 uL de medio de cultivo (triptona de soya) a pH9, pH10 y pH11.
7. Inocular 25 uL del stock de esporas a cada tubo.
8. Cubrir con Parafilm la tapa de cada tubo y disponer en un thermoshaker a 250 rpm a 28°C por 30 horas.
9. Extraer un tubo cada 2 horas y congelar a -80°C.

Procedimiento de análisis de muestras:

1. Descongelar las muestras (se recomienda utilizar una estufa).
2. Homogeneizar mediante vórtex y agitación manual.
3. Centrifugar a 14.000 rpm durante 5 minutos.
4. Descartar con cuidado el sobrenadante y agregar 1 mL de agua miliQ estéril a cada muestra.
5. Homogeneizar mediante vórtex y agitación manual.
6. Centrifugar a 14.000 rpm durante 5 minutos.
7. Descartar con cuidado el sobrenadante y agregar 1 mL de agua miliQ estéril a cada muestra.

8. Homogenizar mediante ultrasonido durante 15 minutos aproximadamente las muestras, hasta verificar visualmente que el pellet se haya disuelto correctamente.
9. Medir absorbancia a 600 nm usando como blanco agua miliQ estéril.

Luego, repetir el mismo procedimiento anterior, pero cultivando a 30°C y 33°C.

4.5 Cinética de crecimiento

Materiales:

- Tubos de 1,5 mL estériles.
- Agua miliQ estéril.
- Inóculo en cultivo sólido.
- Vórtex.
- Parafilm.
- Medio de cultivo de triptona de soya estéril (Goodfellow & Fiedler, 2010).
- Thermoshaker.
- Congelador a -80°C.
- Centrífuga.
- Baño de ultrasonido.
- Espectrofotómetro.

Procedimiento para inocular:

1. Usando un cultivo en estado sólido con buena esporulación (mínimo 7 días a 30°C), usar 2 mL de agua miliQ estéril y raspar el cultivo con cuidado para obtener las esporas.
2. Depositar las esporas en un tubo de 1,5 mL, centrifugar a 14.000 rpm durante 5 minutos.
3. Descartar sobrenadante y lavar en 1 mL de agua miliQ estéril, centrifugar 14.000 rpm durante 5 minutos.
4. Descartar con cuidado alrededor de 0,25 mL del agua estéril.
5. Homogeneizar el stock obtenido mediante vórtex y agitación manual.
6. Preparar tubos de 1,5 mL con 500 uL de medio de cultivo (triptona de soya y al pH óptimo anterior).
7. Inocular 25 uL del stock de esporas a cada tubo.
8. Cubrir con Parafilm la tapa de cada tubo y disponer en un thermoshaker a 250 rpm a la temperatura óptima anterior por 30 horas.
9. Extraer un tubo cada 2 horas y congelar a -80°C.

Procedimiento de análisis de muestras:

1. Descongelar las muestras (se recomienda utilizar una estufa).
2. Homogeneizar mediante vórtex y agitación manual.
3. Centrifugar a 14.000 rpm durante 5 minutos.
4. Descartar con cuidado el sobrenadante y agregar 1 mL de agua miliQ estéril a cada muestra.
5. Homogeneizar mediante vórtex y agitación manual.
6. Centrifugar a 14.000 rpm durante 5 minutos.
7. Descartar con cuidado el sobrenadante y agregar 1 mL de agua miliQ estéril a cada muestra.
8. Homogenizar mediante ultrasonido durante 15 minutos aproximadamente las muestras, hasta verificar visualmente que el pellet se haya disuelto correctamente.
9. Medir absorbancia a 600 nm usando como blanco agua miliQ estéril.

4.6 Escalamiento a un biorreactor

Para concluir los experimentos anteriores, se escala el grupo de cepas a estudiar con las condiciones óptimas encontradas a un biorreactor de 1 litro. Para ello se realizan 2 experimentos.

Materiales:

- Matraz de 250 mL estéril.
- Agua miliQ estéril.
- Inóculo en cultivo sólido.
- Vórtex.
- Medio de cultivo de triptona de soya (Goodfellow & Fiedler, 2010).
- Equipo de cultivo BIOSTAT®B.
- Fermentador de 1,5 L de BIOSTAT®B.
- Medidores de T°, Oxígeno y pH de BIOSTAT®B para volumen de 1,5 L.
- Solución de NaOH a 2 M.
- Tubos de 15 mL estériles.
- Congelador a -80°C.
- Tubos de 1,5 mL estériles.
- Centrífuga.
- Baño de ultrasonido.
- Espectrofotómetro.

Procedimiento para el Precultivo:

1. Usando un cultivo en estado sólido con buena esporulación (mínimo 10 días a 30°C), usar 5 mL de agua miliQ estéril y raspar el cultivo con cuidado para obtener las esporas.

2. Depositar las esporas en tubos de 1,5 mL, centrifugar a 14.000 rpm durante 5 minutos.
3. Descartar los sobrenadantes y lavar en 1 mL de agua miliQ estéril, centrifugar 14.000 rpm durante 5 minutos.
4. Homogeneizar el stock obtenido mediante vórtex y agitación manual.
5. Preparar matraz de 250 ml con 45 mL de medio de cultivo (triptona de soya y pH10).
6. Inocular 5 mL del stock de esporas e inocular matraz con 45 mL de medio de cultivo.
7. Cultivar a 300 rpm a 30°C por 16 horas.

Cultivo en el biorreactor:

1. Preparar un biorreactor de 1,5 L con 950 ml de medio de cultivo (triptona de soya y pH10).
2. Programar agitación en 500 rpm con aireación de 1,0 l/min, sin control de pH.
3. Inocular los 50 ml de Precultivo cuidadosamente al reactor.
4. Tomar dos muestras de 5 ml cada una, cada 2 horas y congelar muestras, además de registrar parámetros de T°, pH y pO₂.
5. Una vez que se observa el inicio de la fase exponencial, tomar muestras cada 1 hora. Luego, mantener la frecuencia anterior.

Procedimiento de análisis de muestras:

1. Descongelar las muestras (se recomienda utilizar una estufa).
2. Homogeneizar mediante vórtex y agitación manual.
3. Extraer 3 mL de la muestra y dispensar 1 mL en cada microtubo de 1,5 mL.
4. Centrifugar a 14.000 rpm durante 5 minutos.
5. Descartar con cuidado el sobrenadante y agregar 1 mL de agua miliQ estéril a cada muestra.
6. Homogeneizar mediante vórtex y agitación manual.
7. Centrifugar a 14.000 rpm durante 5 minutos.
8. Descartar con cuidado el sobrenadante y agregar 1 mL de agua miliQ estéril a cada muestra.
9. Homogenizar mediante ultrasonido durante 15 minutos aproximadamente la muestra, hasta verificar visualmente que el pellet se haya disuelto correctamente.

10. Medir absorbancia a 600 nm usando como blanco agua miliQ estéril.

Repetir experimento, pero controlando el pH del cultivo usando como referencia el pH óptimo anterior, usando una base de NaOH para mantener dicho parámetro.

5. Resultados y discusión

5.1 Ajuste de pH preliminar y fuente de carbono

Al realizar una prueba de pH preliminar en placas de SCA en estado sólido se encontró una clara tendencia a un crecimiento más abundante y con mayor esporulación a pH 10 en todas las cepas, aunque ambas variables se midieron de una forma cualitativa. Esto se puede corroborar en las siguientes fotografías de algunas de los microorganismos estudiados.



Figura 3. Fotografías de cepas estudiadas cultivadas a pH 7 (izquierda), pH 10 (centro) y pH 12 (derecha).

Al probar medios en estado sólido con distinta fuente de carbono (SCA con almidón y Horikoshi con glucosa) se encontró un crecimiento celular similar, pero con una baja esporulación en el medio a base de glucosa, lo cual no es óptimo para la correcta mantención de *Streptomyces*, al necesitar la generación de esporas para su cultivo y almacenamiento. Nuevamente, estos resultados fueron observados de forma cualitativa, como se puede corroborar en las siguientes fotografías. Una hipótesis para dicho comportamiento es que el almidón podría ser una fuente de carbono que genera mayor estrés celular que la glucosa, lo que conlleva a que las bacterias deban esporular para supervivencia.

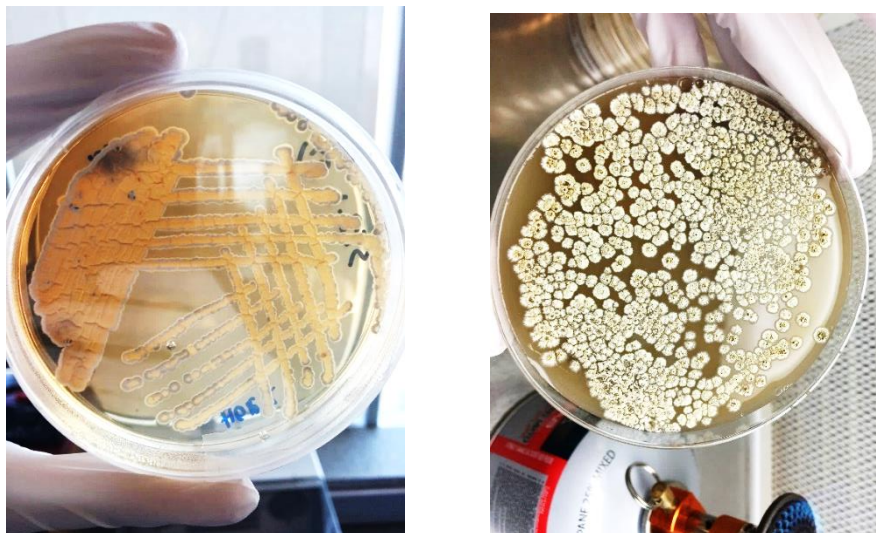


Figura 4. Fotografías de la misma cepa cultivada en un medio a base de glucosa (izquierda) y a base de almidón (derecha). Se puede apreciar una menor esporulación (textura blanca como polvo) del cultivo a base de glucosa.

5.2 Análisis de resultados de parámetros óptimos

Al realizar el estudio paralelo para encontrar el pH y temperaturas óptimas se pudo registrar el crecimiento celular mediante la cuantificación de su biomasa mediante absorbancia como se muestra en los siguientes gráficos. Es importante aclarar que los puntos que no aparecen en los gráficos son por inconsistencias al momento de medirlos, pudiendo ser tubos mal o sin inocular (los datos experimentales se pueden apreciar en el Anexo A).

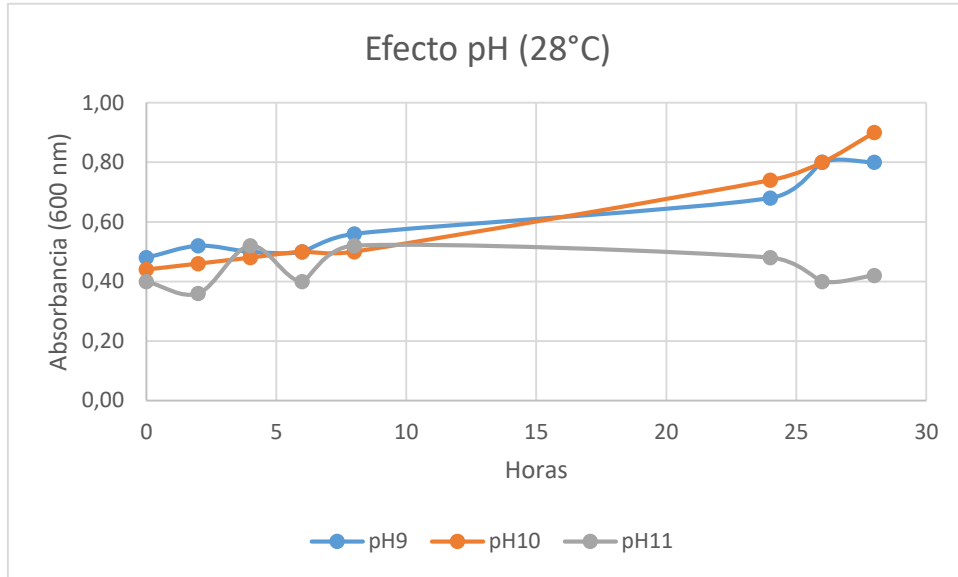


Figura 5. Resultados de biomasa mediante absorbancia de *Streptomyces ST2-7A* ajustado a pH 9, 10 y 11 a 28°C.

Se puede observar que se alcanza un mayor crecimiento final de biomasa a 33°C, por otro lado, el pH óptimo pareciera estar entre 9 y 10 a 28°C y 30°C, pero a 33°C se aprecia

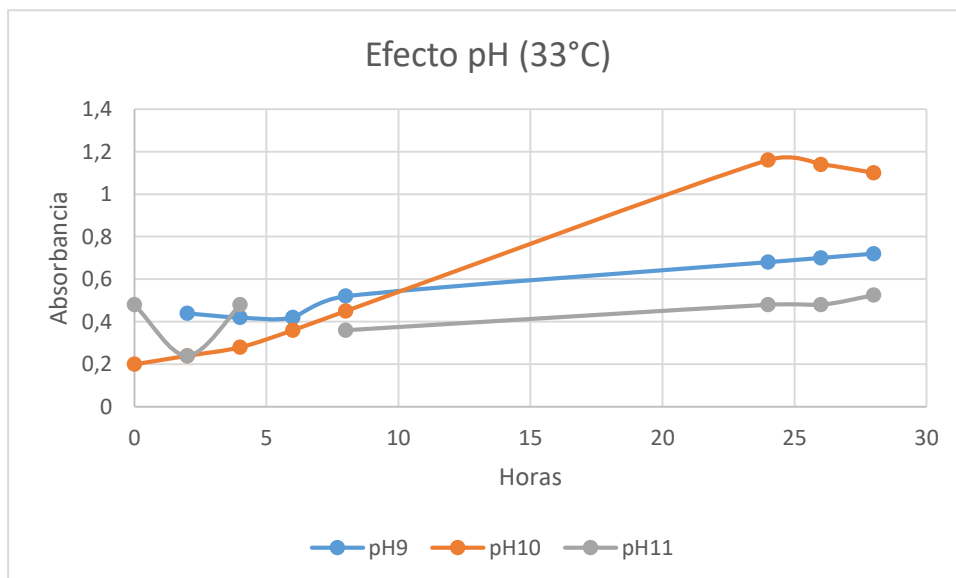


Figura 6. Resultados de biomasa mediante absorbancia de *Streptomyces* ST2-7A ajustado a pH 9, 10 y 11 a 30°C.

un crecimiento casi 2 veces mayor a pH 10, además de una fase lag casi nula, lo que permite alcanzar el estado estacionario en menor tiempo. Por lo cual, las mejores condiciones de cultivo son a 33°C y a pH 10.

5.3 Cinética de crecimiento y estado estacionario

Se realizó un cultivo a 33°C y el medio ajustado a pH 10, según se describe en la metodología. En esta oportunidad, se pudo trabajar con triplicados cada muestra, lo que permitió visualizar una baja variación entre una muestra con otra en el mismo intervalo de tiempo.

En los siguientes gráficos se puede apreciar la biomasa obtenida mediante su absorbancia, en línea punteada cada triplicado y en línea continua el promedio de estas. Además, se ha aislado la fase exponencial para calcular su tasa máxima de crecimiento ($\mu_{m\acute{a}x}$) (los datos experimentales se pueden apreciar en el Anexo A).

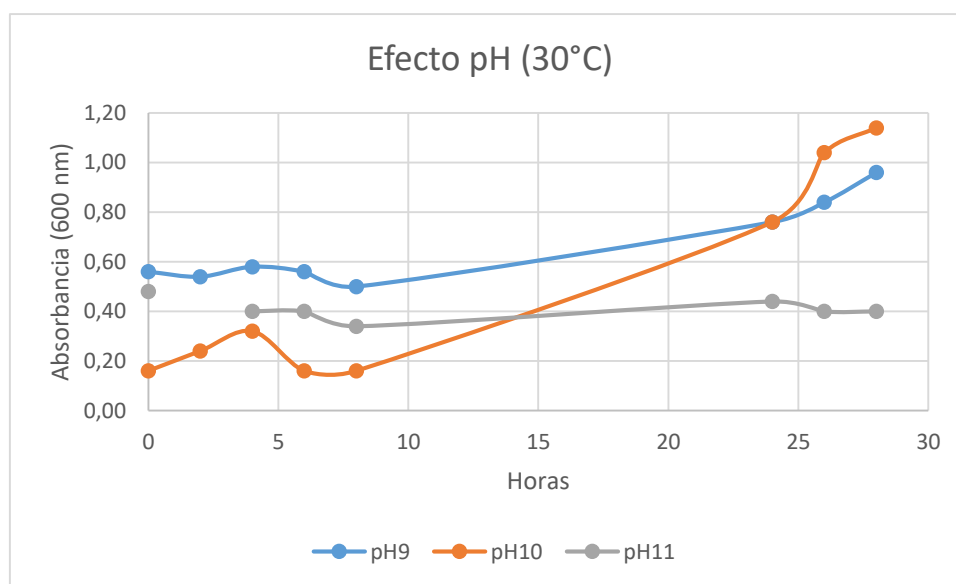


Figura 7. Resultados de biomasa mediante absorbancia de *Streptomyces* ST2-7A ajustado a pH 9, 10 y 11 a 33°C.

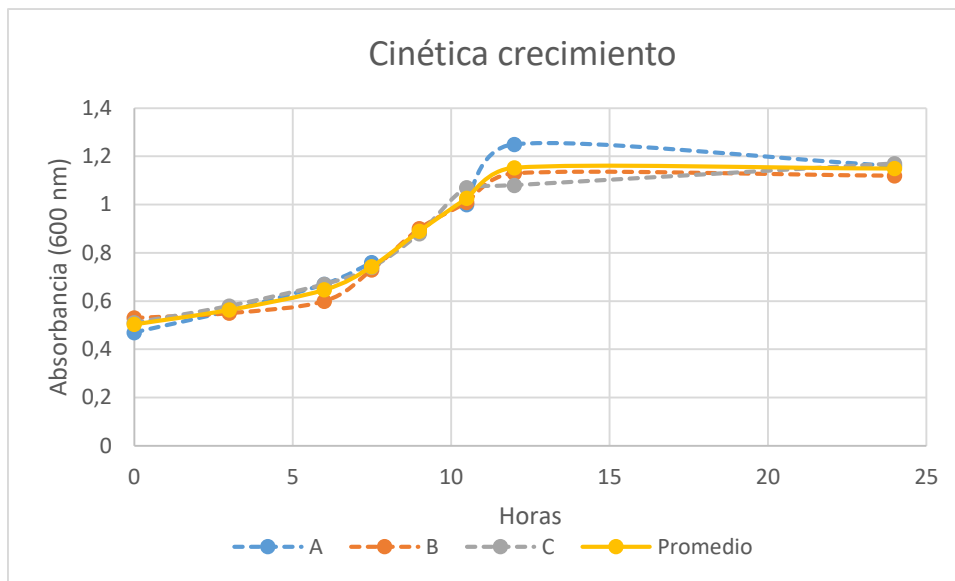


Figura 8. Resultados de biomasa mediante absorbancia de *Streptomyces* ST2-7A en triplicado en un volumen de 1 mL, ajustado a pH 10 y a 33°C. La línea punteada representa cada triplicado y la línea continua el promedio de estas.

Se puede ver que la fase exponencial dura 12 horas, lo que se puede corroborar al ver que se mantiene la biomasa en la muestra 24 horas, lo cual significa que logra alcanzar el estado estacionario en medio día. Para calcular la tasa máxima de crecimiento, se realizó el siguiente cálculo (la deducción de dicha expresión puede verse en el Anexo B)

$$x = x_0 \cdot e^{\mu_{\max} \cdot t} \rightarrow y = y_0 \cdot e^{m \cdot x}$$

$$m = \mu_{\max}$$

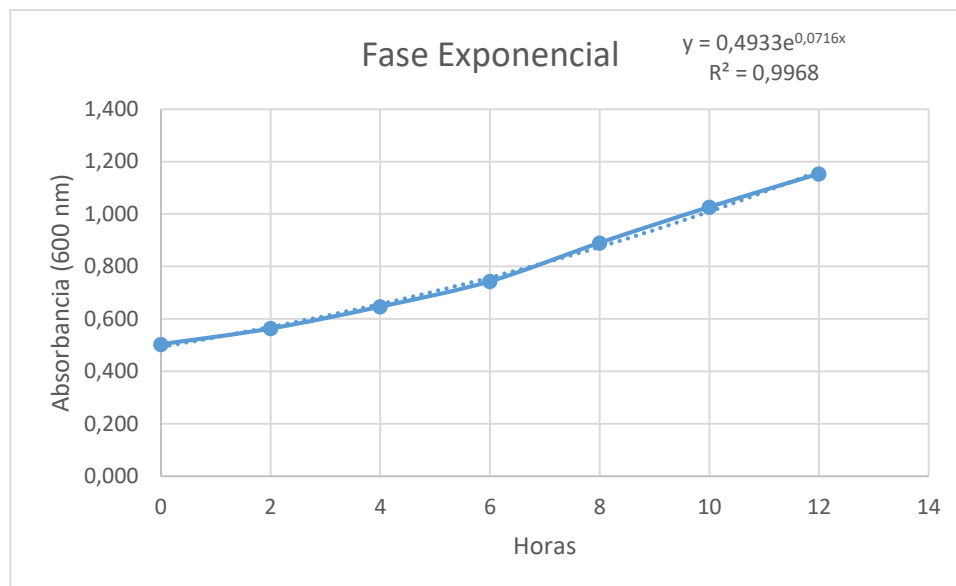


Figura 9. Resultados de biomasa mediante absorbancia de *Streptomyces* ST2-7A en su fase exponencial en triplicado, ajustado a pH 10 y a 33°C. Solo se muestra el promedio de las muestras y su ajuste exponencial de los datos experimentales.

De esta forma, $\mu_{m\acute{a}x} = 0,072 [1/h]$ con un error de $R^2 = 0,997$. Además, se alcanza una absorbancia similar al experimento para probar el pH10 a 33C, lo que reafirma los resultados obtenidos.

5.4 Evaluación de parámetros en el biorreactor

Al momento de escalar el cultivo al biorreactor, se realiza en primer lugar solo el control de la agitación y temperatura, al igual que al cultivarlo en un volumen de 1 mL, pero es importante destacar que se pueden ajustar las variables de forma más directa, ya que la temperatura se mide mediante una termocupla al interior del reactor y la agitación es mecánica mediante una hélice, en cambio, a menor escala, el equipo regula ambas variables de forma externa al cultivo, midiendo en la placa donde son introducidos los tubos. Por otro lado, se pudo registrar la variación de pH y presión de oxígeno, que arroja en tiempo real el equipo, ambos se pueden ver en los siguientes gráficos.

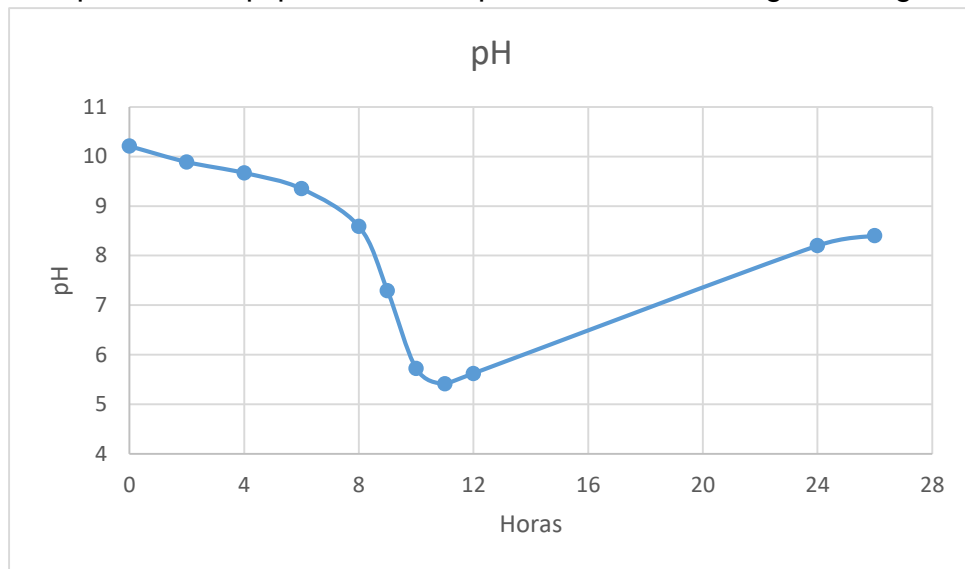


Figura 10. Variación del pH en el tiempo del cultivo de *Streptomyces* ST2-7A en un volumen de 1 L, ajustado a pH inicial de 10, a 33C y 500 rpm.

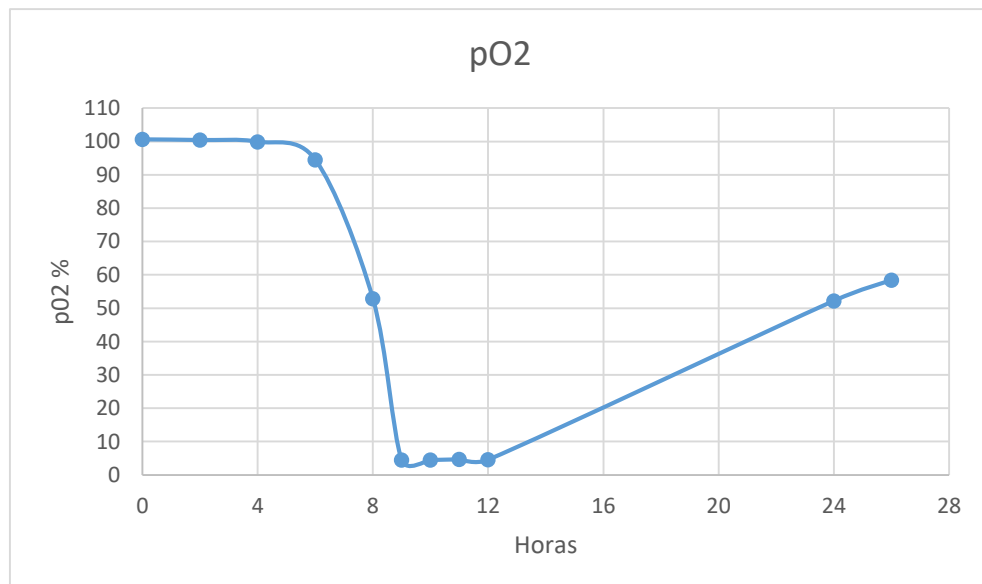


Figura 11. Variación de la presión de oxígeno en el tiempo del cultivo de *Streptomyces ST2-7A* en un volumen de 1 L, ajustado a pH inicial de 10, a 33°C y 500 rpm.

Al estudiar la variación de pH, se puede observar que se mantiene bajando de forma gradual hasta la 6ª hora, a partir de la cual empieza a descender a una tasa más acelerada hasta marcar un pH 5,4 en el equipo. Un comportamiento similar se observa en la presión de oxígeno, manteniéndose estable y bajando de forma acelerada a partir de la hora 6, llegando hasta un 4,5% en el equipo.

Al complementar los gráficos anteriores con la biomasa registrada mediante absorbancia, se puede ver en los siguientes gráficos como el descenso en el pH y el oxígeno ocurren al mismo tiempo que la fase exponencial del crecimiento, estancándose al llegar a la fase estacionaria.

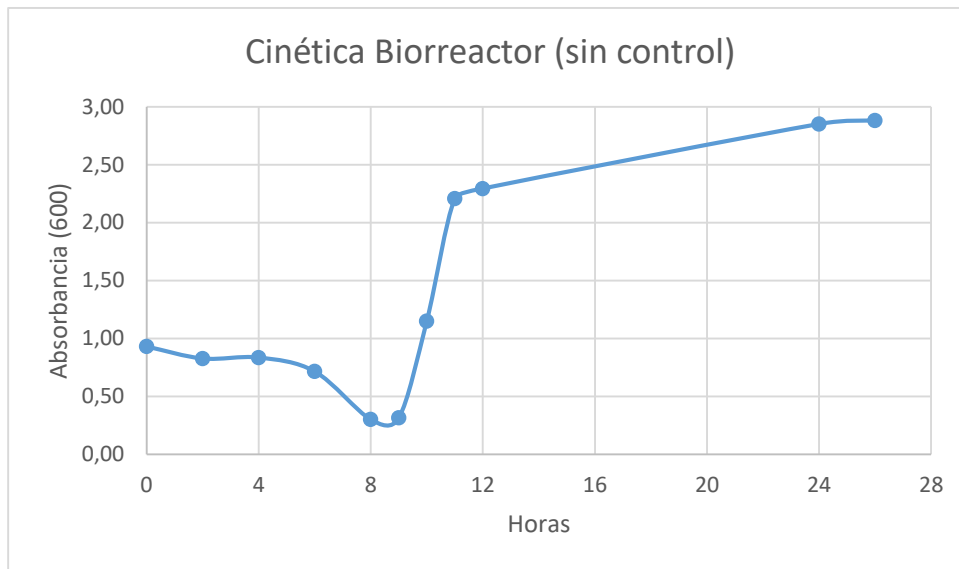


Figura 12. Resultados de biomasa mediante absorbancia de *Streptomyces ST2-7A* en un volumen de 1 L, ajustado a un pH inicial de 10, a 33°C y 500 rpm.

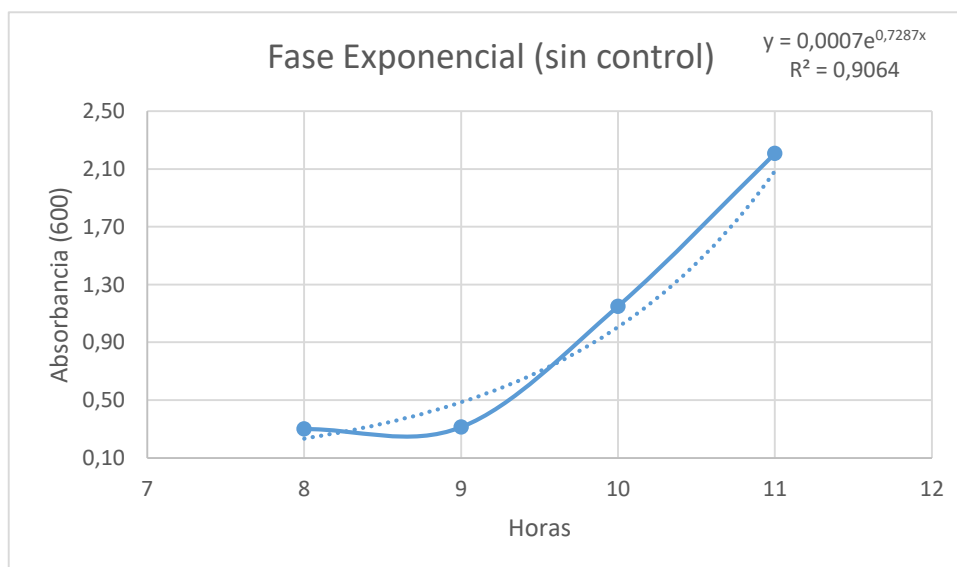


Figura 13. Resultados de biomasa en su fase exponencial mediante absorbancia de *Streptomyces* ST2-7A en un volumen de 1 L, ajustado a un pH inicial de 10, a 33°C y 500 rpm. Mostrando un ajuste exponencial a los datos experimentales.

Al estudiar las diferencias del cultivo en el biorreactor versus el cultivo a menor escala se puede observar que la duración de la fase exponencial se reduce en 1/4, pasando de 12 horas a 3. Además, se alcanza una biomasa casi el doble de la obtenida a menor volumen, lo que también se ve reflejado en la tasa máxima de crecimiento, con un $\mu_{m\acute{a}x} = 0,729 [1/h]$ con un error de $R^2 = 0,906$, 10 veces mayor que la anterior.

Al realizar una nueva fermentación pero controlando el pH del cultivo a 10 con una base de NaOH, ya que el pH desciende de forma sostenida y además tener un ácido y base en estas características puede confundir al equipo, se obtiene una variación nula del pH, por lo cual no se grafica. Por otro lado, la variación de presión de oxígeno presenta una variación leve en el tiempo, muy baja durante las primeras 12 horas de cultivo y solo baja una vez pasado un día, este comportamiento se ve reflejado en el siguiente gráfico.

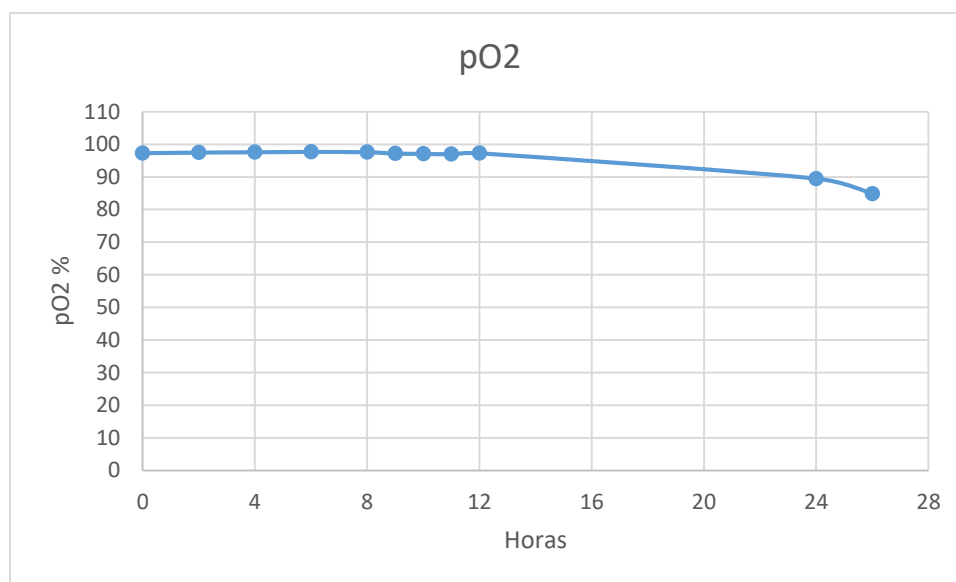


Figura 14. Variación de la presión de oxígeno en el tiempo del cultivo de *Streptomyces* ST2-7A en un volumen de 1 L, ajustado a pH constante de 10, a 33°C y 500 rpm.

Al estudiar la biomasa del biorreactor mediante su absorbancia, se puede observar en el siguiente gráfico una fase exponencial similar a la anterior, donde baja la biomasa y luego sube, durando 3 horas hasta la fase estacionaria, con un $\mu_{m\acute{a}x} = 0,165 [1/h]$ con un error de $R^2 = 0,939$.

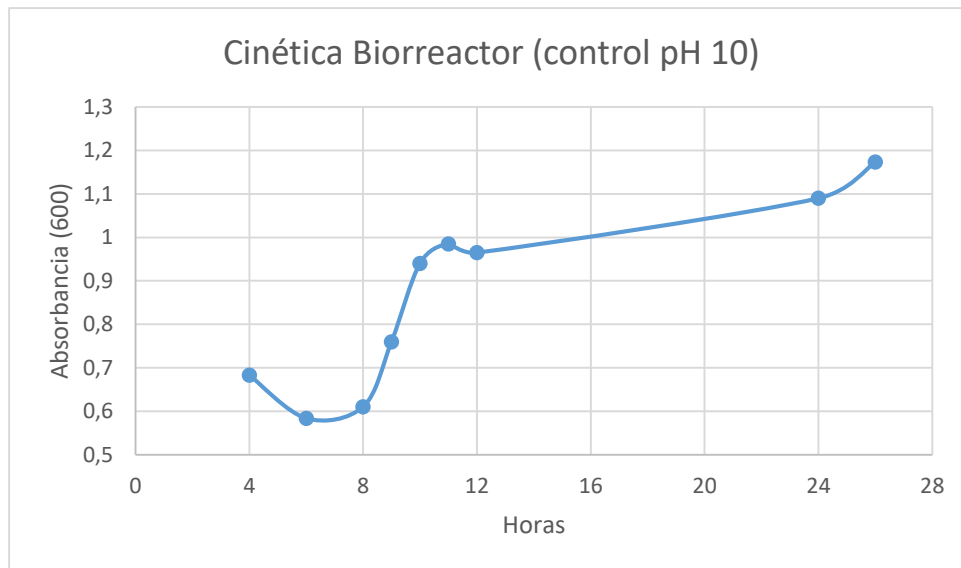


Figura 15. Resultados de biomasa mediante absorbancia de *Streptomyces ST2-7A* en un volumen de 1 L, ajustado a un pH constante de 10, a 33°C y 500 rpm.

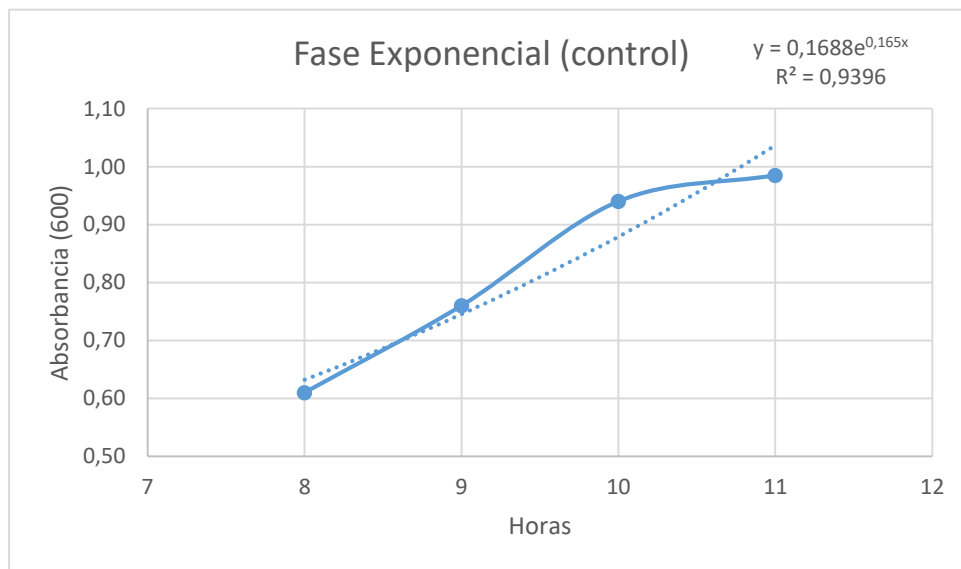


Figura 16. Resultados de biomasa en su fase exponencial mediante absorbancia de *Streptomyces* ST2-7A en un volumen de 1 L, ajustado a un pH constante de 10, a 33°C y 500 rpm. Mostrando un ajuste exponencial a los datos experimentales.

Un comportamiento esperado al controlar el pH sería un aumento de la biomasa final, como una mejora en la tasa de crecimiento, pero se observa todo lo contrario. Una hipótesis que podría explicar este resultado sería la gran variación de pH registrado inicialmente en el biorreactor, pasando de un pH inicial de 10 a uno de 5,4, tomando en cuenta que la escala de pH es logarítmica, este descenso es de gran magnitud.

Por lo anterior, al parecer el pH óptimo inicial de la fermentación para esta cepa de *Streptomyces* es 10, pero el pH óptimo que maximice el crecimiento de la fase exponencial pareciera ser otro y encontrarse entre el rango de 10 y 5. Por otro lado, que se mantenga la duración de la fase exponencial puede deberse a que las condiciones de mejor transferencia de masa y oxígeno dadas en el biorreactor permitan dicha mejora frente al cultivo tradicional.

Además, la nula variación de la presión de oxígeno no se condice con el crecimiento registrado, a pesar de ser menor, la variación casi nula no reporta actividad celular. Al momento de utilizar el equipo se investiga que no existen registros previos de fermentaciones a un pH tan alcalino y de forma sostenida en el tiempo, siendo esta la primera experiencia de este tipo. Por lo cual, se propone averiguar si esta casi nula variación de oxígeno se debe a un error del instrumento en estas condiciones o efectivamente fue debido al crecimiento celular.

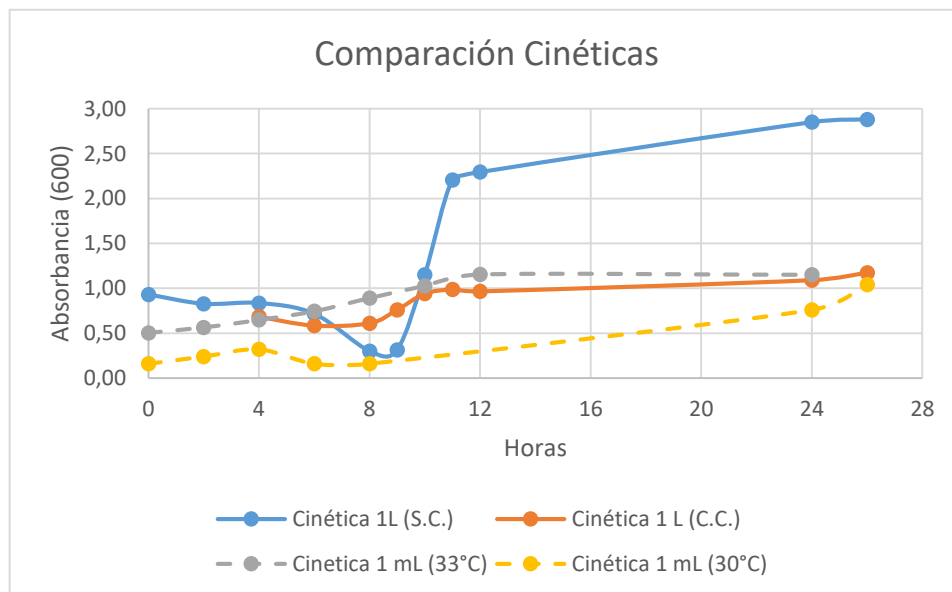


Figura 17. Comparación del crecimiento celular de la cepa ST2-7A a distintos volúmenes y temperaturas. Las siglas S.C es Sin Control y C.C. es Con Control

Finalmente, al contrastar el crecimiento de las distintas cinéticas se puede observar como mejora la biomasa final desde la situación inicial (pH 10 inicial a 30°C en un volumen de

1 mL) al aumentar la temperatura a 33°C, teniendo un incremento de un 11% de biomasa al llegar a la fase estacionaria. Por otro lado, si se compara el crecimiento a un volumen de 1 L en el biorreactor, se puede apreciar un aumento de un 120% respecto a la situación inicial a 30°C y de un 99% respecto a la situación inicial a 33°C. Dicho análisis se puede ver en el siguiente gráfico, donde las líneas discontinuas son las cinéticas a un 1 mL y las continuas a 1 L.

5.5 Reflexión ética acerca de la ingeniería en biotecnología

La biotecnología como disciplina se enmarca en la actividad tecnocientífico, ya que busca generar conocimientos con utilidad industrial en distintas áreas, como la minería, agricultura, acuicultura, salud y farmacología. Sus desarrollos también están orientados a crear nuevas tecnologías y técnicas basadas en ciencias biológicas como la microbiología y la biología molecular.

En este trabajo de memoria se enmarca en el contexto de desarrollar nuevos antibióticos y anticancerígenos a partir de bacterias extremófilas del Desierto de Atacama, en particular del Salar de Tara, en él se utilizan metodologías de la microbiología y bioingeniería para lograr dichos cometidos. De esta forma, los alcances de los desarrollos a los que contribuye esta tesis son parte de los lineamientos que persigue la tecnociencia, reforzando la idea anterior.

Además, las cepas estudiadas provienen de un ambiente natural con una baja intervención del hombre, el cual además sigue siendo estudiado por distintas disciplinas. Lo cual nos lleva a la pregunta, en caso de encontrar cepas con potencial biotecnológico e industrial, ¿significaría esto atraer y expandir la explotación de un ambiente natural para fines tecnocientíficos? En caso de ser afirmativa la respuesta, ¿qué sería necesario considerar?

En primer lugar, es necesario tomar en cuenta el principio precautorio para poder anticipar, previo a la acción, los impactos que tendría dicho desarrollo en los distintos agentes afectados, así como seguir los principios y exigencias que plantea la Declaración de Singapur. Para ello es de interés ahondar en los conceptos de los autores Hans Jonas y Javier Echeverría.

Siguiendo el principio de responsabilidad de Hans Jonas, es necesario tomar en cuenta el impacto que tendría dicho desarrollo para la salud de las personas afectadas por bacterias multirresistentes o cánceres de distinta índole, como el impacto en el medio ambiente de origen en su balance ecológico y otros organismos que habiten en este. De esta forma, se pueden balancear los factores relevantes para las futuras generaciones y la sostenibilidad del ecosistema.

Siguiendo lo propuesto por Javier Echeverría, evaluar dicho problema solo usando valores morales no es suficiente, también es necesario considerar:

- Valores económicos; por ejemplo, ¿qué tan rentable es la producción de este nuevo fármaco?, ¿cuáles son los costos de minimizar los impactos en el medio ambiente?

- Valores políticos; por ejemplo, ¿cómo contribuye a la salud pública dicho desarrollo?, ¿de qué forma se alinea con las políticas de ciencia y tecnología del país?
- Valores jurídicos; por ejemplo, ¿se ha considerado a las personas del sector como parte de una futura patente comercial?, ¿se adecúa la obtención y tratamiento de las cepas a los protocolos de armonización vigentes?
- Valores sociales; por ejemplo, ¿se logra generar un desarrollo que sea accesible a las personas que más lo necesitan?, ¿cómo contribuye el desarrollo biotecnológico del Desierto de Atacama a futuros profesionales y la comunidad del sector?
- Valores ecológicos; por ejemplo, ¿cuál sería el impacto en la sostenibilidad de dicho ecosistema en el tiempo?, ¿abre la posibilidad de explotar otros ambientes naturales con nula o baja intervención del hombre dicho desarrollo?

De esta forma, el principio de responsabilidad no basta para abarcar la complejidad del problema y sus alcances. Lo que se puede complementar con el análisis pluriaxiológico de Echeverría.

A pesar de ello, es importante rescatar la responsabilidad planteada por Jonas como un fin en sí mismo, donde esta se adquiere por la asimetría ante la situación frente a otros y el entorno, en este caso, el rol de científicos e ingenieros ante la naturaleza y comunidades afectadas, donde no se escoge contraer este deber, por lo que se vuelve una obligación, en forma de imperativo moral, ser responsable. Por lo cual, se puede extender el principio de responsabilidad moral a uno axiológico, contribuyendo a la reflexión sobre los fines de la actividad biotecnológica.

Finalmente, parece necesario y obligatorio incluir en los fines de la actividad profesional de científicos e ingenieros, en particular al área de la biotecnología, el principio de responsabilidad en un marco axiológico de la acción tecnocientífica, logrando así profesionales más integrales en su contribución y rol en el conocimiento, tecnología, economía, política, leyes, ecología y sociedad.

6. Conclusiones

El objetivo del presente trabajo de título busca mejorar las condiciones de cultivo de *Streptomyces* del Salar de Tara para aumentar la biomasa obtenida y disminuir el tiempo de crecimiento. Para ello, en primer lugar, se pudo corroborar que las cepas estudiadas presentan un comportamiento alcalófilo, y en segundo lugar, que la fuente de carbono que permite un mejor crecimiento y esporulación de estos microorganismos es el almidón frente a la glucosa.

Luego se estudió la cepa de mayor relevancia preliminar, desde un punto de vista de los potenciales productos terapéuticos que puede sintetizar, siendo esta la ST2-7A. Se encontraron los parámetros óptimos para su cultivo, siendo estos un pH 10 inicial y una temperatura constante de 33°C, logrando una menor fase lag y alcanzando una mayor biomasa al llegar al estado estacionario.

De esta forma se escala el cultivo a un fermentador de 1 L controlando de forma más directa los parámetros de crecimiento, como son el pH, temperatura, agitación y presión de oxígeno. En primera instancia, solo controlando la temperatura y agitación, se logra un aumento de un 99% en la biomasa final en estado estacionario respecto a la situación inicial a 33°C a un volumen de 1 mL. Además, se logra reducir la fase exponencial de 12 horas a solo 3.

Luego, al realizar una fermentación manteniendo constante el pH del cultivo a 10, se observa una inhibición del crecimiento celular, siendo un 45% menor al obtenido sin controlar dicha variable en el biorreactor de un 1 L. De todas formas, se mantiene la duración de la fase exponencial de 3 horas, concluyendo que dicha disminución puede ser atribuida a la mejor transferencia de masa y oxígeno entre el medio y el microorganismo gracias a las condiciones dadas en el biorreactor.

Por lo cual, se propone como continuación del actual trabajo estudiar el pH óptimo de la cepa ST2-7A, ya que la variación de este parámetro es relevante, pasando de un pH inicial 10 hasta 5,4 en el periodo estacionario. Además, evaluar nuevas variables a controlar, como la presión de oxígeno y la agitación óptima que permitan minimizar la fase exponencial y maximizar la biomasa en estado estacionario.

Además, al realizar la reflexión ética del actual trabajo se logra reconocer a la biotecnología como una actividad tecnocientífica. Se plantea la problemática de encontrar nuevos compuestos con utilidad terapéutica provenientes de un ambiente natural con baja intervención humana, lo que podría aumentar su explotación e investigación.

Para ello, es necesario estudiar de forma previa a la acción los impactos de la actividad tecnocientífica en dicho ecosistema, como los beneficios que podría traer este desarrollo, siguiendo de esta forma el principio precautorio y lo planteado por la Declaración de Singapur.

También, se realiza una reflexión en torno al principio de responsabilidad de Hans Jonas y el pluralismo axiológico de Javier Echeverría. Concluyendo que la responsabilidad se vuelve una obligación por la asimetría de científicos e ingenieros ante la comunidad y su

entorno, de esta forma se convierte en un imperativo no solo moral, sino que se extiende a uno axiológico que considere una gama mayor de valores involucrados.

Además, pareciera necesario y un deber incluir en los fines de la actividad profesional de científicos e ingenieros el principio de responsabilidad en un marco axiológico de la acción tecnocientífica, logrando así profesionales más integrales en su contribución y rol en el conocimiento, tecnología, economía, política, leyes, ecología y sociedad.

7. Bibliografía

- 2° Conferencia Mundial sobre Integridad en la Investigación. Declaración de Singapur (2010). Singapur.
- Akhwale, J. K., Göker, M., Rohde, M., Spröer, C., Schumann, P., Klenk, H. P., & Boga, H. I. (2015). *Streptomyces alkaliphilus* sp. nov., isolated from sediments of Lake Elmenteita in the Kenyan Rift Valley. *Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology*, *107*, 1249–1259. <https://doi.org/10.1007/s10482-015-0418-2>
- Antony-Babu, S., & Goodfellow, M. (2008). Biosystematics of alkaliphilic streptomycetes isolated from seven locations across a beach and dune sand system. *Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology*, *94*, 581–591. <https://doi.org/10.1007/s10482-008-9277-4>
- Brawner, M., Poste, G., Rosenberg, M., & Westpheling, J. (1991). *Streptomyces*: a host for heterologous gene expression. *Current Opinion in Biotechnology*, *2*, 674–681. [https://doi.org/10.1016/0958-1669\(91\)90033-2](https://doi.org/10.1016/0958-1669(91)90033-2)
- Busarakam, K., Bull, A. T., Girard, G., Labeda, D. P., Van Wezel, G. P., & Goodfellow, M. (2014). *Streptomyces leeuwenhoekii* sp. nov., the producer of chaxalactins and chaxamycins, forms a distinct branch in *Streptomyces* gene trees. *Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology*, *105*, 849–861. <https://doi.org/10.1007/s10482-014-0139-y>
- CeBiB. (2018). Genética Molecular, Extremófilos and Ecofisiología (MG). Recuperado a partir de <https://cebib.cl/investigacion/genetica-molecular-extremofilos-and-ecofisiologia-mg/>
- Commission on the Ethics of Scientific Knowledge, W. (2005). *Informe del Grupo de Expertos sobre el principio precautorio*. París.
- Cortina, A. (2006). Ciudadanía civil, universalizar la aristocracia. En A. Editorial (Ed.), *Ciudadanos del mundo* (1° Edición, pp. 115–138). Valencia.
- Culture, G. C. of M. and C. (2007). 1081. Horikoshi-1 Medium.
- Cumberland, S., Chaib, F., & Bagozzi, D. (2017). *The world is running out of antibiotics, WHO report confirms*. Recuperado a partir de <http://www.who.int/news-room/detail/20-09-2017-the-world-is-running-out-of-antibiotics-who-report-confirms>
- Echeverría, J. (2003). *La Revolución Tecnocientífica*. (F. de C. E. de España, Ed.) (1° Edición).
- Elsayed, S. S., Trusch, F., Deng, H., Raab, A., Prokes, I., Busarakam, K., ... Rateb, M. E. (2015). Chaxapeptin, a Lasso Peptide from Extremotolerant *Streptomyces leeuwenhoekii* Strain C58 from the Hyperarid Atacama Desert. *Journal of Organic Chemistry*, *80*, 10252–10260. <https://doi.org/10.1021/acs.joc.5b01878>
- Gamboa-Suasnavart, R. A., Marín-Palacio, L. D., Martínez-Sotelo, J. A., Espitia, C., Servín-González, L., Valdez-Cruz, N. A., & Trujillo-Roldán, M. A. (2013). Scale-up from shake flasks to bioreactor, based on power input and *Streptomyces lividans* morphology, for the production of recombinant APA (45/47 kDa protein) from

- Mycobacterium tuberculosis*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 29, 1421–1429. <https://doi.org/10.1007/s11274-013-1305-5>
- Goodfellow, M., Busarakam, K., Idris, H., Labeda, D. P., Nouioui, I., Brown, R., ... Bull, A. T. (2017). *Streptomyces asenjonii* sp. nov., isolated from hyper-arid Atacama Desert soils and emended description of *Streptomyces viridosporus* Pridham et al. 1958. *Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology*, 110, 1133–1148. <https://doi.org/10.1007/s10482-017-0886-7>
- Goodfellow, M., & Fiedler, H. P. (2010). A guide to successful bioprospecting: Informed by actinobacterial systematics. *Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology*, 98, 119–142. <https://doi.org/10.1007/s10482-010-9460-2>
- Guerrero, S & Riquelme, C., Cortés, C., Jarmusch, S., Jaspars, M., Asenjo, J., & Andrews, B. (2017). *New halotolerant Streptomyces species from “ Salar the Tara ” , a new niche in the search for novel bioactive compounds .* Antofagasta.
- Instituto Nacional del Cáncer. (2018). Estadísticas del cáncer. Recuperado a partir de <https://www.cancer.gov/espanol/cancer/naturaleza/estadisticas>
- Jonas, H. (1995). *El principio de responsabilidad*. (Herder, Ed.) (1° Edición).
- Kant, I. (1921). Fundamentación de la metafísica de las costumbres: filosofía moral. *Colección universal*, 143.
- Koepff, J., Keller, M., Tsohis, K. C., Busche, T., Hamed, M. B., Ann, J., & Kalinowski, J. (2017). Fast and Reliable Strain Characterization of *Streptomyces lividans* Through Micro-Scale Cultivation, 114, 2011–2022. <https://doi.org/10.1002/bit.26321>
- Kuster, E., & Williams, S. T. (1964). Selection of Media for Isolation of Streptomycetes. *Nature*, 202, 928–929. Recuperado a partir de <https://www.nature.com/articles/202928a0>
- Macintyre, A. (1987). *Tras la virtud*. (E. Crítica, Ed.). <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>
- Minas, W., Bailey, J. E., & Duetz, W. (2001). Streptomycetes in micro-cultures : Growth , production of secondary metabolites , and storage and retrieval in the 96-well format, 297–305.
- Ministerio de Salud. (2016). Estrategia Nacional de Cáncer, Chile 2016.
- Okoro, C. K., Brown, R., Jones, A. L., Andrews, B. A., Asenjo, J. A., Goodfellow, M., & Bull, A. T. (2009). Diversity of culturable actinomycetes in hyper-arid soils of the Atacama Desert, Chile. *Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology*, 95, 121–133. <https://doi.org/10.1007/s10482-008-9295-2>
- Organización Mundial de la Salud. (2018). Cáncer. Recuperado a partir de <http://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/cancer>
- Rateb, M. E., Houssen, W. E., Arnold, M., Abdelrahman, M. H., Deng, H., Harrison, W. T. A., ... Jaspars, M. (2011). Chaxamycins A–D, Bioactive Ansamycins from a

- Hyper-arid Desert *Streptomyces* sp. *Journal of Natural Products*, 74, 1491–1499.
<https://doi.org/10.1021/np200320u>
- Rosenberg, E., DeLong, E. F., Lor, S., Stackebrandt, E., & Thompson, F. (2014). *The Prokaryotes. Actinobacteria. Pace Pacing And Clinical Electrophysiology*.
<https://doi.org/10.1007/0-387-30743-5>
- Santhanam, R., Okoro, C. K., Rong, X., Huang, Y., Bull, A. T., Andrews, B. A., ... Goodfellow, M. (2012). *Streptomyces deserti* sp. nov., isolated from hyper-arid Atacama Desert soil. *Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology*, 101, 575–581. <https://doi.org/10.1007/s10482-011-9672-0>
- Santhanam, R., Rong, X., Huang, Y., Andrews, B. A., Asenjo, J. A., & Goodfellow, M. (2013). *Streptomyces bullii* sp. nov., isolated from a hyper-arid Atacama Desert soil. *Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology*, 103, 367–373. <https://doi.org/10.1007/s10482-012-9816-x>
- Talbot, G. H., Bradley, J., John E. Edwards, J., Gilbert, D., Scheld, M., & Bartlett, and J. G. (2006). *Bad Bugs Need Drugs: An Update on the Development Pipeline from the Antimicrobial Availability Task Force of the Infectious Diseases Society of America. ASA Refresher Courses in Anesthesiology*.
<https://doi.org/10.1109/TDEI.2009.5211872>

8. Anexos

8.1 Anexo A. Datos experimentales

Tabla 3. Datos experimentales de la absorbancia registrada de la cepa ST2-7A a distintos pHs a 28°C (izquierda), a 30°C (centro) y a 33°C (derecha).

Horas	pH9	pH10	pH11	Horas	pH9	pH10	pH11	Horas	pH9	pH10	pH11
0	0,48	0,44	0,40	0	0,56	0,16	0,48	0	-	0,20	0,48
2	0,52	0,46	0,36	2	0,54	0,24	-	2	0,44	0,24	0,24
4	0,50	0,48	0,52	4	0,58	0,32	0,40	4	0,42	0,28	0,48
6	0,50	0,50	0,40	6	0,56	0,16	0,40	6	0,42	0,36	-
8	0,56	0,50	0,52	8	0,50	0,16	0,34	8	0,52	0,45	0,36
24	0,68	0,74	0,48	24	0,76	0,76	0,44	24	0,68	1,16	0,48
26	0,80	0,80	0,40	26	0,84	1,04	0,40	26	0,70	1,14	0,48
28	0,80	0,90	0,42	28	0,96	1,14	0,40	28	0,72	1,10	0,53

Tabla 4. Datos experimentales de la absorbancia registrada de la cepa ST2-7A a 33°C y pH 10, en triplicado (muestras A, B y C), con su promedio y desviación estándar.

Horas	A	B	C	Promedio	Desviación estándar
0	0,47	0,53	0,51	0,50	0,031
3	0,56	0,55	0,58	0,56	0,015
6	0,67	0,6	0,67	0,65	0,040
7,5	0,76	0,73	0,74	0,74	0,015
9	-	0,9	0,88	0,89	0,014
10,5	1	1,01	1,07	1,03	0,038
12	1,25	1,13	1,08	1,15	0,087
24	1,16	1,12	1,17	1,15	0,026

Tabla 5. Datos experimentales del cultivo de *Streptomyces* ST2-7A en un volumen de 1 L, ajustado a pH inicial de 10, a 33°C y 500 rpm. Se muestra la variación de pH (izquierda) y presión de oxígeno (derecha).

Hora	pH	Hora	pO2
0	10,21	0	100,6
2	9,89	2	100,4
4	9,67	4	99,9
6	9,35	6	94,5
8	8,59	8	52,8
9	7,29	9	4,5
10	5,72	10	4,5
11	5,41	11	4,7
12	5,62	12	4,6
24	8,2	24	52,2
26	8,4	26	58,4

Tabla 6. Datos experimentales de la absorbancia registrada del cultivo de *Streptomyces* ST2-7A en un volumen de 1 L, ajustado a pH inicial de 10, a 33°C y 500 rpm, fraccionando en 3 la muestra de forma homogénea (muestras A, B y C), con su promedio y desviación.

Hora	A	B	C	Promedio	Desviación estándar
0	0,99	0,96	0,84	0,93	0,079
2	0,88	0,85	0,75	0,83	0,068
4	-	0,83	0,84	0,84	0,007
6	-	0,65	0,78	0,72	0,092
8	0,24	0,26	0,4	0,30	0,087
9	0,33	0,27	0,34	0,31	0,038
10	1,19	1,12	1,14	1,15	0,036
11	2,23	2,21	2,18	2,21	0,025
12	2,28	2,28	2,32	2,29	0,023
24	2,91	2,77	2,87	2,85	0,072
26	2,77	2,99	-	2,88	0,156

Tabla 7. Datos experimentales del cultivo de *Streptomyces* ST2-7A en un volumen de 1 L, controlando el pH constante a 10, a 33°C y 500 rpm. Se muestra la variación de presión de oxígeno.

Hora	pO2
0	97,3
2	97,5
4	97,6
6	97,7
8	97,6
9	97,2
10	97,1
11	97
12	97,3
24	89,5
26	84,9

Tabla 8. Datos experimentales de la absorbancia registrada del cultivo de *Streptomyces* ST2-7A en un volumen de 1 L, controlando el pH constante a 10, a 33°C y 500 rpm, fraccionando en 3 la muestra de forma homogénea (muestras A, B y C), con su promedio y desviación.

Hora	A	B	C	Promedio	Desviación estándar
0	-	-	-	-	-
2	-	-	-	-	-
4	0,69	0,68	0,68	0,68	0,006
6	0,56	0,62	0,57	0,58	0,032
8	0,61	0,61		0,61	0,000
9	0,78	0,77	0,73	0,76	0,026
10	-	0,93	0,95	0,94	0,014
11	0,99	0,98	-	0,99	0,007
12	-	0,96	0,97	0,97	0,007
24	1,08	1,06	1,13	1,09	0,036
26	1,18	1,17	1,17	1,17	0,006

8.2 Anexo B. Deducción para tasa máxima de crecimiento

Al momento de realizar un balance de masa de biomasa en el reactor, se tiene la siguiente expresión.

$$F \cdot x_e - F \cdot x_s + \mu \cdot x \cdot V - \alpha \cdot x \cdot V = V \cdot \frac{d(x \cdot V)}{dt}$$

$F = \text{flujo}; x = \text{biomasa}; \mu = \text{tasa de crecimiento};$
 $\alpha = \text{tasa de muerte}; V = \text{volumen}; t = \text{tiempo}$

Si se consideran los siguientes supuestos:

- Volumen constante respecto a la biomasa y el tiempo ($V=\text{cte}$) y distinto de 0.
- No existe entrada y salida del reactor al ser batch ($F=0$)
- Muerte celular despreciable en esta etapa del crecimiento celular ($\alpha=0$) al ser la fase exponencial ($\mu = \mu_{\text{máx}}$).

Con esto se llega a la siguiente expresión.

$$\mu \cdot x = \frac{dx}{dt}$$

Integrando por partes, con condiciones de borde: x_0 y x ; $t_0 = 0$ y t se tiene la expresión.

$$\mu \cdot t = \ln\left(\frac{x}{x_0}\right)$$

Reordenando la ecuación, se obtiene la expresión utilizada para calcular la tasa máxima de crecimiento.

$$x = x_0 \cdot e^{\mu_{\text{máx}} \cdot t}$$