



Universidad de Chile
Facultad de Ciencias Físicas y Matemáticas
Departamento de Ingeniería Química, Biotecnología y
Materiales

ESTUDIO DE BIOACTIVIDAD DE LA CEPA ST₂-7A DE
STREPTOMYCES SP. DEL SALAR DE TARA Y
OPTIMIZACIÓN DE CONDICIONES DE CULTIVO

MEMORIA PARA OPTAR AL TÍTULO DE INGENIERO CIVIL EN
BIOTECNOLOGÍA

LUIS FELIPE CASTRO NARANJO

PROFESORA GUÍA:

BÁRBARA ANDREWS FARROW

MIEMBROS DE LA COMISIÓN:

IRENE MARTÍNEZ BASTERRECHEA

JUAN ASENJO DE LEUZE

ÁLVARO OLIVERA NAPPA

SANTIAGO DE CHILE

2022

**RESUMEN DE LA MEMORIA PARA OPTAR
AL TÍTULO DE:** Ingeniero Civil en Biotecnología
POR: Luis Felipe Castro Naranjo
FECHA: 2022
PROFESORA GUÍA: Bárbara Andrews Farrow

**ESTUDIO DE BIOACTIVIDAD DE LA CEPA ST2-7A DE
STREPTOMYCES SP. DEL SALAR DE TARA Y OPTIMIZACIÓN DE
CONDICIONES DE CULTIVO**

Las infecciones ocasionadas por microorganismos resistentes a antimicrobianos son una preocupación sanitaria internacional. Uno de los enfoques para atender este problema es la búsqueda y desarrollo de nuevos compuestos que puedan ser utilizados como medicamentos. Una de las estrategias de búsqueda consiste en la exploración de nuevos compuestos bioactivos producidos por microorganismos que habitan ambientes extremos. La cepa ST2-7A de *Streptomyces sp.* del Salar de Tara es una bacteria aislada del desierto de Atacama que se ha mostrado tiene bioactividad citotóxica.

El objetivo de este trabajo es identificar la bioactividad antibacteriana de la cepa ST2-7A de *Streptomyces sp.* del Salar de Tara, maximizando la producción de metabolitos bioactivos. Primero, se implementa una versión modificada de la metodología de partición Kupchan para la elección de un disolvente de extracción de metabolitos. Para maximizar la producción se realizaron variaciones a las condiciones de cultivo: pH, agitación, temperatura y salinidad, en el medio *Tryptic Soy Broth* (TSB) modificado. La producción se evaluó midiendo la formación de halos de inhibición de crecimiento bacteriano al realizar bioensayos contra *Escherichia coli* y *Bacillus subtilis* mediante el método disco difusión. Luego, se comparó la bioactividad de las condiciones originales y optimizadas, y se construyeron las curvas de cinética de crecimiento mediante medición de densidad óptica y peso seco. Finalmente, se realizó un escalamiento del cultivo de laboratorio a un biorreactor de 1 [L], comparando fermentaciones con pH inicial 9 (sin control) y pH constante igual a 9.

En este trabajo se determinó que la cepa ST2-7A posee bioactividad antibacteriana frente a *E. coli* y *B. subtilis*. En relación con los disolventes de extracción probados, el único que logró generar halos de inhibición de crecimiento fue el éter de petróleo. Luego, tras variar las condiciones de cultivo, una a la vez, se determinaron que las óptimas para la producción de metabolitos son pH 9, 160 RPM, 35°C y 15% (m/v) de NaCl. Las condiciones optimizadas permitieron un aumento en el porcentaje de bioactividad, respecto al control, del 10 y 7%, frente a *E. coli* y *B. subtilis*, respectivamente. Por otra parte, la velocidad específica de crecimiento máxima para las condiciones optimizadas fue $0,16 \left[\frac{1}{h} \right]$, un 25% menor respecto a las condiciones originales. Se logró determinar una curva de calibración para el crecimiento de la cepa con coeficiente de determinación igual a 0,91. Al escalar el cultivo a un biorreactor de 1 [L], se obtuvo que no controlar el pH permite reducir la duración de la fase *lag* y generar una concentración de biomasa un 17% mayor respecto al cultivo con control de pH.

De este trabajo, se propone evaluar el uso de nuevos disolventes orgánicos para la extracción de metabolitos. También, se proyecta investigar variaciones a las condiciones de cultivo como modificar la fuente de carbono o variar parámetros físicos como la exposición a la radiación UV. Finalmente, es también necesario identificar los metabolitos bioactivos y estandarizar un método para su cuantificación.

Agradecimientos

Gratitud a mi madre, María Irene Naranjo y a mi padre, Luis Héctor Castro, por su apoyo inconmensurable en cada uno de los momentos de mi formación. Gracias a mi familia que siempre estuvo para brindar aliento y consejo a lo largo del camino. Han sido un pilar fundamental que me ha permitido ser lo que soy.

Agradezco a mis amigos y amigas, a quienes conocí en la infancia y en el colegio y mantuvimos el contacto hasta hoy en día, por haber compartido tantas alegrías y buenos momentos. A mis compañeros y compañeras de entrenamiento, sobre todo a quienes conocí en las escuelas Aresan y Chung-Iy-Tang, con ellos aprendí la importancia de la constancia y tenacidad. Y a las amistades que conocí durante mi estadía en la universidad, por las gratas tardes de ocio, noches de juerga y viajes de aventura.

Tabla de contenido

1	Introducción.....	1
1.1	Contextualización	1
1.2	Motivación.....	1
1.3	Antecedentes.....	2
1.3.1	Cepa ST2-7A de <i>Streptomyces</i> sp.	2
1.3.2	Testeo de susceptibilidad a antimicrobianos.....	3
1.3.3	Descripción y medios de cultivo de bacterias patógenas	3
1.3.3.1	<i>Escherichia coli</i>	3
1.3.3.2	<i>Bacillus subtilis</i>	4
1.3.4	Optimización condiciones de cultivo: Un factor a la vez.....	4
1.3.5	Extracción líquido-líquido.....	4
1.4	Descripción del proyecto	5
1.5	Justificación	5
1.6	Objetivos	6
1.6.1	General.....	6
1.6.2	Específicos	6
1.7	Alcances	6
1.8	Limitaciones.....	6
2	Materiales y metodología	7
2.1	Materiales	7
2.1	Cultivo de la cepa ST2-7A de <i>Streptomyces</i> sp.	7
2.1.1	Elección de disolvente orgánico	7
2.1.2	Extracción de metabolitos bioactivos mediante disolvente orgánico	7
2.1.3	Bioensayos.....	8
2.1.4	Mantenimiento de bacterias patógenas.....	8
2.1.5	Cinética de Crecimiento.....	8
2.1.6	Escalamiento en biorreactor	9
2.2	Metodología.....	9
2.2.1	Cultivos de la cepa ST2-7A de <i>Streptomyces</i> sp.....	9
2.2.1.1	Cultivo en condiciones originales.....	9
2.2.1.2	Variación de pH	10

2.2.1.3	Variación de agitación.....	10
2.2.1.4	Variación de temperatura.....	10
2.2.1.5	Variación de salinidad.....	11
2.2.1.6	Cultivo en condiciones optimizadas.....	11
2.2.2	Elección de disolvente orgánico	11
2.2.3	Extracción de metabolitos bioactivos por disolvente orgánico.....	12
2.2.4	Bioensayo.....	13
2.2.5	Mantenimiento de bacterias patógenas.....	14
2.2.6	Cinética de crecimiento	14
2.2.6.1	Cultivo en condiciones originales y óptimas.....	14
2.2.6.2	Medición absorbancia y peso seco	15
2.2.6.3	Escalamiento en biorreactor	15
3	Resultados y discusión.....	17
3.1	Elección disolvente orgánico.....	17
3.2	Condiciones de cultivo	18
3.2.1	Variación de pH	18
3.2.2	Variación de agitación.....	19
3.2.3	Variación de temperatura.....	20
3.2.4	Variación de salinidad.....	21
3.3	Cultivo en condiciones originales y óptimas para la producción.....	22
3.3.1	Cinética de crecimiento	22
3.3.2	Curva de calibración.....	23
3.3.3	Comparación bioactividad antibiótica.....	25
3.4	Escalamiento en biorreactor	26
3.4.1	Cinética de crecimiento	26
3.4.2	Bioensayos	29
4	Conclusiones	31
5	Bibliografía.....	33
	Anexos.....	36
	Anexo A: Protocolo de uso del rotoevaporador.....	36
	Anexo B: Detalle de resultados	37
	Variación de pH	37

Variación de agitación.....	37
Variación de temperatura.....	38
Variación de salinidad	38
Cinética de crecimiento: Medición de OD600	39
Cinética de crecimiento: Peso seco	39
Halos de inhibición de crecimiento condiciones optimizadas vs originales	40
Escalamiento en biorreactor: Densidad óptica	41
Escalamiento en biorreactor: Bioensayos	41
Anexo C: Memoria de cálculo	43
Cinética de crecimiento	43
Peso seco y curva de calibración.....	43
Concentración de biomasa calculada versus real.....	45

Índice de Figuras

- Figura 1: Actividad antibiótica de la cepa ST2-7A de *Streptomyces* sp. utilizando diferentes disolventes orgánicos para la extracción de metabolitos bioactivos frente a *E. coli* (izquierda) y *B. subtilis* (derecha). Extracciones con (0): fase acuosa, (1): éter de petróleo, (2): etilo acetato y (3): tetrahidrofurano.....17
- Figura 2: Actividad antibiótica de la cepa ST2-7A de *Streptomyces* sp. variando el pH. Las barras color verde claro indican bioactividad contra *E. coli* y las barras color verde oscuro bioactividad contra *B. subtilis*. El porcentaje de bioactividad mostrado es relativo al control positivo (cloranfenicol para Gram- y carbomicina para Gram+, ambos a 50 [mg/mL]).....18
- Figura 3: Actividad antibiótica de la cepa ST2-7A de *Streptomyces* sp. variando la agitación. Las barras color verde claro indican bioactividad contra *E. coli* y las barras color verde oscuro bioactividad contra *B. subtilis*. El porcentaje de bioactividad mostrado es relativo al control positivo (cloranfenicol para Gram- y carbomicina para Gram+, ambos a 50 [mg/mL]).....19
- Figura 4: Actividad antibiótica de la cepa ST2-7A de *Streptomyces* sp. variando la temperatura. Las barras color verde claro indican bioactividad contra *E. coli* y las barras color verde oscuro bioactividad contra *B. subtilis*. El porcentaje de bioactividad mostrado es relativo al control positivo (cloranfenicol para Gram- y carbomicina para Gram+, ambos a 50 [mg/mL]).....20
- Figura 5: Actividad antibiótica de la cepa ST2-7A de *Streptomyces* sp. variando la salinidad (en porcentaje de cloruro de sodio masa/volumen). Las barras color verde claro indican bioactividad contra *E. coli* y las barras color verde oscuro bioactividad contra *B. subtilis*. El porcentaje de bioactividad mostrado es relativo al control positivo (cloranfenicol para Gram- y carbomicina para Gram+, ambos a 50 [mg/mL]).21
- Figura 6: Crecimiento celular medido a través de absorbancia a 600 nm, utilizando como blanco solución Ringer 1/4 fuerza iónica. Se muestra solo la fase exponencial.22
- Figura 7: Curva de calibración del crecimiento de la cepa ST2-7A de *Streptomyces* sp. midiendo densidad óptica a 600 [nm] versus concentración de biomasa [mg/mL], a partir de los cultivos en condiciones originales y optimizadas.23
- Figura 8: Comparación entre la biomasa real y calculada, según la curva de calibración, para el crecimiento de la cepa ST2-7A de *Streptomyces* sp. bajo las condiciones originales de cultivo. ...24
- Figura 9: Comparación entre la biomasa real y calculada, según la curva de calibración, para el crecimiento de la cepa ST2-7A de *Streptomyces* sp. bajo las condiciones optimizadas de cultivo.24
- Figura 10: Actividad antibiótica relativa de las condiciones originales versus las condiciones optimizadas para la producción. Las barras color verde claro indican bioactividad contra *E. coli* y las barras color verde oscuro bioactividad contra *B. subtilis*. El porcentaje de bioactividad mostrado es relativo al control positivo (cloranfenicol para Gram- y carbomicina para Gram+, ambos a 50 [mg/mL]).....25

Figura 11: Cinética de crecimiento del cultivo de la cepa ST2-7A de <i>Streptomyces</i> sp. en biorreactor de 1 [L] y condiciones optimizadas para la producción. Se muestra la fase de crecimiento exponencial del cultivo sin control de pH y las mediciones de OD600 para el cultivo en pH constante igual a 9, en el mismo intervalo de tiempo.	26
Figura 12: Variación del pH al cultivar la cepa ST2-7A de <i>Streptomyces</i> sp. en biorreactor de 1 [L] en condiciones optimizadas para la producción de metabolitos bioactivos.....	27
Figura 13: Relación entre la densidad óptica a 600 [nm] y pH durante la fase de crecimiento exponencial del cultivo de la cepa ST2-7A de <i>Streptomyces</i> sp. en biorreactor de 1 [L].	27
Figura 14: Concentración de biomasa calculada, según la curva de calibración, para el crecimiento de la cepa ST2-7A de <i>Streptomyces</i> sp. en biorreactor de 1 [L], sin control de pH y pH constante 9.	28
Figura 15: Actividad antibiótica relativa del cultivo en biorreactor sin control de pH (azul) y pH 9 (naranja), con extracciones mediante solvente orgánico en proporciones 8:1 y 1:1. Las barras en colores claros indican bioactividad contra <i>E. coli</i> y las barras en colores oscuros bioactividad contra <i>B. subtilis</i> . El porcentaje de bioactividad mostrado es relativo al control positivo (cloranfenicol para Gram- y carbomicina para Gram+, ambos a 50 [mg/mL]).....	29

Índice de Tablas

Tabla 1: Actividad antibiótica de la cepa ST2-7A de <i>Streptomyces</i> sp. medida según los diámetros de los halos de inhibición de crecimiento bacteriano contra <i>E. coli</i> y <i>B. subtilis</i> , variando el pH. El promedio relativo de inhibición respecto al control se calcula según la media aritmética de los mejores 3 valores (verde claro) de cada variable. El porcentaje de bioactividad mostrado es relativo al control positivo (cloranfenicol para Gram- y carbomicina para Gram+, ambos a 50 [mg/mL]).	37
Tabla 2: Actividad antibiótica de la cepa ST2-7A de <i>Streptomyces</i> sp. medida según los diámetros de los halos de inhibición de crecimiento bacteriano contra <i>E. coli</i> y <i>B. subtilis</i> , variando la agitación. El promedio relativo de inhibición respecto al control se calcula según la media aritmética de los mejores 3 valores (verde claro) de cada variable. El porcentaje de bioactividad mostrado es relativo al control positivo (cloranfenicol para Gram- y carbomicina para Gram+, ambos a 50 [mg/mL]).	37
Tabla 3: Actividad antibiótica de la cepa ST2-7A de <i>Streptomyces</i> sp. medida según los diámetros de los halos de inhibición de crecimiento bacteriano contra <i>E. coli</i> y <i>B. subtilis</i> , variando la temperatura. El promedio relativo de inhibición respecto al control se calcula según la media aritmética de los mejores 3 valores (verde claro) de cada variable. El porcentaje de bioactividad mostrado es relativo al control positivo (cloranfenicol para Gram- y carbomicina para Gram+, ambos a 50 [mg/mL]).	38
Tabla 4: Actividad antibiótica de la cepa ST2-7A de <i>Streptomyces</i> sp. medida según los diámetros de los halos de inhibición de crecimiento bacteriano contra <i>E. coli</i> y <i>B. subtilis</i> , variando salinidad (en % (m/v) de NaCl). El promedio relativo de inhibición respecto al control se calcula según la media aritmética de los mejores 3 valores (verde claro) de cada variable. El porcentaje de bioactividad mostrado es relativo al control positivo (cloranfenicol para Gram- y carbomicina para Gram+, ambos a 50 [mg/mL]).	38
Tabla 5: Resultados de medición de absorbancia de los cultivos en condiciones originales y optimizadas, utilizando como blanco de lectura solución Ringer ¼ fuerza iónica. En celeste los resultados en los cuales se diluyó en un 25% la muestra para su lectura.	39
Tabla 6: Resultados de medición de peso seco de los cultivos en condiciones originales y optimizadas. Los valores se detallan en unidades de concentración másica, considerando un volumen de muestra de 1 [mL].	39
Tabla 7: Actividad antibiótica de la cepa ST2-7A de <i>Streptomyces</i> sp. medida según los diámetros de los halos de inhibición de crecimiento bacteriano contra <i>E. coli</i> y <i>B. subtilis</i> , comparando las condiciones iniciales de cultivo con las óptimas obtenidas en este trabajo. El promedio relativo de inhibición respecto al control se calcula según la media aritmética de los mejores 3 valores (verde claro) para cada condición de cultivo utilizada. El porcentaje de bioactividad mostrado es relativo al control positivo (cloranfenicol para Gram- y carbomicina para Gram+, ambos a 50 [mg/mL]).	40

Tabla 8: Resultados de medición de absorbancia a 600 [nm] de los cultivos de la cepa ST2-7A de <i>Streptomyces</i> sp. en biorreactor de 1 [L] bajo condiciones de cultivo optimizadas para la producción de metabolitos bioactivos, sin control de pH y con pH constante igual a 9. En celeste los resultados en los cuales se diluyó en un 25% la muestra para su lectura.....	41
Tabla 9: Actividad antibiótica de la cepa ST2-7A de <i>Streptomyces</i> sp. medida según los diámetros de los halos de inhibición de crecimiento bacteriano contra <i>E. coli</i> y <i>B. subtilis</i> . El cultivo se realiza en biorreactor de 1[L] bajo condiciones optimizadas para la producción, sin controlar el pH. Se compara el uso de dos proporciones de sobrenadante de cultivo:disolvente, 8:1 y 1:1. El promedio relativo de inhibición respecto al control se calcula según la media aritmética para cada condición de cultivo utilizada. El porcentaje de bioactividad mostrado es relativo al control positivo (cloranfenicol para Gram- y carbomicina para Gram+, ambos a 50 [mg/mL]).....	41
Tabla 10: Actividad antibiótica de la cepa ST2-7A de <i>Streptomyces</i> sp. medida según los diámetros de los halos de inhibición de crecimiento bacteriano contra <i>E. coli</i> y <i>B. subtilis</i> . El cultivo se realiza en biorreactor de 1[L] bajo condiciones optimizadas para la producción, con pH 9 constante. Se compara el uso de dos proporciones de sobrenadante de cultivo:disolvente, 8:1 y 1:1. El promedio relativo de inhibición respecto al control se calcula según la media aritmética de los mejores 3 valores (verde claro) para cada condición de cultivo utilizada. El porcentaje de bioactividad mostrado es relativo al control positivo (cloranfenicol para Gram- y carbomicina para Gram+, ambos a 50 [mg/mL]).....	42
Tabla 11: Datos utilizados para la construcción de las curvas de cinética de crecimiento para condiciones originales y optimizadas. En verde claro se muestran los datos de la fase de crecimiento exponencial.....	43
Tabla 12: Resultados de medición de peso seco de los cultivos en condiciones originales y optimizadas, tras haber restado los valores mínimos de cada conjunto de datos y aplicado el factor de dilución a los datos de la hora 24 en adelante. En naranja datos que no son considerados en la construcción de la curva de calibración.	44
Tabla 13: Valores de biomasa y densidad óptica utilizados para construir la curva de calibración.	44
Tabla 14: Comparación entre la biomasa calculada según la curva de calibración y la biomasa real en cultivo bajo condiciones originales.....	46
Tabla 15: Comparación entre la biomasa calculada según la curva de calibración y la biomasa real en cultivo bajo condiciones optimizadas para la producción de metabolitos bioactivos.	46

1 Introducción

1.1 Contextualización

El descubrimiento de la penicilina en 1928 marcó el inicio de una nueva era en la que se logró dar tratamiento a una gran variedad de enfermedades por microorganismos. A pesar de esto, las enfermedades infecciosas continúan siendo una de las causas mayoritarias de muerte en el mundo y uno de los motivos corresponde al desarrollo de resistencia a antimicrobianos (Kapoor, et al., 2017). Las enfermedades ocasionadas por infecciones de microorganismos multiresistentes son una preocupación sanitaria internacional y se proyecta que para el año 2050 estas serán la causa mayoritaria de mortalidad (UK Department of Health, 2016).

La resistencia a antibióticos es un proceso natural mediante el cual una bacteria adquiere resistencia frente a una sustancia que antes le era de carácter nocivo, lo que se produce por medio de mutaciones en respuesta a la exposición a la sustancia, fenómeno que se ha visto acelerado por el uso irresponsable de antibióticos (World Health Organization, 2020). Esta situación ha motivado a la comunidad nacional e internacional al desarrollo de planes de acción para combatir las infecciones farmacorresistentes, uno de los enfoques es la búsqueda y desarrollo de nuevos compuestos que puedan ser utilizados como medicinas (World Health Organization, 2015) (Ministerio de Salud, 2017). Una de las estrategias de búsqueda, consiste en la exploración de nuevos compuestos bioactivos producidos por microorganismos que habitan en condiciones extremas (Goodfellow & Fiedler, 2010), pues es en los ambientes adversos donde los microorganismos han debido desarrollar nuevas estrategias de supervivencia mediante la síntesis de compuestos bioactivos (Maurya, et al., 2020).

Un ambiente de características extremas corresponde al desierto de Atacama, lugar en el que han desarrollado variadas investigaciones por parte del Centro de Biotecnología y Bioingeniería (Centre for Biotechnology and Bioengineering, 2021). A partir de muestras obtenidas del desierto de Atacama se han logrado identificar nuevas especies del género *Streptomyces*: *S. asenjonii*, *S. bullii*, *S. deserti* y *S. leeuwenhoekii* (Goodfellow, et al., 2017) (Santhanam, et al., 2013) (Santhanam, et al., 2012) (Busarakam, et al., 2014). En particular, el género *Streptomyces* corresponde a un nicho importante de moléculas bioactivas y más del 75% de los antibióticos disponibles comercialmente, tanto de uso humano como veterinario, derivan de especies de este género (Law, et al., 2018).

1.2 Motivación

Las enfermedades ocasionadas por infecciones bacterianas pueden ser enfrentadas mediante el uso de antibióticos, los que actúan atacando mecanismos específicos del ciclo de vida de las bacterias responsables de la infección. No obstante, debido al desarrollo de resistencia a antibióticos de las bacterias a través de las generaciones, los tratamientos se han vuelto cada vez menos efectivos. De este modo, surge como necesidad la búsqueda de nuevos compuestos antibióticos que puedan ser utilizados frente a bacterias patógenas resistentes.

Los estudios realizados en especies de *Streptomyces* aisladas del desierto de Atacama han permitido la identificación de moléculas de propiedades antibacterianas contra *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*, como las asenjonamidas A-C y chaxamicinas A-D, producidas por *S. asenjonii* y *S. leeuwenhoekii*, respectivamente (Abdelkader, et al., 2018) (Rateb, et al., 2011). Continuando esta línea de bioprospección de moléculas bioactivas a partir de microorganismos aislados del desierto de Atacama, una de las cepas de interés que ha mostrado presentar bioactividad citotóxica frente células de cáncer de pulmón, melanoma e hígado, es la cepa ST2-7A de *Streptomyces sp.* del Salar de Tara (Guerrero Cassanello, 2019).

Este proyecto tiene por motivación realizar una contribución al combate de infecciones de patógenos multirresistentes. Esto, mediante la identificación de bioactividad antibacteriana de la cepa ST2-7A de *Streptomyces sp.* del Salar de Tara y la optimización de las condiciones de cultivo que permitan maximizar la producción de los metabolitos bioactivos.

1.3 Antecedentes

1.3.1 Cepa ST2-7A de *Streptomyces sp.*

La cepa ST2-7A de *Streptomyces sp.* es uno de los aislados a partir de las muestras tomadas en las expediciones de bioprospección realizadas a fines de 2016 en el Salar de Tara. Esta, junto a otras 8 cepas aisladas de la misma ubicación fueron caracterizadas mediante su gen ribosomal 16S, tras esto, la construcción del árbol filogenético reveló que el pariente filogenético más cercano es la *S. alkaliphilus* (Guerrero, et al., 2017).

El cultivo de la cepa ST2-7A de *Streptomyces sp.* ha sido llevado a cabo en los medios (modificados) *starch casein agar* (SCA) y *tryptic soy broth* (TSB), para cultivo sólido y líquido, respectivamente. En relación con las condiciones de cultivo se ha mostrado que su crecimiento se ve favorecido con un pH 10 inicial y temperatura constante de 33°C, pues permiten reducir la duración de la fase *lag* y obtener una mayor biomasa al llegar al estado estacionario. Además, el uso de almidón como fuente de carbono permite un mejor crecimiento y esporulación frente al uso de glucosa. El escalamiento del cultivo a nivel de laboratorio a un biorreactor de 1 [L] ya ha sido estudiado con anterioridad y se ha verificado que el crecimiento celular durante la fase exponencial se ve favorecido al utilizar un pH inicial 10 (Guerrero Cassanello, 2019).

Una de las principales dificultades asociadas al cultivo en medio líquido de *Streptomyces* corresponde a la aglomeración y formación de *pellets*. Entre las problemáticas originadas por la formación de aglomerados se destacan la transferencia deficiente de masa y oxígeno entre las células y el medio de cultivo, y dificultad para la toma de muestras representativas del cultivo, lo que conlleva a la necesidad de técnicas mecánicas para la ruptura de *pellets* y dificultad para la toma de muestras representativas del cultivo (Koepff, et al., 2017). Estudios sobre el cultivo de *Streptomyces* han permitido determinar una correlación inversa entre el tamaño de los *pellets* formados y la frecuencia de agitación (Gamoá-Suasnavart, et al., 2013) (Koepff, et al., 2017). El cultivo de la cepa ya ha sido

realizado con 160 RPM de agitación, no obstante, no se han explorado variaciones a este parámetro (Guerrero Cassanello, 2019).

Otro parámetro de interés en el cultivo de la cepa corresponde a la salinidad, Guerrero mostró que al cultivar al 10% (m/v) de NaCl se obtiene un mayor crecimiento y una pigmentación amarilla, que declara podría estar relacionada a la producción de metabolitos secundarios (Guerrero, et al., 2020).

1.3.2 Testeo de susceptibilidad a antimicrobianos

El testeo de susceptibilidad a antimicrobianos, o también conocido como antibiograma, es un procedimiento de laboratorio que permite identificar que sustancias antimicrobianas son específicamente efectivas contra diferentes microorganismos infecciosos. De la variedad de procedimientos de testeo, los principales corresponden a los métodos: disco difusión y concentración mínima inhibitoria (CMI) (Bayot & Bragg, 2020).

El método de disco difusión es una técnica cualitativa, estandarizable y recomendada para determinar la sensibilidad bacteriana frente a antibióticos. Para la implementación de esta técnica, primero se debe inocular en una placa de Petri la bacteria objetivo en un medio apto para su crecimiento, luego son depositados sobre la superficie húmeda, del medio de cultivo, discos de papel impregnados con el antibiótico que se desea probar o alícuotas, de este modo, el antibiótico difunde hacia el medio formando un gradiente de concentración. Posteriormente, las placas son incubadas entre 18 y 24 horas, para luego verificar la aparición o no de halos de inhibición de crecimiento (HIC) bacteriano (Taroco, et al., 2006).

La frontera entre la zona de crecimiento y la zona de inhibición se encuentra sujeta a la CMI. Al depositar la solución del metabolito antimicrobiano en la superficie del agar, se forma un gradiente de concentración tal que, cada punto dentro del HIC tiene una concentración igual o mayor a la CMI y los puntos fuera del HIC tienen una concentración menor a la CMI (Bayot & Bragg, 2020).

1.3.3 Descripción y medios de cultivo de bacterias patógenas

1.3.3.1 *Escherichia coli*

Escherichia coli es una enterobacteria considerada modelo de estudio para una gran variedad de procesos biológicos. Esta es un bacilo Gram negativo, anaerobio facultativo, cuyo crecimiento se ve favorecido en temperaturas de 37°C (Croxen, et al., 2013). Comúnmente encontrada en pequeñas proporciones en la flora intestinal humana y si bien, no suele comprometer la salud del hospedero, la proliferación de cepas patogénicas puede causar enfermedades como: bacteriemia, diarrea sangrienta, infecciones de tracto urinario y meningitis neonatal (Allocati, et al., 2013) (Poolman, 2017). El cultivo de esta bacteria puede ser llevado a cabo en los medios *tryptic soy agar* (TSA) y agar Luria Bertani (LB) (Lessard, 2013).

1.3.3.2 *Bacillus subtilis*

Bacillus subtilis es una bacteria de la familia Bacillaceae considerado un modelo estudio de procesos biológicos por sus altamente eficientes sistemas de secreción de proteínas y la adaptabilidad de su metabolismo (Su, et al., 2020). Esta es un bacilo Gram positivo, de metabolismo aeróbico, que usualmente se encuentra en suelos y la flora intestinal de rumiantes y humanos (Bernardeau, et al., 2017) (Errington & van der Aart, 2020). Si bien, la mayoría de las especies del género *Bacillus* no poseen potencial patogénico, *B. cereus* ha sido reportada como causal de contaminaciones alimenticias y hospitalarias (Glasset, et al., 2018) (Barrie, et al., 1994). El cultivo de esta bacteria puede ser llevado a cabo en los medios TSA y LB (iGEM, 2014).

1.3.4 Optimización condiciones de cultivo: Un factor a la vez

El método “un factor a la vez”, o también por su nombre inglés *one-factor-at-a-time* (OFAT), es una metodología que consiste en mantener constantes todos los parámetros del cultivo a excepción de uno. La variación del parámetro se realiza en un rango determinado de valores y se estudian los efectos de estas modificaciones en la producción de biomasa o un compuesto de interés. Esta corresponde a una de las técnicas preferidas por investigadores para el diseño de medios de cultivo. El método OFAT puede ser subclasificado de acuerdo con la naturaleza de las modificaciones a implementar (Singh, et al., 2016):

- Experimentos de eliminación: Se eliminan, uno a la vez, todos los componentes de un medio y se estudia el efecto que tiene en la producción tras un tiempo de incubación apropiado, para cada caso.
- Experimentos de suplementación: Se añaden, uno a la vez, diferentes suplementos al medio de cultivo y se evalúa el impacto de cada uno de estos. Generalmente, se estudia la suplementación de carbono y nitrógeno.
- Experimentos de reemplazo: Para la formulación del medio, se reemplazan fuentes de carbono o nitrógeno por otras que muestren tener un efecto potenciador en la producción al realizar los experimentos de suplementación.
- Experimentos de parámetros físicos: Se modifican parámetros físicos del medio como son el pH, temperatura, requisitos de agitación y aireación, y se evalúan los efectos en la producción.

1.3.5 Extracción líquido-líquido

La extracción líquido-líquido, o también conocida como extracción con disolventes, es una técnica que se utiliza para separar selectivamente los componentes de una mezcla y se basa en la diferencia de solubilidad de un compuesto de interés en líquidos inmiscibles, o parcialmente inmiscibles, entre sí. De este modo, una vez finalizado el cultivo celular se obtiene una fase acuosa que debe ser mezclada con un disolvente orgánico adecuado, que sea capaz de solubilizar la mayor cantidad del producto de interés, la mezcla es agitada para aumentar la superficie de contacto y se deja reposar para que los líquidos separen

por decantación. La elección de un disolvente de extracción adecuado debe cumplir los siguientes requisitos (Angurell, et al., Sin fecha):

- No debe ser miscible con el disolvente original en el que se encuentra el metabolito de interés.
- El compuesto de interés debe ser significativamente más soluble en el disolvente de extracción que en el disolvente original.
- El resto de los componentes del disolvente original deben tener baja solubilidad en el disolvente de extracción.
- El disolvente de extracción debe ser suficientemente volátil para permitir una recuperación sencilla del producto de interés mediante operaciones como destilación o evaporación.

Uno de los métodos utilizados para identificar disolventes de extracción corresponde a la metodología de partición Kupchan, que utiliza como disolventes: cloroformo, éter de petróleo y tetracloruro de carbono (Kupchan, et al., 1973). No obstante, se decide reemplazar el cloroformo y tetracloruro de carbono, por alternativas que posean una polaridad similar, menor toxicidad y menor valor económico. De este modo, se evita la presencia de trazas de carácter nocivo en el extracto de metabolitos bioactivos (que podrían perjudicar el resultado del bioensayo) y se reducen los costos de investigación asociados. La versión modificada de la metodología de partición Kupchan a implementar en esta memoria de titulación considera el uso de éter de petróleo, etilo acetato y tetrahidrofurano.

1.4 Descripción del proyecto

En este proyecto se busca identificar la actividad antibacteriana de la cepa ST2-7A de *Streptomyces sp.* del Salar de Tara contra cepas de *Escherichia coli* y *Bacillus subtilis*. Se optimizarán las condiciones de cultivo mediante la variación de pH, temperatura, salinidad y agitación para maximizar la producción de metabolitos bioactivos mediante el método OFAT. Las variaciones en la producción de metabolitos bioactivos serán evaluadas según la formación de halos de inhibición de crecimiento al aplicar la técnica de testeado de susceptibilidad a antimicrobianos de disco difusión. Luego, tras determinar las condiciones de cultivo óptimas para la producción de metabolitos bioactivos se compara la cinética de crecimiento bajo las condiciones originales (óptimas para el crecimiento de biomasa) y las condiciones óptimas determinadas en este trabajo. Posteriormente, se realiza un escalamiento del volumen de cultivo a nivel de laboratorio a un biorreactor de 1 [L], en el que se logran mejores condiciones de agitación y aireación, respecto a los cultivos en matraces, además de permitir el control de pH.

1.5 Justificación

La realización de esta memoria de titulación es un aporte a la salud pública, pues contribuye directamente a la medicina e industria farmacéutica mediante la búsqueda de nuevas sustancias antibacterianas que puedan ser utilizadas frente a patógenos multirresistentes. Además, la optimización de condiciones de cultivo permite aumentar la

producción de molécula de interés manteniendo costos similares de operación. De este modo, se reducirán los costos de investigación y desarrollo de un nuevo posible antibiótico, lo que facilitaría y fomentaría la producción de un nuevo medicamento.

1.6 Objetivos

Para el desarrollo del proyecto descrito se plantean los siguientes objetivos:

1.6.1 General

- Determinar la actividad antibacteriana de la cepa ST2-7A de *Streptomyces sp.* del Salar de Tara, maximizando la producción de metabolitos bioactivos.

1.6.2 Específicos

- Adaptar y probar protocolos de extracción de metabolitos bioactivos a partir de cultivos para identificar la actividad antibacteriana de la cepa ST2-7A de *Streptomyces sp.* del Salar de Tara.
- Optimizar las condiciones de cultivo de la cepa ST2-7A de *Streptomyces sp.* del Salar de Tara para maximizar la producción de metabolitos bioactivos variando pH, agitación, temperatura y salinidad.
- Determinar y comparar parámetros de la cinética de crecimiento del cultivo de la cepa ST2-7A de *Streptomyces sp.* del Salar de Tara en condiciones de cultivo originales y optimizadas para la producción de metabolitos bioactivos.
- Estudiar las modificaciones propuestas al escalar el volumen de cultivo a nivel de laboratorio a un biorreactor de 1 litro.

1.7 Alcances

En este trabajo de título se realiza la elección de un disolvente de extracción de metabolitos bioactivos entre éter de petróleo, etilo acetato y tetrahidrofurano. La optimización de las condiciones de cultivo para maximizar la producción de metabolitos se realiza modificando pH, temperatura, agitación y salinidad, sólo en los rangos que sean declarados en la sección de metodología. Los bioensayos para determinar la bioactividad antibiótica se realizarán contra una bacteria Gram negativa (*E. coli*) y una Gram positiva (*B. subtilis*). En los cultivos en biorreactor solo se compara el uso de pH inicial 9 (sin control) versus utilizar pH 9 constante.

1.8 Limitaciones

La ejecución de este proyecto tiene las siguientes limitaciones:

- Debido a que los metabolitos bioactivos aún no se encuentran identificados, ni tampoco se tienen métodos estandarizados para su cuantificación, las variaciones en la producción de metabolitos bioactivos serán evaluadas mediante el método de

disco difusión, que se basa en la medición de halos inhibición de crecimiento. Por el mismo motivo, tampoco se determinará la concentración mínima inhibitoria.

2 Materiales y metodología

2.1 Materiales

La esterilización del material se lleva a cabo en una autoclave BioMedic Daihan LabTech Co. Ltd. Modelo LaC-5100SD.

2.1 Cultivo de la cepa ST2-7A de *Streptomyces sp.*

- Almidón soluble (CAS: 9005-84-9 Winkler Ltda.)
- Antiespumante (Antifoam 289 SIGMA)
- Asa metálica graduada de 10 [μL]
- Cloruro de calcio dihidratado (CAS: 10035-04-8 Winkler Ltda.)
- Cloruro de sodio (CAS: 7647-14-5 PanReact)
- Matraces Erlenmeyer de 250 [mL] con 4 bafles (KIMAX®)
- Peptona de soya (CAS: 91079-46-8 Merck)
- pHmetro (CORNING pH meter 320)
- Pipeta de 200 [μL]
- Pipetas Pasteur (HIRSCHMANN®)
- Solución de ácido clorhídrico 4 [M]
- Solución de hidróxido de sodio 4 [M]
- Thermoshaker (LabTech Modelo LSI-3016R)

2.1.1 Elección de disolvente orgánico

- Bomba de vacío 1,7 [m³/h] (Vacuubrand GMBH+CO Modelo MZ 2C)
- Cabina de extracción de flujo (ESCO Modelo EBD-4Ao)
- Centrifuga (eppendorf Centrifuge 5804 R)
- Embudo de decantación 500 [mL]
- Éter de petróleo 40-60°C para análisis, ACS, ISO (Index No: 649-328-00-1 PanReac AppliChem)
- Etilo acetato (141-78-6 Winkler Ltda.)
- Metanol grado técnico (CAS: 67-56-1 Winkler Ltda.)
- Rotoevaporador (DragonLab Re100-Pro)
- Tetrahidrofurano para análisis (CAS: 109-99-9 Merck)
- Tubos de centrifuga 50 [mL] (CITOTEST®)

2.1.2 Extracción de metabolitos bioactivos mediante disolvente orgánico

- Bomba de vacío 1,7 [m³/h] (Vacuubrand GMBH+CO Modelo MZ 2C)
- Cabina de extracción de flujo (ESCO Modelo EBD-4Ao)
- Centrifuga (eppendorf Centrifuge 5804 R)
- Embudo de decantación 500 [mL]

- Éter de petróleo 40-60°C para análisis, ACS, ISO (Index No: 649-328-00-1 PanReac AppliChem)
- Metanol grado técnico (CAS: 67-56-1 Winkler Ltda.)
- Rotoevaporador (DragonLab Re100-Pro)
- Tubos de centrifuga 50 [mL] (CITOTEST®)

2.1.3 Bioensayos

- Bacto™ Agar (REF: 214010 Becton, Dickinson and Company)
- Botella 500 [mL] (Schott)
- Campana de flujo laminar (BIOBASE Modelo BBS-H1300)
- Cubetas para espectrofotómetro
- Difco™ Luria Broth Base, Miller (REF: 211420 Becton, Dickinson and Company)
- Espectrofotómetro (Spectronic Unicam Modelo Genesys 10 UV)
- Estufa para cultivo (Gallenkamp *Economy Incubator with fan Size 2*)
- Matraces Erlenmeyer de 50 y 250 [mL] (KIMAX®)
- Pipetas 200 y 1000 [μL]
- Placas de Petri (CITOTEST®)

2.1.4 Mantenimiento de bacterias patógenas

- Asa metálica graduada de 10 [μL]
- Bacto™ Agar (REF: 214010 Becton, Dickinson and Company)
- Botella 500 [mL] (Schott)
- Difco™ Luria Broth Base, Miller (REF: 211420 Becton, Dickinson and Company)
- Estufa para cultivo (Gallenkamp *Economy Incubator with fan Size 2*)
- Placas de Petri (CITOTEST®)

2.1.5 Cinética de Crecimiento

- Balanza analítica (OHAUS® Analytical Plus Modelo AP210-0)
- Botella 500 [mL] (Schott)
- Cloruro de calcio dihidratado (CAS: 10035-04-8 Winkler Ltda.)
- Cloruro de potasio (CAS: 7447-40-7 Merck)
- Cloruro de sodio (CAS: 7647-14-5 PanReac)
- Cubetas para espectrofotómetro
- Espectrofotómetro (Spectronic Unicam Modelo Genesys 10 UV)
- Matraces Erlenmeyer de 50 [mL] (KIMAX®)
- Matraces Erlenmeyer de 250 [mL] con 4 baffles (KIMAX®)
- Pipeta de 1000 [μL]
- Solución de ácido clorhídrico 4 [M]
- Solución de hidróxido de sodio 4 [M]
- Bicarbonato de sodio 0,05 (CAS: 144-55-8 SIGMA)
- Tubos para microcentrifuga 1,5 [mL] estériles (AXYGEN®)
- Microcentrifuga (DLab D3024)

2.1.6 Escalamiento en biorreactor

- Almidón soluble (CAS: 9005-84-9 Winkler Ltda.)
- Antiespumante (Antifoam 289 SIGMA)
- Asa metálica graduada de 10 [μL]
- Cloruro de calcio dihidratado (CAS: 10035-04-8 Winkler Ltda.)
- Cloruro de sodio (CAS: 7647-14-5 PanReact)
- Equipo de cultivo BIOSTAT®B.
- Fermentador de 1,5 [L] de BIOSTAT®B.
- Jeringas quirúrgicas 5 [mL]
- Matraz Erlenmeyer de 250 [mL] con salida inferior (KIMAX®)
- Peptona de soya (CAS: 91079-46-8 Merck)
- pHmetro (CORNING pH meter 320)
- Pipeta de 200 [μL]
- Pipetas Pasteur (HIRSCHMANN®)
- Sensores de temperatura y pH de BIOSTAT®B para volumen de 1,5 [L]
- Solución de ácido clorhídrico 4 [M]
- Solución de hidróxido de sodio 1 y 4 [M]
- Thermoshaker (LabTech Modelo LSI-3016R)

2.2 Metodología

La realización de todos los procedimientos se debe llevar a cabo utilizando elementos estériles y los elementos de seguridad necesarios: delantal, guantes de vinilo y mascarilla. Por otra parte, la toma de muestras de los cultivos e inoculaciones se deben realizar en un área estéril bajo mechero.

2.2.1 Cultivos de la cepa ST2-7A de *Streptomyces sp.*

La cepa de ST2-7A de *Streptomyces sp.* ha sido conservada como espora en un stock de glicerol a -80°C.

2.2.1.1 Cultivo en condiciones originales

- 1) Se preparan 3 matraces de 250 [mL] con 3 baffles. A cada matraz se añaden 1 [g] de peptona de soya, 1 [g] de almidón soluble, 1 [g] de cloruro de sodio, 0,1 [g] de cloruro de calcio dihidrato y 100 [mL] de agua destilada.
- 2) Los matraces se ajustan en pH 10, utilizando pipetas Pasteur y diluciones de hidróxido de sodio (NaOH) 4 [M] y ácido clorhídrico (HCl) 4 [M], para subir o bajar el pH, respectivamente.
- 3) Se autoclavan los matraces durante 15 [min] a 121°C.
- 4) A cada matraz se añaden 10 [μL] de antiespumante¹ (previamente autoclavado).

¹ El antiespumante es un líquido viscoso y se recomienda añadirlo cuando aún se encuentra tibio o caliente, de lo contrario su manipulación con la pipeta se verá dificultada.

- 5) Con el asa metálica se inoculan los matraces a partir del stock de la cepa ST2-7A de *Streptomyces sp.*
- 6) Los matraces son incubados en *thermoshaker* durante 72 [h] a 160 RPM y 33°C.

2.2.1.2 Variación de pH

- 1) Se preparan 2 matraces con 4 baffles por cada pH a evaluar (9, 10 y 11). A cada matraz se añaden 1 [g] de peptona de soya, 1 [g] de almidón soluble, 1 [g] de cloruro de sodio, 0,1 [g] de cloruro de calcio dihidrato y 100 [mL] de agua destilada.
- 2) Se ajusta el pH de cada matraz, y su duplicado, a los valores 9, 10 y 11, utilizando pipetas Pasteur y diluciones de hidróxido de sodio (NaOH) 4 [M] y ácido clorhídrico (HCl) 4 [M], para subir o bajar el pH, respectivamente.
- 3) Se autoclavan los matraces durante 15 [min] a 121°C.
- 4) A cada matraz se añaden 10 [μL] de antiespumante (previamente autoclavado).
- 5) Con el asa metálica se inoculan los matraces a partir del stock de la cepa ST2-7A de *Streptomyces sp.*
- 6) Los matraces son incubados en *thermoshaker* durante 72 [h] a 160 RPM y 33°C.

2.2.1.3 Variación de agitación

- 1) Se preparan 2 matraces con 4 baffles por cada agitación a evaluar (160, 200 y 240 RPM). A cada matraz se añaden 1 [g] de peptona de soya, 1 [g] de almidón soluble, 1 [g] de cloruro de sodio, 0,1 [g] de cloruro de calcio dihidrato y 100 [mL] de agua destilada.
- 2) Se ajusta el pH de cada matraz, y su duplicado, al valor 10, utilizando pipetas Pasteur y diluciones de hidróxido de sodio (NaOH) 4 [M] y ácido clorhídrico (HCl) 4 [M], para subir o bajar el pH, respectivamente.
- 3) Se autoclavan los matraces durante 15 [min] a 121°C.
- 4) A cada matraz se añaden 10 [μL] de antiespumante (previamente autoclavado).
- 5) Con el asa metálica se inoculan los matraces a partir del stock de la cepa ST2-7A de *Streptomyces sp.*
- 6) Los matraces son incubados en *thermoshakers* durante 72 [h] y 33°C, utilizando las agitaciones 160, 200 y 240 RPM.

2.2.1.4 Variación de temperatura

- 1) Se preparan 2 matraces con 4 baffles por cada temperatura a evaluar (33, 35 y 37°C). A cada matraz se añaden 1 [g] de peptona de soya, 1 [g] de almidón soluble, 1 [g] de cloruro de sodio, 0,1 [g] de cloruro de calcio dihidrato y 100 [mL] de agua destilada.
- 2) Se ajusta el pH de cada matraz, y su duplicado, al valor 10, utilizando pipetas Pasteur y diluciones de hidróxido de sodio (NaOH) 4 [M] y ácido clorhídrico (HCl) 4 [M], para subir o bajar el pH, respectivamente.
- 7) Se autoclavan los matraces durante 15 [min] a 121°C.
- 3) A cada matraz se añaden 10 [μL] de antiespumante (previamente autoclavado).

- 4) Con el asa metálica se inoculan los matraces a partir del stock de la cepa ST2-7A de *Streptomyces sp.*
- 5) Los matraces son incubados en *thermoshakers* durante 72 [h] a 160 RPM, utilizando las temperaturas 33, 35 y 37°C.

2.2.1.5 Variación de salinidad

- 1) Se preparan 2 matraces con 4 baffles por cada salinidad a evaluar (10, 15 y 20 %). A cada matraz se añaden 1 [g] de peptona de soya, 1 [g] de almidón soluble, 0,1 [g] de cloruro de calcio dihidrato, según corresponda, 1, 1,5 o 2 [g] de cloruro de sodio y 100 [mL] de agua destilada.
- 2) Se ajusta el pH de cada matraz, y su duplicado, al valor 10, utilizando pipetas Pasteur y diluciones de hidróxido de sodio (NaOH) 4 [M] y ácido clorhídrico (HCl) 4 [M], para subir o bajar el pH, respectivamente.
- 3) Se autoclavan los matraces durante 1 [h] a 121°C.
- 4) A cada matraz se añaden 10 [μL] de antiespumante (previamente autoclavado).
- 5) Con el asa metálica se inoculan los matraces a partir del stock de la cepa ST2-7A de *Streptomyces sp.*
- 6) Los matraces son incubados en *thermoshaker* durante 72 [h] a 160 RPM y 33°C.

2.2.1.6 Cultivo en condiciones optimizadas

- 1) Se preparan 3 matraces de 250 [mL] con 4 baffles. A cada matraz se añaden 1 [g] de peptona de soya, 1 [g] de almidón soluble, 1,5 [g] de cloruro de sodio, 0,1 [g] de cloruro de calcio dihidrato y 100 [mL] de agua destilada.
- 2) Los matraces se ajustan en pH 9, utilizando pipetas Pasteur y diluciones de hidróxido de sodio (NaOH) 4 [M] y ácido clorhídrico (HCl) 4 [M], para subir o bajar el pH, respectivamente.
- 3) Se autoclavan los matraces durante 1 [h] a 121°C.
- 4) A cada matraz se añaden 10 [μL] de antiespumante (previamente autoclavado).
- 5) Con el asa metálica se inoculan los matraces a partir del stock de la cepa ST2-7A de *Streptomyces sp.*
- 6) Los matraces son incubados en *thermoshaker* durante 72 [h] a 160 RPM y 35°C.

2.2.2 Elección de disolvente orgánico

A partir de un cultivo en condiciones originales de la cepa ST2-7A de *Streptomyces sp.*

- 1) Los medios son centrifugados a 10000 RPM durante 10 [min]. Luego, se recupera el sobrenadante y se repite el proceso. Los *pellets* son descartados.
- 2) Trabajando bajo campana de extracción de flujo, en el embudo de decantación se añaden el sobrenadante y éter de petróleo en la razón 1:1 (v/v), se agita vigorosamente y se deja reposar durante 2 [min].
- 3) Se recuperan la fase acuosa (inferior) y orgánica (superior).

- 4) En el embudo de decantación, se añaden la fase acuosa recién recuperada y etilo acetato en la razón 1:1 (v/v), se agita vigorosamente y se deja reposar durante 2 [min].
- 5) Se recuperan la fase acuosa (inferior) y orgánica (superior).
- 6) En el embudo de decantación, se añaden la fase acuosa recién recuperada y tetrahidrofurano en la razón 1:1 (v/v), se agita vigorosamente y se deja reposar durante 2 [min].
- 7) Se recuperan la fase acuosa (inferior) y orgánica (superior).
- 8) Las fases acuosas y orgánicas obtenidas son evaporadas en el rotoevaporador a 100 RPM y 33°C. El protocolo de uso del rotoevaporador se muestra en el Anexo A.
- 9) Los metabolitos bioactivos son resuspendidos en 10 [mL] de metanol.
- 10) Se realizan bioensayos contra *E. coli* y *B. subtilis* con el procedimiento que se muestra en la sección 2.2.4.

2.2.3 Extracción de metabolitos bioactivos por disolvente orgánico

A partir de cultivos donde se realizan variaciones a las condiciones y medio de cultivo de la cepa ST2-7A de *Streptomyces sp.*

- 1) Los medios son centrifugados a 10000 RPM durante 10 [min]. Luego, se recupera el sobrenadante y se repite el proceso. Los *pellets* son descartados.
- 2) Trabajando bajo campana de extracción de flujo, en el embudo de decantación se añaden el sobrenadante y éter de petróleo en la razón 1:1 (v/v), se agita vigorosamente y se deja reposar durante 2 [min]².
- 3) Se recupera la fase acuosa abriendo la llave de paso.
- 4) Se añade nuevamente la fase acuosa recuperada en 3), se agita vigorosamente y se deja reposar durante 2 [min].
- 5) Se extrae la fase acuosa abriendo la llave de paso y esta es descartada, la fase orgánica superior es recuperada por la parte superior del embudo de decantación.
- 6) Para cada muestra se mide el volumen de fase orgánica obtenido (V_o).
- 7) Luego, la fase orgánica es evaporada en el rotoevaporador a 100 RPM y 33°C.
- 8) Se recuperan los metabolitos bioactivos utilizando un volumen de metanol (V_m) determinado según la ecuación (1).

$$V_m = V_o \cdot \frac{3}{7} \quad (1)$$

² Durante la extracción se puede formar una estructura gelatinosa que debe ser descartada, de lo contrario al realizar los bioensayos se observarán zonas de sobrecrecimiento, para eliminar la estructura gelatinosa aumente el tiempo de reposo.

2.2.4 Bioensayo

Las bacterias de prueba *Escherichia coli* y *Bacillus subtilis* son conservadas en medio sólido en placas Petri con agar LB en cámara de frío a 4°C. El mantenimiento de estas se realiza cada 2 semanas.

- 1) Se preparan 2 matraces de 50 [mL] para el cultivo de preinóculos de *E. coli* y *B. subtilis*. A estos se añaden 0,155 [g] de medio LB y 10 [mL] de agua destilada.
- 2) Se preparan 2 matraces de 250 [mL] para el cultivo de inóculos de *E. coli* y *B. subtilis*. A estos se añaden 1,55 [g] de medio LB y 100 [mL] de agua destilada.
- 3) Se prepara en una botella de 500 [mL] el medio sólido para los bioensayos. A esta se añade 3,55 [g] de medio LB, 3,525 [g] de agar y 350 [mL] de agua destilada.
- 4) Los matraces y botella son autoclavados durante 15 [min] a 121°C.
- 5) Los matraces para el inóculo son almacenados en cámara de frío a 4°C y la botella Schott en la estufa a 60°C hasta su uso.
- 6) Con el asa metálica se añaden a cada matraz de preinóculo biomasa del stock de *E. coli* y *B. subtilis*. Estos son cultivados *overnight* en *thermoshaker* a 200 RPM y 37°C.
- 7) Luego, se preparan los cultivos de los inóculos añadiendo a cada matraz 5 [mL] de su preinóculo respectivo. Estos son cultivados en *thermoshaker* a 200 RPM y 37°C.
- 8) En la cabina de bioseguridad se preparan las placas de Petri para el bioensayo. Para esto utilizando una regla se marcan 4 puntos, equidistantes entre sí, a 2,5 [cm] del centro. El bioensayo se trabaja en triplicado y el punto restante es utilizado como control negativo.
- 9) A partir de los 90 [min] de cultivo, se mide la densidad óptica (OD600) de los inóculos utilizando el espectrofotómetro. La medición se realiza utilizando como blanco agua miliQ y longitud de onda 600 [nm]. Se realizan mediciones cada 10 [min] hasta que la OD600 alcance un valor cercano a 0,6.
- 10) Luego, en un tubo de centrifuga estéril se mezclan el agar LB y el inóculo de *E. coli* o *B. subtilis* siguiendo la proporción mostrada en la ecuación (2), donde (V_{in}) y (V_A), son los volúmenes del inóculo y agar LB, respectivamente. La mezcla es trasvasijada en las placas y se espera hasta que gelifiquen.

$$V_{in} = \frac{0,0125 \times V_A}{OD600} (2)$$

- 11) A cada placa se aplican alícuotas de 25 [μ L] de las muestras de metabolitos bioactivos, suspendidas en metanol, al control negativo 25 [μ L] de metanol.
- 12) Dos placas son utilizadas como control positivo, una para cada microorganismo, se utilizan 25 [μ L] de cloranfenicol y carbomicina a 50 [mg/mL] para *E. coli* y *B. subtilis*, respectivamente.
- 13) Las placas son incubadas en la estufa para cultivos a 37°C durante 24 [h].
- 14) Con una regla se miden los diámetros de los halos de inhibición de crecimiento.

2.2.5 Mantenimiento de bacterias patógenas

- 1) En una botella de 250 [mL] se prepara agar LB, para esto se añaden 1,015 [g] de medio LB, 1,007 [g] de agar y 100 [mL] de agua destilada.
- 2) La botella es autoclavada durante 15 [min] a 121°C.
- 3) En la cabina de bioseguridad se preparan 4 placas Petri con el agar LB y se espera hasta que gelifiquen.
- 4) Con el asa metálica se realiza la siembra de las placas Petri, inoculando 2 con *E. coli* y 2 con *B. subtilis*, a partir del stock más reciente y que haya mostrado un mayor crecimiento.
- 5) Las placas son incubadas en la estufa para cultivos a 37°C durante 24 [h].
- 6) Luego, las placas son almacenadas en frío a 4°C.

2.2.6 Cinética de crecimiento

2.2.6.1 Cultivo en condiciones originales y óptimas

- 1) Se preparan dos matraces Erlenmeyer 50 [mL] con medio de cultivo original y óptimo para los preinóculos. Su preparación viene dada por:
 - a. Medio original: se añaden 0,2 [g] de peptona de soya, 0,2 [g] de almidón soluble, 0,2 [g] de cloruro de sodio, 0,02 [g] de cloruro de calcio dihidratado y 20 [mL] de agua destilada.
 - b. Medio óptimo: se añaden 0,2 [g] de peptona de soya, 0,2 [g] de almidón soluble, 0,3 [g] de cloruro de sodio, 0,02 [g] de cloruro de calcio dihidratado y 20 [mL] de agua destilada.
- 2) Se preparan matraces Erlenmeyer 250 [mL] con 4 baffles para el cultivo en medio original y óptimo, cada uno en triplicado. Su preparación viene dada por:
 - a. Medio original: se añaden 1 [g] de peptona de soya, 1 [g] de almidón soluble, 1 [g] de cloruro de sodio, 0,1 [g] de cloruro de calcio dihidratado y 100 [mL] de agua destilada.
 - b. Medio óptimo: se añaden 1 [g] de peptona de soya, 1 [g] de almidón soluble, 1,5 [g] de cloruro de sodio, 0,1 [g] de cloruro de calcio dihidratado y 100 [mL] de agua destilada.
- 3) Se ajusta el pH de cada matraz utilizando pipetas Pasteur y diluciones de hidróxido de sodio (NaOH) 4 [M] y ácido clorhídrico (HCl) 4 [M], para subir o bajar el pH, respectivamente. Los matraces con medio original se ajustan a pH 10 y con medio óptimo a pH 9.
- 4) Los matraces son autoclavados durante 15 [min] a 121°C.
- 5) A los matraces con baffles se añaden 10 [μL] de antiespumante (previamente autoclavado). Estos son guardados en cámara de frío a 4°C hasta su uso.
- 6) Con un asa metálica se inoculan los matraces para preinóculos a partir del stock de la cepa ST2-7A de *Streptomyces sp.* Los matraces son incubados en *thermoshaker* a 160 RPM, 33°C y 35°C para condiciones originales y óptimas, respectivamente, durante 48 [h].

- 7) Luego, se inoculan los matraces con baffles con 5 [mL] del preinóculo. Los matraces son incubados en *thermoshaker* a 160 RPM, 33°C y 35°C para condiciones originales y óptimas, respectivamente, durante 72 [h].

2.2.6.2 Medición absorbancia y peso seco

- 1) En una botella de 250 [mL] se prepara solución Ringer a concentración $\frac{1}{4}$, para esto se añaden 0,45 [g] de cloruro de sodio, 0,021 [g] de cloruro de potasio, 0,024 [g] de cloruro de calcio dihidratado, 0,01 [g] de bicarbonato de sodio y 200 [mL] de agua destilada.
- 2) La botella es autoclavada durante 15 [min] a 121°C.
- 3) Al iniciar los cultivos en matraces con baffles, se extraen dos muestras de 1 [mL] de los matraces de preinóculo que son depositadas en tubos de microcentrífuga.
- 4) A partir del momento de inoculación, se extraen dos muestras de 1 [mL] de cada matraz y se depositan en tubos de microcentrífuga. La toma de muestras se realiza cada 2 [h], hasta detectar el inicio de la fase de crecimiento exponencial, iniciada esta se toman muestras cada 1 [h] hasta tener al menos 5 datos, luego, se toman muestras cada 24 [h].
- 5) Una de las muestras es destinada para la medición de absorbancia.
 - a. Los tubos son centrifugados a 10000 RPM durante 5 [min], con cuidado, el sobrenadante es descartado.
 - b. El *pellet* húmedo es resuspendido en 1 [mL] de la solución Ringer.
 - c. En el espectrofotómetro se mide absorbancia a 600 [nm] utilizando como blanco la solución Ringer.
 - d. Si la medición resulta en un valor mayor a 2, la muestra debe ser diluida en 1 [mL] de solución Ringer
 - e. Se repite hasta que el valor de OD600 sea menor a 2.
- 6) Una de las muestras es destinada para la medición de peso seco, para esto:
 - a. Se masan los tubos con la muestra en la balanza analítica.
 - b. Los tubos son centrifugados a 10000 RPM durante 5 [min], con cuidado, el sobrenadante es descartado.
 - c. Los tubos con el *pellet* húmedo son secados *overnight* en la estufa a 60°C.
 - d. Los tubos con el *pellet* seco son masados en la balanza analítica.

2.2.6.3 Escalamiento en biorreactor

- 1) Se prepara en un matraz Erlenmeyer con salida inferior de 250 [mL] medio de cultivo óptimo para el preinóculo. Para esto, se añaden 0,5 [g] de peptona de soya, 0,5 [g] de almidón soluble, 0,75 [g] de cloruro de sodio, 0,05 [g] de cloruro de calcio dihidratado y 50 [mL] de agua destilada.
- 2) Se prepara en el biorreactor BIOSTAT® medio de cultivo. Para esto, se añaden 10 [g] de peptona de soya, 10 [g] de almidón soluble, 15 [g] de cloruro de sodio, 1 [g] de cloruro de calcio dihidratado y 1 [L] de agua destilada. Para el montaje del equipo se conectan sensores de temperatura y pH.

- 3) Se ajusta el pH de medio del matraz y biorreactor en 9, utilizando pipetas Pasteur y diluciones de hidróxido de sodio (NaOH) 4 [M] y ácido clorhídrico (HCl) 4 [M], para subir o bajar el pH, respectivamente.
- 4) El matraz y biorreactor son autoclavados durante 15 [min] a 121°C.
- 5) Con un asa metálica se inocula el matraz a partir del stock de la cepa ST2-7A de *Streptomyces sp.* Este es incubado en *thermoshaker* a 160 RPM y 35°C durante 48 [h].
- 6) Previo a la inoculación del biorreactor se añade con una jeringa 50 [μL] de antiespumante, se conecta la alimentación del flujo de aire a 3 [L/min], el rotor a 160 RPM y la chaqueta térmica a 35°C.
- 7) Luego, el contenido del matraz es trasvasiado al biorreactor para su inoculación.
- 8) El cultivo en biorreactor se lleva a cabo de dos maneras:
 - a. Se ajusta a pH inicial 9, sin controlar esta variable durante la fermentación.
 - b. Se controla el pH, manteniendo su valor constante en 9, para esto se conecta una solución de hidróxido de sodio (NaOH) 1 [M] (previamente autoclavada) a la bomba del biorreactor.
- 9) Con jeringas quirúrgicas se toman muestras de 1 [mL] a las 0, 2, 3, 4, 5, 6, 24, 48 y 72 [h] desde la inoculación y se realizan mediciones de OD600 según el procedimiento de la sección 2.2.6.2.
- 10) Transcurridas las 72 [h] de cultivo, se realiza la extracción de metabolitos bioactivos según el procedimiento descrito en la sección 2.2.3. A 125 [mL] de cultivo se realiza la extracción en proporción 1:1 (sobrenadante de medio:disolvente) y al medio restante se realiza en proporción 8:1.
- 11) Se realizan bioensayos según el procedimiento descrito en la sección 2.2.4.

3 Resultados y discusión

3.1 Elección disolvente orgánico

Al utilizar los diferentes disolventes orgánicos, según la versión modificada del método Kupchan para la extracción de metabolitos, se encontró que el único que logró generar bioactividad fue el éter de petróleo, como se muestra en la Figura 1. Por el contrario, el uso de la fase acuosa (medio de cultivo centrifugado), etilo acetato y tetrahidrofurano generaron zonas de crecimiento microbiano.

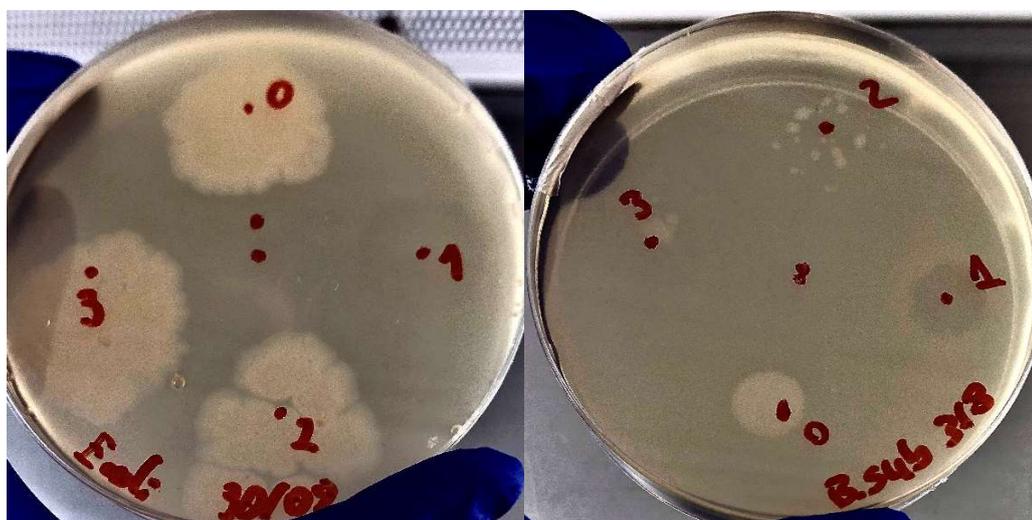


Figura 1: Actividad antibiótica de la cepa ST2-7A de *Streptomyces sp.* utilizando diferentes disolventes orgánicos para la extracción de metabolitos bioactivos frente a *E. coli* (izquierda) y *B. subtilis* (derecha). Extracciones con (0): fase acuosa, (1): éter de petróleo, (2): etilo acetato y (3): tetrahidrofurano.

Tras la realización de la prueba preliminar para la elección del disolvente de extracción de metabolitos bioactivos se encontró que solo el uso de éter de petróleo logró mostrar actividad antibacteriana, de este modo, en las etapas siguientes las extracciones solo se utilizó dicho compuesto. Posteriormente se corroboró que el mismo disolvente no sea causante de la bioactividad. Además, el éter de petróleo fue el disolvente orgánico más apolar utilizado, por lo tanto, es probable que el metabolito de interés posea una estructura apolar. Por el contrario, el uso de la fase acuosa, etilo acetato y tetrahidrofurano generaron zonas de crecimiento microbiano, esto se puede deber a que otras moléculas de características nutritivas, como proteínas o carbohidratos, solubilicen en los mencionados. El éter de petróleo corresponde a una mezcla de compuestos orgánicos, de este modo, el procedimiento de extracción podría un mejor desempeño identificando el compuesto por el cual el metabolito tenga mayor afinidad. Otros disolventes de extracción apolares que podrían ser estudiados son hexano, benceno y éter dietílico.

Con la ejecución de bioensayos se logró verificar la bioactividad antibacteriana contra bacterias Gram positiva y negativa, *Escherichia coli* y *Bacillus subtilis*, respectivamente. Esto es un precedente favorable para la realización de pruebas frente a bacterias

epidemiológicamente más relevantes como pueden ser los patógenos alimentarios de los géneros *Listeria*, *Staphylococcus* y *Salmonella*. El estudio de la bioactividad antibacteriana de la cepa ST2-7A de *Streptomyces sp.* puede ser abordado con interés veterinario o agrícola, aumentando así también la variedad de bacterias objetivo para la identificación de bioactividad.

3.2 Condiciones de cultivo

Al variar, una a la vez, las condiciones de cultivo de la cepa ST2-7A de *Streptomyces sp.* se registraron los diámetros de los HIC. El detalle de las mediciones se muestra en Anexo B.

3.2.1 Variación de pH

Los porcentajes de inhibición antibiótica respecto al control positivo variando el pH se muestran en la *Figura 2*. Del gráfico se puede observar que la mayor bioactividad se obtuvo al ajustar el medio de cultivo a pH 9, obteniendo una mejora del 7% respecto a las condiciones de cultivo originales (pH 10), para *E. coli* y *B. subtilis*. Por otra parte, utilizar un pH 11 conllevó a una variación del 2% respecto al medio original, siendo una disminución frente a *E. coli* y, por el contrario, un aumento frente a *B. subtilis*.

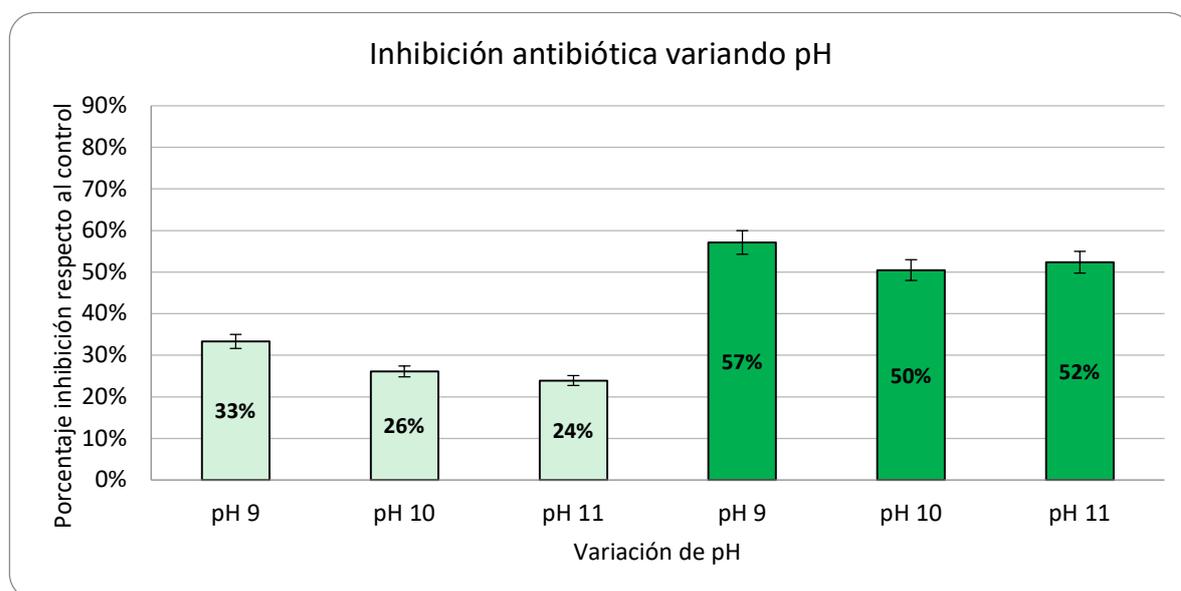


Figura 2: Actividad antibiótica de la cepa ST2-7A de *Streptomyces sp.* variando el pH. Las barras color verde claro indican bioactividad contra *E. coli* y las barras color verde oscuro bioactividad contra *B. subtilis*. El porcentaje de bioactividad mostrado es relativo al control positivo (cloranfenicol para Gram- y carbomicina para Gram+, ambos a 50 [mg/mL]).

Las diferencias en el porcentaje de inhibición respecto al control son máximas al comparar pH 9 y pH 11 frente a *E. coli*, por otra parte, la menor bioactividad se obtiene a pH 10 contra *B. subtilis*. Las diferencias en la producción de metabolitos bioactivos se pueden

deber a diferencias en el crecimiento de biomasa y no necesariamente al impacto del pH en los mecanismos de síntesis del metabolito.

3.2.2 Variación de agitación

Los porcentajes de inhibición antibiótica respecto al control positivo variando la agitación se muestran en la Figura 3. Del gráfico se puede observar que la mayor bioactividad se obtuvo al utilizar 160 RPM frente a *E. coli* y *B. subtilis*. Además, se puede notar que la bioactividad disminuyó al aumentar la agitación en los bioensayos contra *E. coli*, en contraste, no hubo variaciones significativas frente a *B. subtilis*.

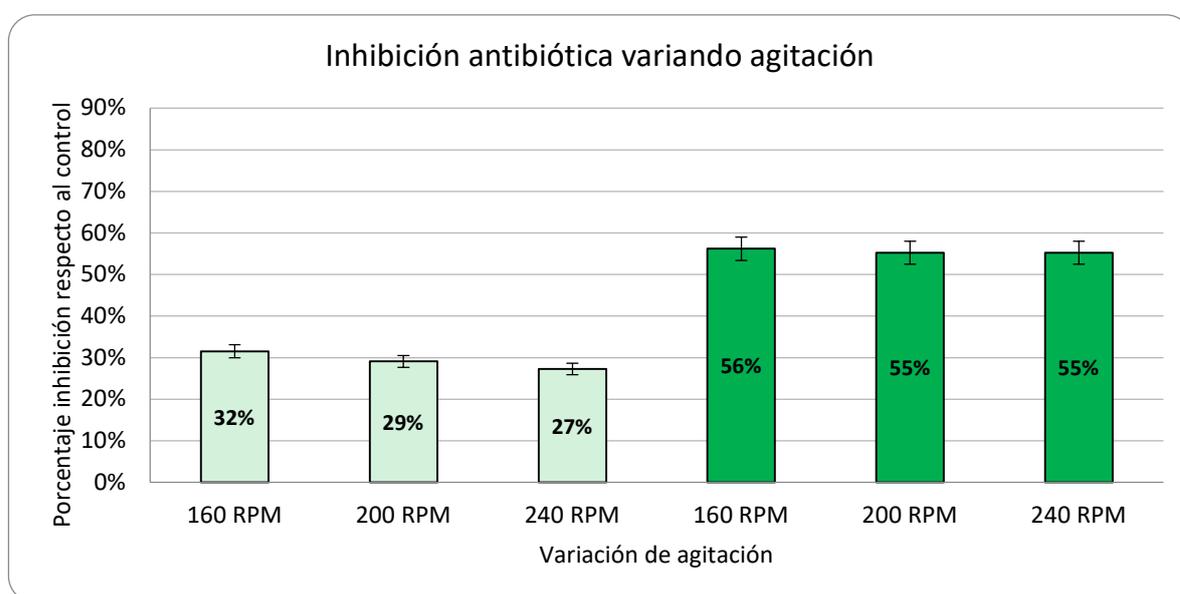


Figura 3: Actividad antibiótica de la cepa ST2-7A de *Streptomyces sp.* variando la agitación. Las barras color verde claro indican bioactividad contra *E. coli* y las barras color verde oscuro bioactividad contra *B. subtilis*. El porcentaje de bioactividad mostrado es relativo al control positivo (cloranfenicol para Gram- y carbomicina para Gram+, ambos a 50 [mg/mL]).

A partir de los resultados mostrados en la Figura 3: Actividad antibiótica de la cepa ST2-7A de *Streptomyces sp.* variando la agitación. Las barras color verde claro indican bioactividad contra *E. coli* y las barras color verde oscuro bioactividad contra *B. subtilis*. El porcentaje de bioactividad mostrado es relativo al control positivo (cloranfenicol para Gram- y carbomicina para Gram+, ambos a 50 [mg/mL]). Figura 3 se puede notar que no existen diferencias significativas al variar la agitación de los cultivos, siendo el óptimo 160 RPM, con una diferencia porcentual del 5% respecto al menor valor, en los ensayos contra *E. coli*.

Estudios sobre el cultivo de *Streptomyces* indican que a menor agitación el tamaño de los pellets aumenta (Gamoá-Suasnavart, et al., 2013) (Koepff, et al., 2017), lo que reduce la transferencia de masa y dificulta el proceso de extracción. No obstante, en este trabajo se muestra que el uso de matraces con baffles permitió aumentar la producción con la menor agitación. Esto viene dado porque los baffles permiten la formación de turbulencias en el

medio líquido facilitando la transferencia de masa. De lo anterior surge como propuesta a futuro estudiar la variación del número de bafles de los matraces y su impacto en la producción.

3.2.3 Variación de temperatura

Los porcentajes de inhibición antibiótica respecto al control positivo variando la temperatura se muestran en la Figura 4. Del gráfico se puede observar que la mayor bioactividad se obtuvo al utilizar 35°C frente a *E. coli* y *B. subtilis*, con un aumento frente a las condiciones originales (33°C) del 2% y 15%, respectivamente. Además, se puede notar que la bioactividad disminuyó al utilizar 37°C respecto al caso original, frente a *E. coli*, y no hubo variación frente a *B. subtilis*.

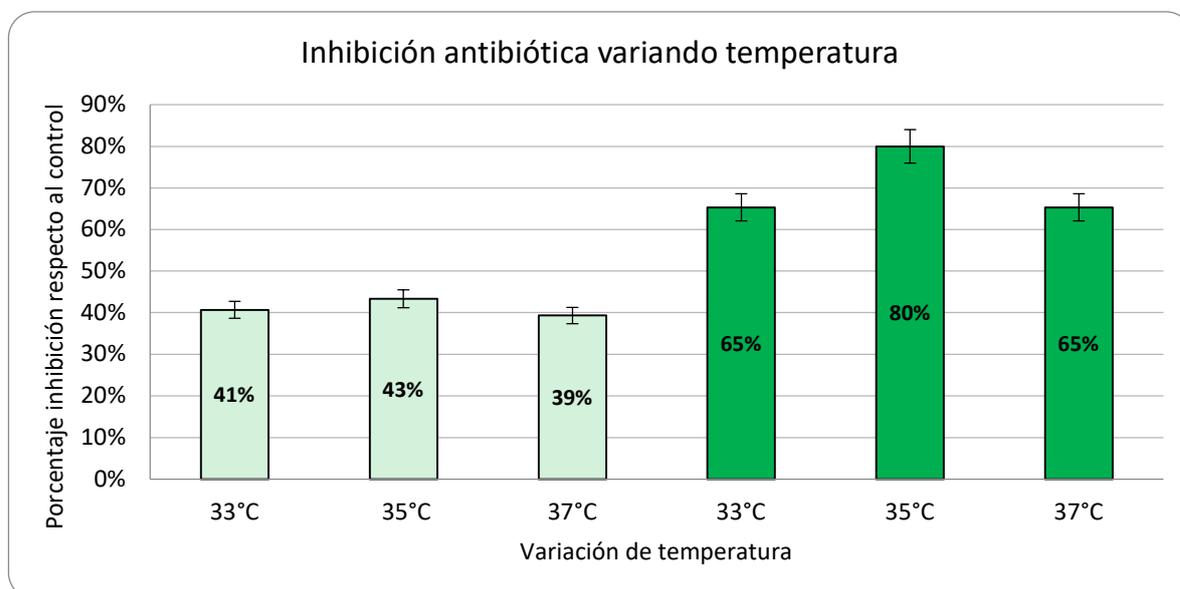


Figura 4: Actividad antibiótica de la cepa ST2-7A de *Streptomyces sp.* variando la temperatura. Las barras color verde claro indican bioactividad contra *E. coli* y las barras color verde oscuro bioactividad contra *B. subtilis*. El porcentaje de bioactividad mostrado es relativo al control positivo (cloranfenicol para Gram- y carbomicina para Gram+, ambos a 50 [mg/mL]).

Al variar la temperatura la mayor producción se obtuvo a los 35°C, valor mayor que la condición original que maximiza el crecimiento celular (33°C). Esto puede significar que los procesos de regulación y enzimas involucradas en la síntesis del metabolito bioactivo tengan una temperatura óptima levemente superior a las involucradas en el metabolismo primario. Para corroborar esto se requiere la identificación de la molécula bioactiva y las rutas metabólicas involucradas en su síntesis para un estudio exhaustivo de estas, lo que queda propuesto para etapas posteriores. De manera análoga al experimento de variación de pH se sugiere para etapas posteriores de cultivo en biorreactor, iniciar la fermentación a 33°C para generación de biomasa y luego modificar las condiciones de operación para maximizar la producción de metabolitos bioactivos.

3.2.4 Variación de salinidad

Los porcentajes de inhibición antibiótica respecto al control positivo variando la salinidad se muestran en la Figura 5. Del gráfico se puede observar que la mayor bioactividad se obtuvo al utilizar 15% de cloruro de sodio (m/v) frente a *B. subtilis*, con un aumento frente a las condiciones originales (10%) del 7%. En cambio, contra *E. coli*, no hubo variación respecto a las condiciones originales.

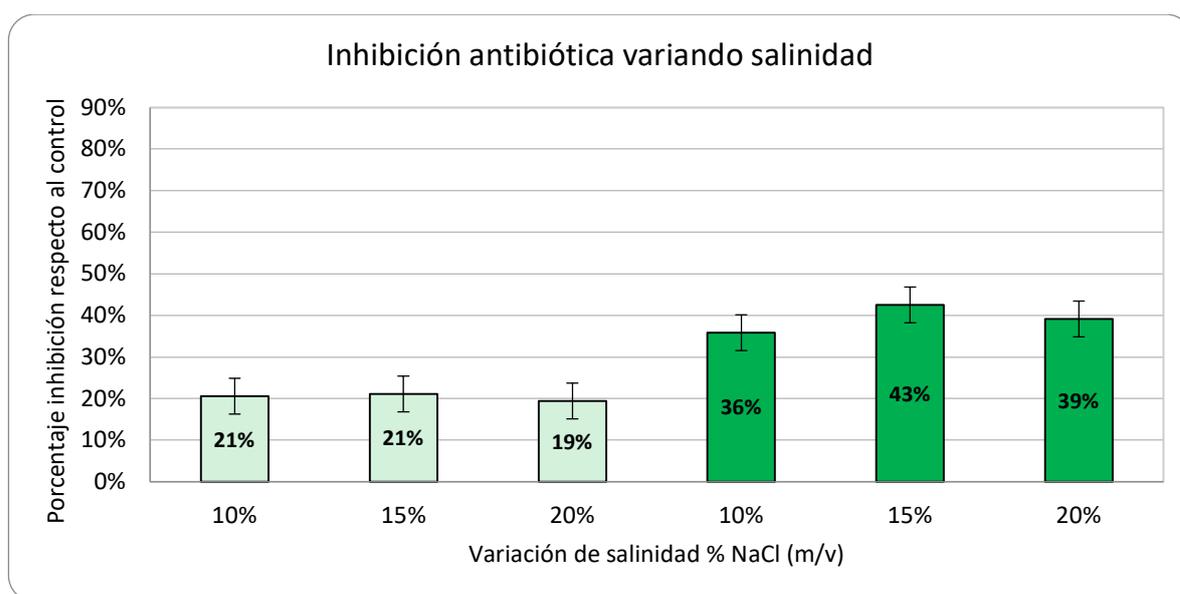


Figura 5: Actividad antibiótica de la cepa ST2-7A de *Streptomyces sp.* variando la salinidad (en porcentaje de cloruro de sodio masa/volumen). Las barras color verde claro indican bioactividad contra *E. coli* y las barras color verde oscuro bioactividad contra *B. subtilis*. El porcentaje de bioactividad mostrado es relativo al control positivo (cloranfenicol para Gram- y carbomicina para Gram+, ambos a 50 [mg/mL]).

Al variar la salinidad se obtuvo que la mayor bioactividad se presentó en los cultivos con 15% (m/v) de NaCl, si bien las variaciones en porcentaje no son significativas, se tiene que este valor es un punto de inflexión. Dado que el valor óptimo es mayor a la salinidad del caso original, se propone el control de esta variable para futuras pruebas en biorreactor, iniciando la fermentación con 10% para maximizar el crecimiento y luego, añadir medio con tal concentración de sal que el reactor alcance un 15%.

Tras estudiar los porcentajes de bioactividad de las diferentes modificaciones según el método OFAT, se observa que los resultados varían en un amplio rango de valores que van desde el 19 al 43% y del 36 al 80%, contra *E. coli* y *B. subtilis*, respectivamente. Estas diferencias se plantean se deben a tres motivos, primero, a los diferentes diámetros de los HIC formados en los controles positivos que vendría dada, principalmente, por errores aleatorios en volumen de la alícuota del antibiótico. Segundo, al nivel de crecimiento que hayan mostrado los patógenos al momento de realizar el bioensayo, en este trabajo se consideraron aceptables mediciones de OD600 entre 0,5 y 0,75. Y tercero, al error

aleatorio relacionado a la concentración del metabolito de las diferentes alícuotas aplicadas. Estas últimas dos inciden directamente en los diámetros de los HIC que variaron entre 1,0 y 2,3 [cm].

Por último, en relación con el método OFAT, se sugiere explorar variaciones a las fuentes de glucosa, si bien el uso de almidón favorece el crecimiento de biomasa y esporulación (Guerrero Cassanello, 2019), no se ha estudiado su impacto en la producción de metabolitos bioactivos. Además, de realizar modificaciones a las condiciones de cultivo en función de las características del Salar de Tara. Primero, realizar experimentos de suplementación, considerando sales de otros elementos que sean abundantes en la localidad, y que, por lo tanto, se esperaría que la cepa se encuentre adaptada para crecer en su presencia, por ejemplo, sales de elementos como litio, potasio y magnesio (Troncoso, et al., 2013). Otra alternativa corresponde a estudiar variaciones a los parámetros físicos como exponer los cultivos a radiación UV, considerando que el desierto de Atacama es la región con mayor radiación solar del mundo (Osses, et al., 2017), se esperaría que la cepa posea mecanismos de protección ante esta.

3.3 Cultivo en condiciones originales y óptimas para la producción

3.3.1 Cinética de crecimiento

De las mediciones de OD600 de los cultivos en condiciones originales y optimizadas, mostrados en Anexo B, con la manipulación mostrada en Anexo C, se construye el gráfico de la Figura 6 que muestra el crecimiento celular durante la fase exponencial. De las regresiones lineales mostradas en el mismo, se obtiene que el μ_{max} de las condiciones originales es de $0,16 \left[\frac{1}{h} \right]$ y el de las condiciones optimizadas $0,12 \left[\frac{1}{h} \right]$, lo que corresponde a una disminución de un 25%.

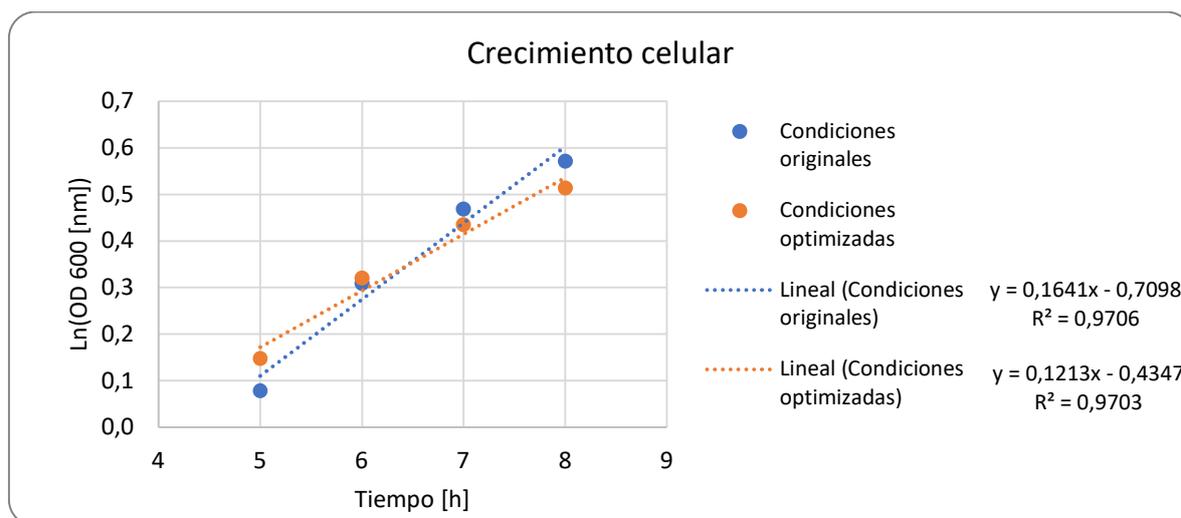


Figura 6: Crecimiento celular medido a través de absorbancia a 600 nm, utilizando como blanco solución Ringer ¼ fuerza iónica. Se muestra solo la fase exponencial.

De los resultados, se puede notar que los cultivos en condiciones optimizadas mostraron, en promedio, un aumento más acelerado en la medición de OD600 en las primeras horas, respecto a las condiciones originales. No obstante, después de la hora 6 las mediciones en condiciones originales superaron a las optimizadas, esto es de acuerdo con lo esperado, pues las condiciones originales son aquellas que permiten maximizar la producción de biomasa. El comportamiento de las primeras horas se puede atribuir a que el pH inicial de las condiciones originales es mayor, lo que podría extender la duración de la fase de crecimiento *lag*, pues la cepa requiere un mayor tiempo para sintetizar los metabolitos que le permitan tolerar la alcalinidad.

3.3.2 Curva de calibración

De las mediciones de OD600 y peso seco de los cultivos en condiciones originales y optimizadas, mostrados en Anexo B, con la manipulación mostrada en Anexo 3, se construye la curva de calibración mostrada en la Figura 7. La curva exhibe un comportamiento lineal en el rango de valores, con un coeficiente de determinación igual a 0,91.

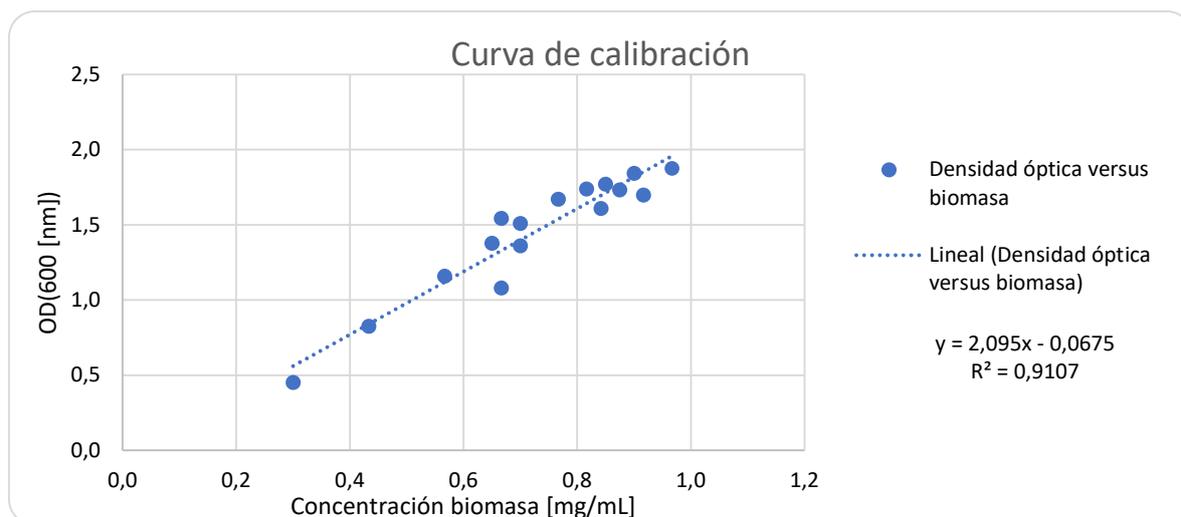


Figura 7: Curva de calibración del crecimiento de la cepa ST2-7A de *Streptomyces sp.* midiendo densidad óptica a 600 [nm] versus concentración de biomasa [mg/mL], a partir de los cultivos en condiciones originales y optimizadas.

El coeficiente de determinación es un valor cercano a 1, por lo que la curva se considera apropiada para la estimación de concentración de biomasa en función de las mediciones de densidad óptica. No obstante, es importante considerar que para la construcción de la curva sólo se consideraron muestras sin dilución o dilución de un $\frac{1}{4}$. De este modo, el modelo puede ser mejorado al integrar un mayor número de datos, incluyendo muestras diluidas en $\frac{1}{2}$ o $\frac{1}{8}$.

A partir de la regresión lineal obtenida a partir del gráfico de la Figura 7 y el procedimiento mostrado en Anexo C, se determina la concentración de biomasa teórica según las

mediciones de OD600, lo que se muestra en la Figura 8 y Figura 9, para los cultivos en condiciones originales y optimizadas, respectivamente.

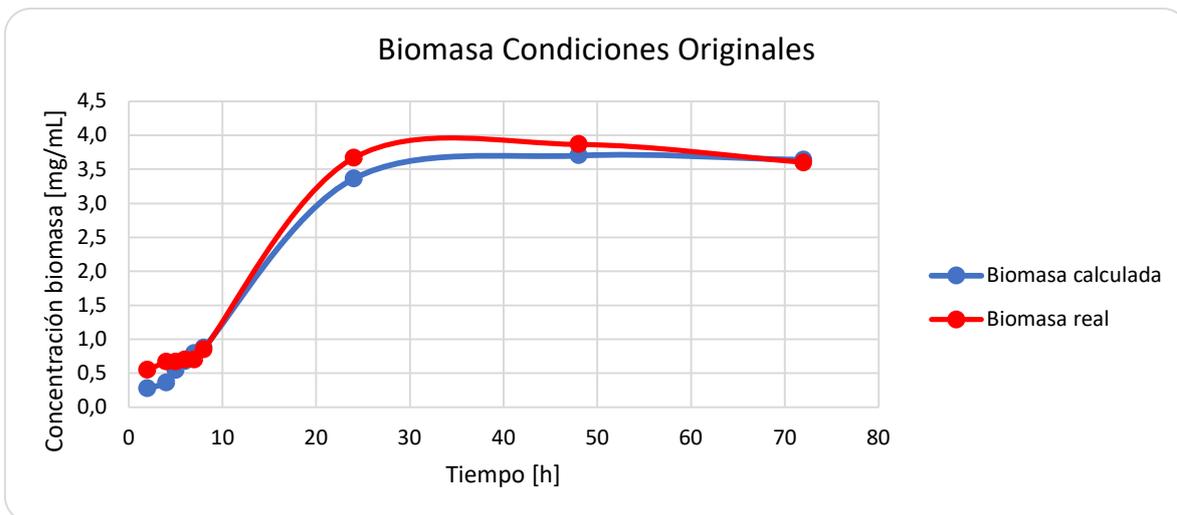


Figura 8: Comparación entre la biomasa real y calculada, según la curva de calibración, para el crecimiento de la cepa ST2-7A de *Streptomyces sp.* bajo las condiciones originales de cultivo.

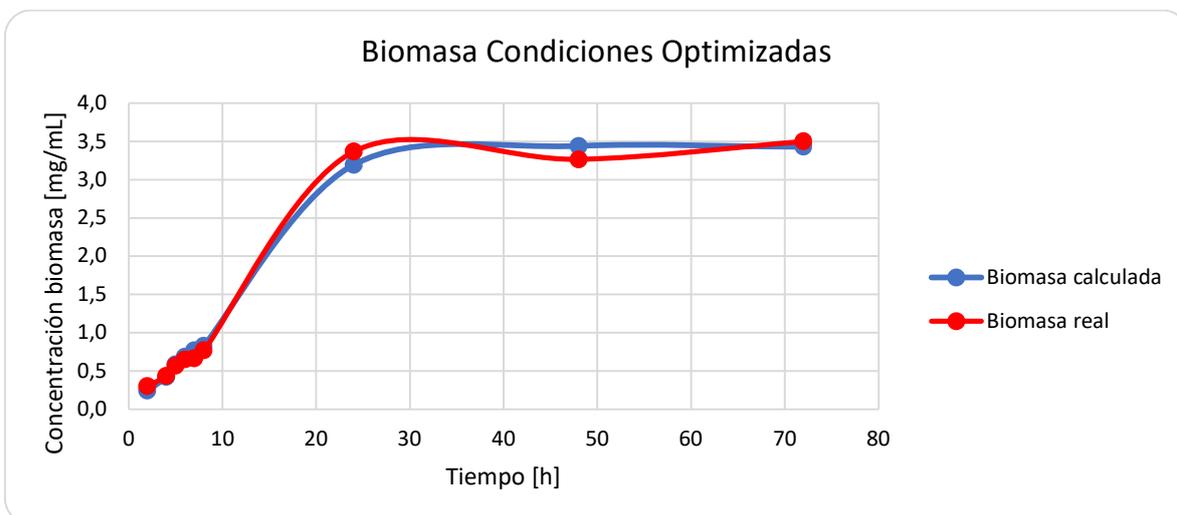


Figura 9: Comparación entre la biomasa real y calculada, según la curva de calibración, para el crecimiento de la cepa ST2-7A de *Streptomyces sp.* bajo las condiciones optimizadas de cultivo.

En relación con el desempeño de la curva de calibración para la estimación de biomasa según las mediciones de OD600, se puede notar que, para las condiciones originales, las mayores diferencias respecto a la biomasa real se presentan en las primeras horas de

cultivo (horas 2 y 4) y en la hora 24. Por otra parte, para el cultivo en condiciones optimizadas las mayores diferencias se presentan durante la fase de crecimiento exponencial (horas 5 y 7). Los errores porcentuales promedios para las concentraciones de biomasa en condiciones originales y optimizadas fueron 12,32 y -0,99%, respectivamente, según se muestra en el Anexo 3.

3.3.3 Comparación bioactividad antibiótica

Los porcentajes de inhibición antibiótica respecto al control positivo de los cultivos en condiciones originales y óptimas se muestran en la Figura 10. En el gráfico se puede notar un aumento en el porcentaje de bioactividad del 10 y 7% frente a *E. coli* y *B. subtilis*, respectivamente.

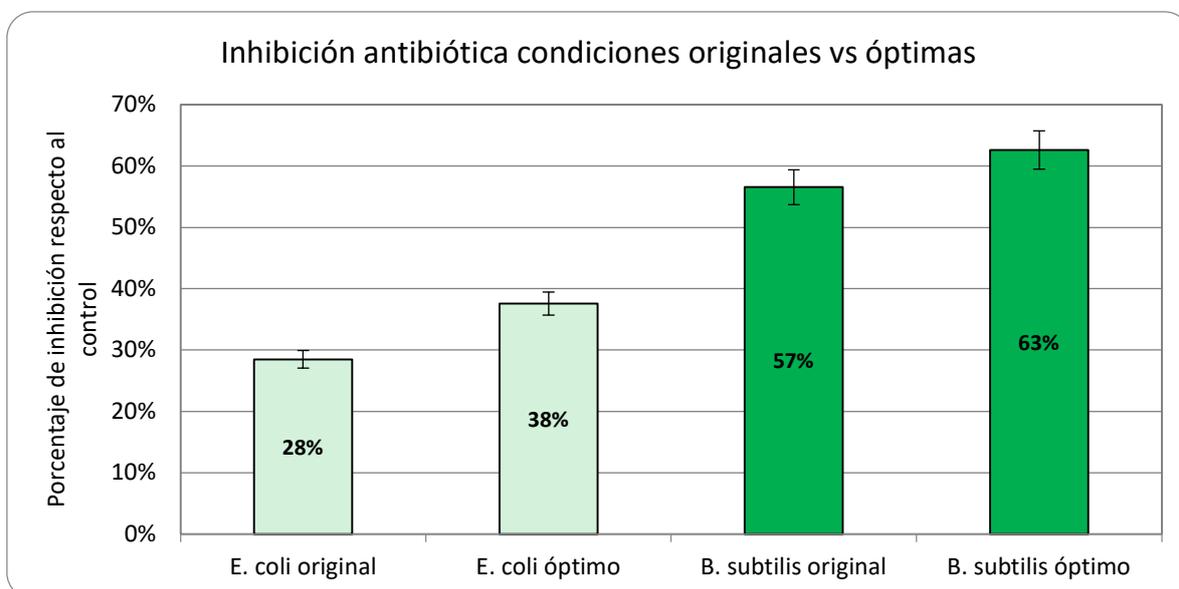


Figura 10: Actividad antibiótica relativa de las condiciones originales versus las condiciones optimizadas para la producción. Las barras color verde claro indican bioactividad contra *E. coli* y las barras color verde oscuro bioactividad contra *B. subtilis*. El porcentaje de bioactividad mostrado es relativo al control positivo (cloranfenicol para Gram- y carbomicina para Gram+, ambos a 50 [mg/mL]).

Si bien existe una diferencia porcentual significativa entre la bioactividad frente a *E. coli* y *B. subtilis*, esto se debe a las diferencias de los diámetros de los halos de inhibición de los antibióticos utilizados como control positivo. El diámetro medido para las muestras tratadas con el metabolito obtenido por el cultivo en condiciones optimizadas fue en ambos casos 2,07 [cm], y de los controles positivos fueron $5,5 \pm 0,3$ y $3,3 \pm 0,5$ [cm], para *E. coli* y *B. subtilis*, respectivamente, como se muestra en el Anexo B. Las diferencias en las mediciones se justifican del mismo modo a lo discutido en la sección 3.2.

3.4 Escalamiento en biorreactor

3.4.1 Cinética de crecimiento

De las mediciones de OD600 del cultivo en biorreactor, mostradas en Anexo B y con la manipulación mostrada en Anexo C, se construye el gráfico de la Figura 11 que compara la cinética de crecimiento del cultivo sin control de pH y con pH constante igual a 9. Del gráfico se puede notar que el cultivo sin control de pH inició rápidamente su fase de crecimiento exponencial, cuyo μ_{max} aumentó a $0,18 \left[\frac{1}{h}\right]$, un 50% mayor respecto al crecimiento en matraz. Por otra parte, el cultivo con pH constante se mantuvo en fase *lag* durante el mismo intervalo de tiempo.

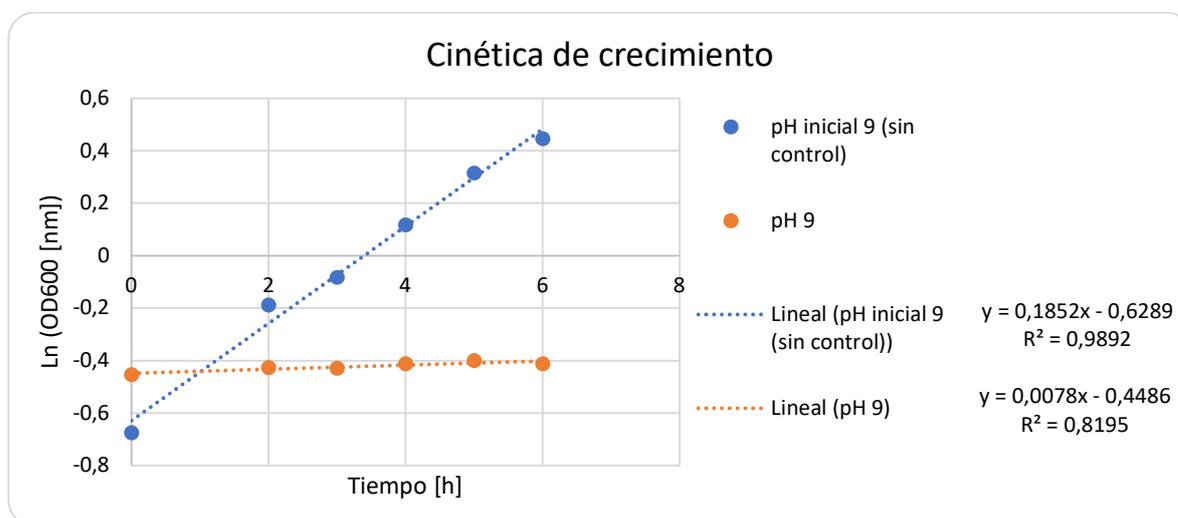


Figura 11: Cinética de crecimiento del cultivo de la cepa ST2-7A de *Streptomyces sp.* en biorreactor de 1 [L] y condiciones optimizadas para la producción. Se muestra la fase de crecimiento exponencial del cultivo sin control de pH y las mediciones de OD600 para el cultivo en pH constante igual a 9, en el mismo intervalo de tiempo.

En la Figura 12 se muestra la curva de variación de pH del cultivo sin control. En el gráfico se puede notar una rápida acidificación del medio, llegando a pH 5,75 en las primeras 6 horas de cultivo. Posterior a la hora 24, el medio aumenta su alcalinidad llegando a un pH 8,14 al momento de finalizar el experimento.

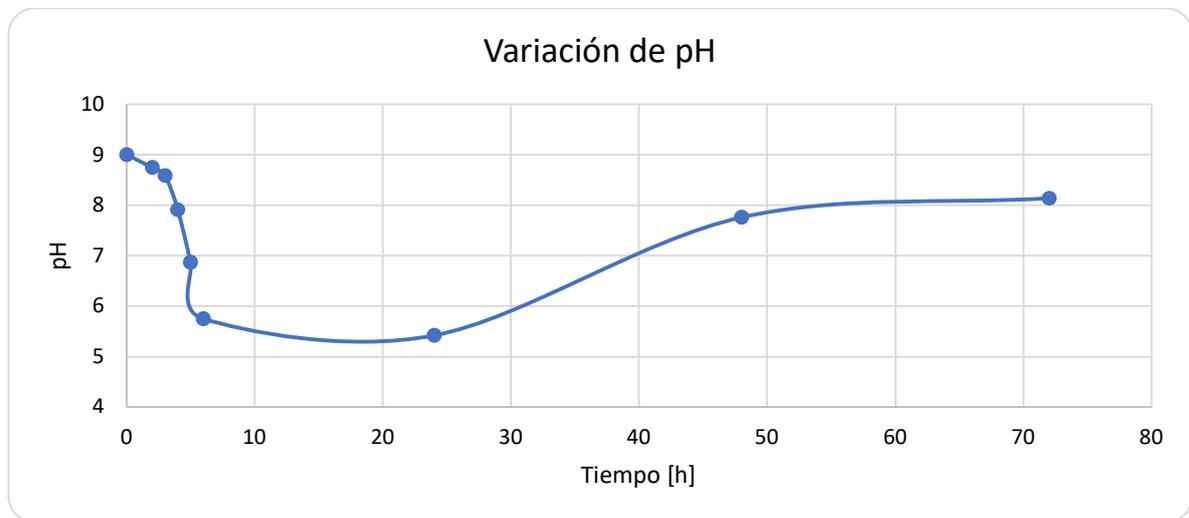


Figura 12: Variación del pH al cultivar la cepa ST2-7A de *Streptomyces sp.* en biorreactor de 1 [L] en condiciones optimizadas para la producción de metabolitos bioactivos.

De la Figura 12 se puede señalar que no controlar el pH del medio podría favorecer la disminución de la duración de la fase *lag*. Al graficar las mediciones de densidad óptica y pH de la fase exponencial se nota que existe una correlación de carácter lineal con un coeficiente de determinación igual a 0,9, como se muestra en la Figura 13. Una vez el cultivo a alcanzado la fase de crecimiento estacionaria el pH aumenta, lo que indicaría también un aumento en la muerte celular.

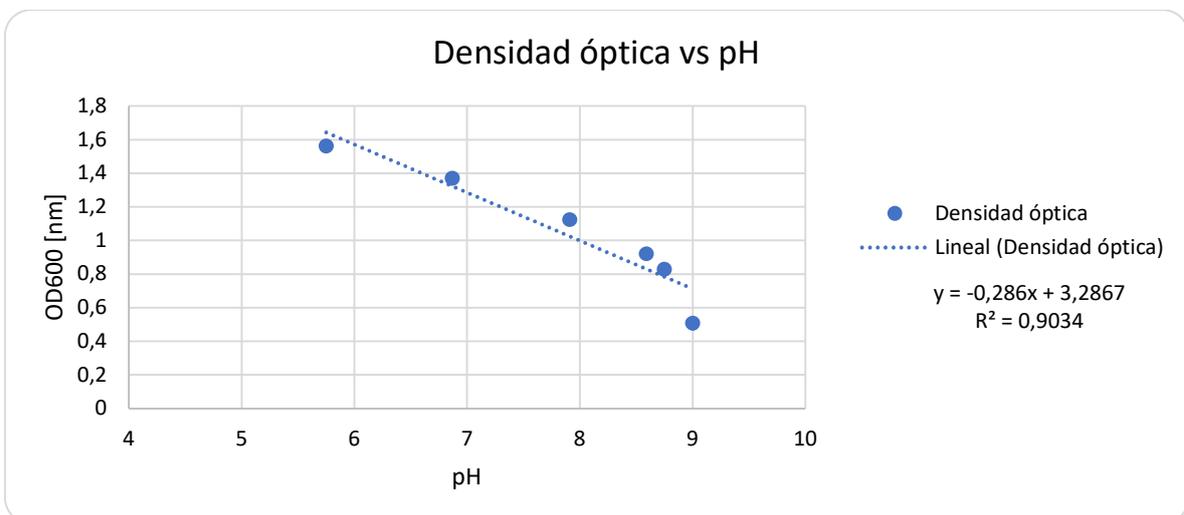


Figura 13: Relación entre la densidad óptica a 600 [nm] y pH durante la fase de crecimiento exponencial del cultivo de la cepa ST2-7A de *Streptomyces sp.* en biorreactor de 1 [L].

A partir de las mediciones de OD600 para los cultivos en biorreactor sin control de pH y pH constante 9, se determina la biomasa teórica según la curva de calibración. Los

resultados se muestran en la Figura 14, en esta se puede notar que el cultivo sin control de pH alcanza una mayor concentración de biomasa en un menor tiempo de fermentación. Por otra parte, al mantener pH constante 9 el cultivo inicia la fase de muerte celular en las últimas 24 horas de fermentación. Al comparar ambos cultivos en su fase estacionaria (horas 24 y 48) se obtuvo que el cultivo sin control de pH generó una concentración un 17% mayor respecto al cultivo con pH constante.

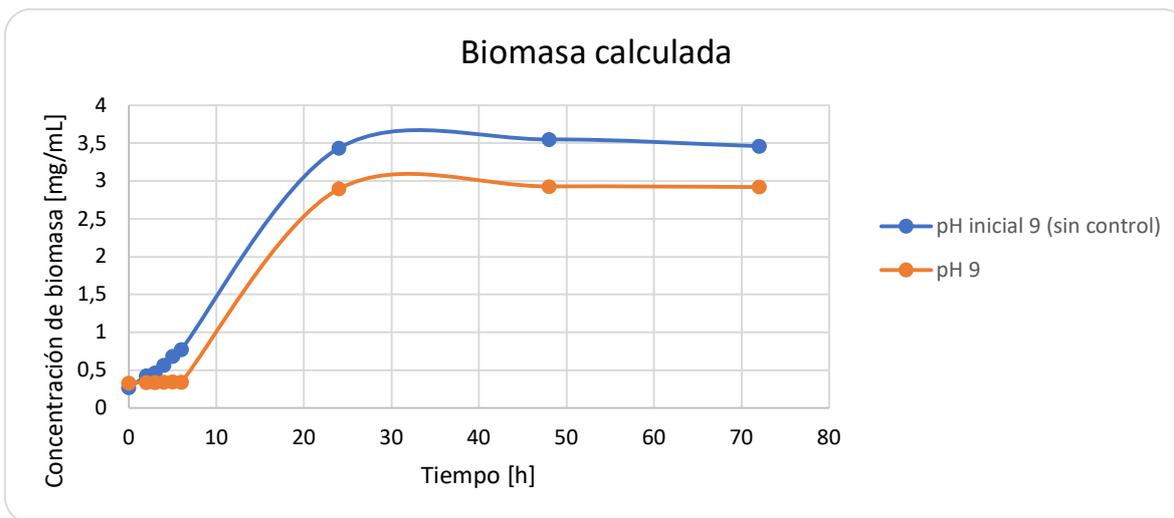


Figura 14: Concentración de biomasa calculada, según la curva de calibración, para el crecimiento de la cepa ST2-7A de *Streptomyces sp.* en biorreactor de 1 [L], pH inicial 9 (sin control) y pH constante 9.

El cultivo con control de pH tuvo una fase de crecimiento *lag* de mayor duración, esto se puede deber a que la bacteria necesita sintetizar metabolitos que le permitan tolerar un pH alcalino. Por el contrario, en el caso sin control de pH las reacciones oxidativas propias del metabolismo energético acidifican el medio. Se propone a futuro realizar una curva de bioactividad y evaluar la producción de metabolitos bioactivos versus el tiempo de fermentación, y así, verificar si la síntesis del metabolito es un mecanismo de tolerancia a la basicidad del medio. Esto también permitiría

La fermentación realizada con pH constante 9 presentó una disminución en la concentración de biomasa durante las últimas 24 horas. El pH se controló sólo con una solución de hidróxido de sodio, sin conectar una solución ácida para bajar el pH. Esto resultó que, durante la etapa de muerte celular, el medio de cultivo aumentara su pH a 9,2 al momento de terminar la fermentación. Finalmente, dado que no controlar el pH permite maximizar el crecimiento bacteriano y reducir la duración de la fase *lag*, se propone para futuras etapas de cultivo en biorreactor, iniciar la fermentación sin control de pH, y luego, alcanzada la fase estacionaria mantener pH 9 constante.

3.4.2 Bioensayos

Los porcentajes de inhibición respecto al control de los bioensayos realizados a partir de los cultivos sin control de pH y pH constante 9 se muestran en la Figura 15. En el gráfico se puede notar que los porcentajes de bioactividad aumentaron entre un 2 y 4% conforme se utilizó una mayor proporción de medio versus el disolvente de extracción. Por otra parte, la bioactividad aumentó entre un 1 y 4% al mantener el pH constante en 9.

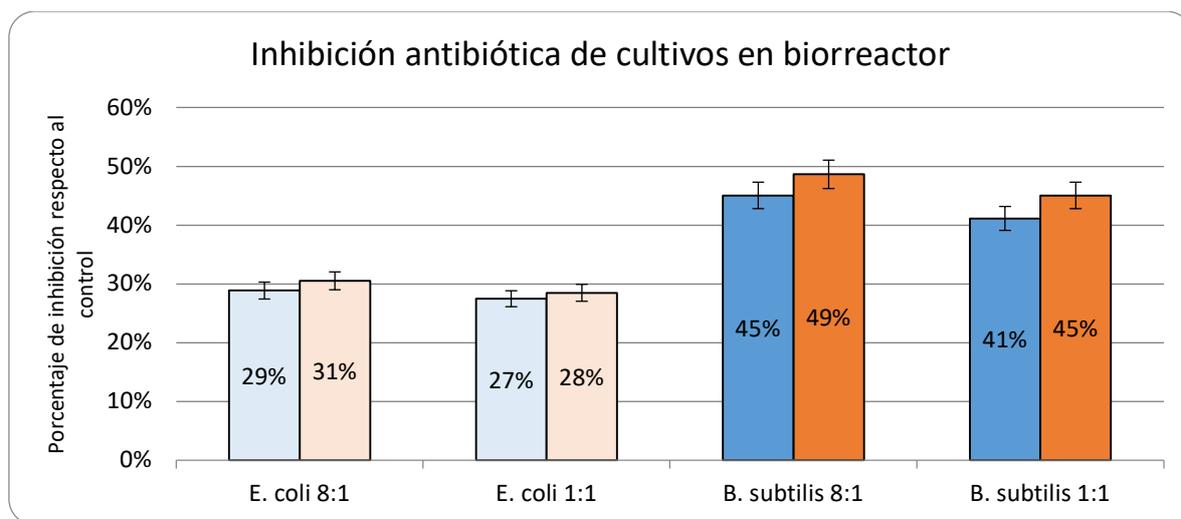


Figura 15: Actividad antibiótica relativa del cultivo en biorreactor sin control de pH (azul) y pH 9 (naranja), con extracciones mediante solvente orgánico en proporciones 8:1 y 1:1. Las barras en colores claros indican bioactividad contra *E. coli* y las barras en colores oscuros bioactividad contra *B. subtilis*. El porcentaje de bioactividad mostrado es relativo al control positivo (cloranfenicol para Gram- y carbomicina para Gram+, ambos a 50 [mg/mL]).

Al aumentar la razón entre sobrenadante del medio y el disolvente de extracción se obtiene un aumento en la bioactividad, no obstante, la mayor variación respecto a este parámetro es de un 4%, lo que podría indicar que la concentración del metabolito en el éter de petróleo se encuentra cercana al umbral de saturación. Como se ha discutido con anterioridad, es necesario explorar otros disolventes orgánicos apolares que permitan maximizar la solubilidad del metabolito. Otra alternativa es aumentar el tiempo de agitación y reposo al momento de realizar la separación líquido:líquido a fin de aumentar la transferencia del metabolito desde el medio al disolvente.

Si bien las variaciones en los porcentajes de bioactividad al utilizar diferentes proporciones para el disolvente de extracción y condiciones de cultivo son menores al 5%, la significancia del aumento de bioactividad viene dada según la escala del cultivo. Para escala de laboratorio esta diferencia se considera no significativa, por otra parte, ante un posible escalamiento industrial de la producción del metabolito la variación adquiere una mayor relevancia estadística. Si el porcentaje de bioactividad se correlaciona directamente con la concentración de metabolitos, las condiciones determinadas permitirían una mayor producción, que reduciría los costos asociados al proceso.

Finalmente, considerando el aumento en el porcentaje de bioactividad en el caso con control de pH, a pesar de haber presentado una menor biomasa, surge como planteamiento a futuro estudiar un proceso productivo de dos etapas. La primera etapa enfocada en la maximización de la concentración de biomasa, bajo las condiciones de cultivo originales y sin control de pH. Y la segunda etapa, enfocada en la producción de los metabolitos, modificando las condiciones de cultivo a las óptimas para la producción y controlando el pH.

4 Conclusiones

En el presente trabajo de título se logra identificar la bioactividad antibacteriana de la cepa ST2-7A de *Streptomyces sp.* del Salar de Tara, que mostró inhibir el crecimiento bacteriano de *E. coli* y *B. subtilis* mediante la técnica disco difusión. La identificación de la bioactividad contra ejemplares Gram negativo y positivo constituye un precedente favorable para el estudio de la bioactividad contra bacterias de mayor relevancia epidemiológica.

Para lograr identificar la bioactividad de la cepa, se realizaron pruebas para la elección de un disolvente orgánico adecuado para la extracción líquido:líquido, de las alternativas probadas el que mostró tener mejor afinidad por el metabolito fue el éter de petróleo. Esto sugiere que el metabolito bioactivo tiene una estructura apolar. Por otra parte, debido a que el éter de petróleo es una mezcla homogénea de compuestos orgánicos, surge como proyección de este trabajo estudiar el proceso de extracción con otros disolventes orgánicos como el hexano, benceno y éter dietílico.

Al realizar modificaciones a las condiciones de cultivo de acuerdo con el método OFAT se determinaron condiciones óptimas para la producción de metabolitos bioactivos, que fue evaluada según los diámetros de los halos de inhibición de crecimiento. Las condiciones que optimizaron la producción fueron pH 9, 160 RPM, 35°C y 15% (m/v) de NaCl para cultivos en medio TSB modificado: 10% (m/v) de almidón soluble, 10% (m/v) de peptona de soya y 1% (m/v) de cloruro de calcio dihidratado. Las condiciones de cultivo optimizadas mostraron un incremento en el porcentaje de bioactividad, respecto al control positivo, de 10 y 7% frente a *E. coli* y *B. subtilis*, respectivamente. Se proyecta el estudio de otras modificaciones al medio como variaciones en la fuente de carbono, como el uso de glucosa, o realizar estudios de suplementación añadiendo sales de elementos que son abundantes en el desierto de Atacama como: litio, potasio y magnesio, o la variación de parámetros físicos como la exposición a la radiación UV.

Al estudiar la cinética de crecimiento bajo las condiciones de cultivo originales y óptimas para la producción de metabolitos, se determinaron las velocidades específicas de crecimiento máximas, siendo el μ_{max} igual 0,16 $[\frac{1}{h}]$ y 0,12 $[\frac{1}{h}]$, respectivamente, representando una disminución del 25%. Además, se determinó la curva de calibración entre la concentración de biomasa y la lectura de OD600, utilizando como blanco de medición solución Ringer a ¼ fuerza iónica. La curva de calibración mostró un coeficiente de determinación igual a 0,91 y al comparar la concentración de biomasa calculada versus la real, se obtuvieron errores promedios del 12,32 y -0,99%, para cultivos en condiciones originales y optimizadas, respectivamente.

Una vez determinadas las condiciones de cultivo óptimas para la producción, se realizaron fermentaciones en un biorreactor de 1 [L] y se comparó no controlar el pH con mantener pH 9 constante. Al no controlar el pH se obtuvo un μ_{max} igual 0,18 $[\frac{1}{h}]$, un 50% mayor a los cultivos en matraces, también, permitió reducir la duración de la fase *lag* y generó una concentración de biomasa un 17% mayor, respecto al caso con control de pH. Por otra

parte, al controlar el pH el cultivo alcanzó la fase de muerte celular durante las últimas 24 horas, mientras que el cultivo sin control se mantuvo en fase estacionaria.

Al realizar los bioensayos a partir de los extractos de metabolitos obtenidos de los cultivos en biorreactor se obtuvo que al controlar el pH el porcentaje de bioactividad, respecto al control, aumentó entre un 1 y 4% frente a la fermentación sin control de pH. La significancia estadística de este aumento no se considera relevante para el trabajo en escala de laboratorio, no obstante, adquiere mayor relevancia a escala industrial, pues permitiría reducir los costos asociados a la producción. Por otra parte, también se evaluó el uso de 2 diferentes proporciones de sobrenadante de medio:disolvente de extracción, y se determinó que la razón 8:1 presentó un aumento en el porcentaje de bioactividad entre un 2 y 4%, respecto a la razón 1:1. Esto sugiere que la concentración del metabolito en el disolvente puede tener un valor cercano al umbral de saturación, lo que ahonda en la necesidad de identificar disolventes de extracción alternativos que posean una mayor solubilidad por el metabolito.

Finalmente, si bien se logra el cumplimiento de los objetivos planteados en este trabajo de titulación, es importante poner esta labor en perspectiva. Pues si bien, se logró la identificación de la bioactividad antibacteriana de la cepa ST2-7A de *Streptomyces* sp. del Salar de Tara, aun se requieren de etapas de investigación adicionales para el desarrollo de un nuevo medicamento que pueda ser usado frente infecciones farmacorresistentes. Las principales proyecciones propuestas en este trabajo corresponden a la exploración de nuevos disolventes de extracción y variaciones a las condiciones de cultivo mediante experimentos de modificación, suplementación y/o parámetros físicos. No obstante, es necesario abordar una de las principales limitantes de este trabajo, al identificar los metabolitos bioactivos y estandarizar métodos para su cuantificación.

5 Bibliografía

Abdelkader, M. S. A. y otros, 2018. Asenjonamides A–C, antibacterial metabolites isolated from *Streptomyces asenjonii* strain KNN 42.f from an extreme-hyper arid Atacama Desert soil. *The Journal of Antibiotics*, Volumen 71, pp. 425-431.

Allocati, N., Masulli, M., Alexeyev, M. F. & Di Ilio, C., 2013. Escherichia coli in Europe: An Overview. *International Journal of Environmental Research an Public Health*, 10(12), pp. 6235-6254.

Angurell, I. y otros, Sin fecha. *Extracción: Tipos de Extracciones*. [En línea] Available at: http://www.ub.edu/oblq/oblq%20castellano/extraccio_tip.html#11 [Último acceso: 21 Enero 2022].

Barrie, D., Hoffman, P. N., Wilson, J. A. & Kramer, J. M., 1994. Contamination of hospital linen by *Bacillus cereus*. *Epidemiology & Infection*, 113(2), pp. 297-306.

Bayot, M. L. & Bragg, B. N., 2020. *Antimicrobial Susceptibility Testing*. Treasure Island (FL): StatPearls.

Bernardeau, M., Lehtinen, M. J., Forssten, S. D. & Nurminen, P., 2017. Importance of the gastrointestinal life cycle of *Bacillus* for probiotic functionality. *Journal of food science and technology*, 54(8), pp. 2570-2584.

Busarakam, K. y otros, 2014. *Streptomyces leeuwenhoekii* sp. nov., the producer of chaxalactins and chaxamycins, forms a distinct branch in *Streptomyces* gene trees. *Antonie van Leeuwenhoek*, Volumen 105, pp. 849-861.

Centre for Biotechnology and Bioengineering, Sin fecha. *Molecular Genetics, Extremophiles, and Ecophysiology*. [En línea] Available at: <https://cebib.cl/genetica-molecular-extremofilos-y-ecofisiologia/> [Último acceso: 28 mayo 2021].

Croxen, M. A. y otros, 2013. Recent Advances in Understanding Enteric Pathogenic *Escherichia coli*. *Clinical Microbiology Reviews*, 26(4), pp. 822-880.

Errington, J. & van der Aart, L. T., 2020. Microbe Profile: *Bacillus subtilis*: model organism for cellular development, and industrial workhorse. *Microbiology (reading)*, 166(5), pp. 425-427.

Gamoá-Suasnavart, R. A. y otros, 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*, Volumen 29, pp. 1421-1429.

Glasset, B. y otros, 2018. *Bacillus cereus*, a serious cause of nosocomial infections: Epidemiologic and genetic survey.. *PLoS One*, 13(5).

Goodfellow, M. y otros, 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*, Volumen 110, pp. 1133-1148.

- Goodfellow, M. & Fiedler, H. P., 2010. A guide to successful bioprospecting: informed by actinobacterial systematics. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 98(2), pp. 119-142.
- Guerrero Cassanello, S. I., 2019. *Optimización del crecimiento celular de Streptomyces sp. del Salar de Tara; Evaluación de parámetros*. Santiago de Chile: s.n.
- Guerrero, S., Asenjo, J. A. & Andrews, B., 2020. *Optimization of the growth of alkaliphilic Streptomyces from the Salar of Tara*. s.l.:s.n.
- Guerrero, S. y otros, 2017. *New halotolerant Streptomyces species from "Salar the Tara", a new niche in the search for novel bioactive compounds*. s.l.:s.n.
- iGEM, 2014. *Growth conditions, storage, media and antibiotics for Bacillus subtilis*, Munich: s.n.
- Kapoor, G., Saigal, S. & Elongavan, A., 2017. Action and resistance mechanisms of antibiotics: A guide for clinicians. *Journal of Anaesthesiology Clinical Pharmacology*, 33(3), pp. 300-305.
- Koepff, J. y otros, 2017. Fast and reliable strain characterization of *Streptomyces lividans* through micro-scale cultivation. *Biotechnology and Bioengineering*, Volumen 114, pp. 2011-2022.
- Kupchan, S. M., Tsou, G. & Sigel, C. W., 1973. Datiscacin, a novel cytotoxic cucurbitacin 20-acetate from *Datisca glomerata*. *The Journal of Organic Chemistry*, 38(7), pp. 1420-1421.
- Law, J. W.-F. y otros, 2018. Taxonomic and Characterization Methods of *Streptomyces*: A Review. *Progress in Microbes & Moleculuar Biology*, 1(1).
- Lessard, J. C., 2013. Growth Media for E. coli. En: *Laboratory Methods in Enzymology: Cell, Lipid and Carbohydrate*. s.l.:Elsevier Inc, pp. 181-189.
- Maurya, I. K., Dilawari, R., Singh, D. & Singh, R. P., 2020. *Bioactive Compounds from Extremophiles*. s.l.:Springer .
- Ministerio de Salud, 2017. *Plan Nacional contra la Resistencia a los Antimicrobianos*, s.l.: s.n.
- Osses, P. y otros, 2017. El Clima desértico costero con nublados abundantes del desierto de Atacama y su relación con los recursos naturales, energía solar y agua de niebla. Caso de estudio Alto Patache (20,5°S) región de Tarapacá, Chile. *Revista de la Geografía Norte Grande*, Volumen 68, pp. 33-48.
- Poolman, J. T., 2017. *Escherichia coli*. En: S. R. Quah, ed. *International Encyclopedia of Public Health*. Segunda ed. s.l.:Academic Press, pp. 585-593.
- Rateb, M. E. y otros, 2011. Chaxamycins A-D, bioactive ansamycins from a hyper-arid desert *Streptomyces* sp.. *Journal of Natural Products*, 6(1491-1499), p. 74.
- Santhanam, R. y otros, 2012. *Streptomyces deserti* sp. nov., isolated from hyper-arid Atacama Desert soil. *Antonie van Leeuwenhoek*, Volumen 101, pp. 575-581.
- Santhanam, R. y otros, 2013. *Streptomyces bulli* sp. nov., isolated from a hyper-arid Atacama Desert soil. *Antonie van Leeuwenhoek*, Volumen 103, pp. 367-373.
- Singh, V. y otros, 2016. Strategies for Fermentation Medium Optimization: An In-Depth Review. *Frontiers in Microbiology*, 7(2087).

Su, Y., Liu, C., Fang, H. & Zhang, D., 2020. *Bacillus subtilis*: a universal cell factory for industry, agriculture, biomaterials and medicine. *Microbial Cell Factories*, Volumen 19.

Taroco, R., Seija, V. & Vignoli, R., 2006. Métodos de estudio de la sensibilidad antibiótica. En: *Temas de Bacteriología y Virología Médica*. Segunda ed. Montevideo: Universidad de la República: Facultad de Medicina, Departamento de Bacteriología y Virología, pp. 663-671.

Troncoso, R., Ercilla, O., Carrasco, R. & Vivallo, W., 2013. *Estudio del potencial de Litio en Salares del norte de Chile*, s.l.: s.n.

UK Department of Health, 2016. *Tackling drug-resistant infections globally: final report and recommendations*, s.l.: s.n.

World Health Organization, 2015. *Global Action Plan on Antimicrobial Resistance*, Geneva: WHO Document Production Services.

World Health Organization, 2020. *Resistencia a los antibióticos*. [En línea] Available at: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/resistencia-a-los-antibioticos>
[Último acceso: 19 junio 2021].

Anexos

Anexo A: Protocolo de uso del rotoevaporador

1. Revisar las conexiones de la bomba de y refrigerante al equipo.
2. Poner a calentar el agua del baño del equipo a la temperatura deseada, se debe usar agua destilada
3. Una vez precalentada el agua, proceder a abrir el grifo de agua de refrigeración y verificar que no queden burbujas en las mangueras.
4. Conectar matraz con solución a evaporar con el clip de seguridad, sosteniendo con una mano el matraz.
5. Prender la bomba de vacío y girar la llave de vacío del rotoevaporador para generar vacío en el sistema, luego puede soltar el matraz con la solución.
6. Iniciar rotación y bajar con cuidado al baño caliente hasta que se encuentre al nivel de la solución.
7. Una vez evaporada la solución, realizar lo siguiente:
 - a. Sacar el matraz del baño y apagar la rotación.
 - b. Sosteniendo con una mano el matraz, abrir la llave de vacío.
 - c. Con cuidado, sacar el clip de seguridad que sujeta el matraz.
 - d. Extraer el matraz sujetándolo con la mano izquierda y girándolo con la mano derecha de forma suave, nunca hacia abajo. Si cuesta sacarlo, espere a que se vaya el vacío del sistema.
 - e. Cerrar agua del refrigerante y apagar la bomba de vacío.
8. Para lavar el matraz una vez sacada la muestra se puede usar metano y hacer bajo campana, posteriormente puede lavar con detergente y agua destilada, dejando secar en estufa a 60°C para futuros usos.

Anexo B: Detalle de resultados

Variación de pH

Tabla 1: Actividad antibiótica de la cepa ST2-7A de *Streptomyces* sp. medida según los diámetros de los halos de inhibición de crecimiento bacteriano contra *E. coli* y *B. subtilis*, variando el pH. El promedio relativo de inhibición respecto al control se calcula según la media aritmética de los mejores 3 valores (verde claro) de cada variable. El porcentaje de bioactividad mostrado es relativo al control positivo (cloranfenicol para Gram- y carbomicina para Gram+, ambos a 50 [mg/mL]).

Diámetro [cm]		<i>E. coli</i>			<i>B. subtilis</i>		
		pH 9	pH 10	pH 11	pH 9	pH 10	pH 11
Matraz	(1)	2,0	1,5	1,5	2,0	1,7	1,8
		2,0	1,2	1,3	2,0	1,5	1,9
		1,8	1,2	1,3	1,7	1,8	1,8
	(2)	2,0	1,3	1,3	2,0	1,7	1,7
		1,8	1,6	1,5	1,9	1,6	1,5
		2,0	1,6	1,2	1,7	1,8	1,5
Control +		6,0			3,5		
Promedios mejores 3 valores		2,00	1,57	1,43	2,00	1,77	1,83
Promedio relativo de inhibición respecto al control		33%	26%	24%	57%	50%	52%

Variación de agitación

Tabla 2: Actividad antibiótica de la cepa ST2-7A de *Streptomyces* sp. medida según los diámetros de los halos de inhibición de crecimiento bacteriano contra *E. coli* y *B. subtilis*, variando la agitación. El promedio relativo de inhibición respecto al control se calcula según la media aritmética de los mejores 3 valores (verde claro) de cada variable. El porcentaje de bioactividad mostrado es relativo al control positivo (cloranfenicol para Gram- y carbomicina para Gram+, ambos a 50 [mg/mL]).

Diámetro [cm]		<i>E. coli</i>			<i>B. subtilis</i>		
		160 rpm	200 rpm	240 rpm	160 rpm	200 rpm	240 rpm
Matraz	(1)	1,5	1,7	1,5	1,9	2,0	2,0
		1,6	1,5	1,4	1,9	1,6	1,8
		1,6	1,6	1,5	2	1,8	1,8
	(2)	1,8	1,5	1,5	1,8	1,7	2,0
		1,8	1,5	-	2,0	2,0	1,7
		1,6	-	-	1,9	1,8	1,7
Control +		5,5			3,5		
Promedios mejores 3 valores		1,73	1,60	1,50	1,97	1,93	1,93
Promedio relativo de inhibición respecto al control		32%	29%	27%	56%	55%	55%

Variación de temperatura

Tabla 3: Actividad antibiótica de la cepa ST2-7A de *Streptomyces* sp. medida según los diámetros de los halos de inhibición de crecimiento bacteriano contra *E. coli* y *B. subtilis*, variando la temperatura. El promedio relativo de inhibición respecto al control se calcula según la media aritmética de los mejores 3 valores (verde claro) de cada variable. El porcentaje de bioactividad mostrado es relativo al control positivo (cloranfenicol para Gram- y carbomicina para Gram+, ambos a 50 [mg/mL]).

Diámetro [cm]		<i>E. coli</i>			<i>B. subtilis</i>		
		33°C	35°C	37°C	33°C	35°C	37°C
Matraz	(1)	2,0	2,1	1,9	1,5	2,0	1,7
		2,1	2,0	2,0	1,7	1,9	1,5
		2,0	2,0	2,0	1,5	2,1	1,7
	(2)	2,0	2,3	-	1,5	1,9	-
		2,0	2	-	1,5	1,6	-
		2,0	2,1	-	1,7	1,9	-
Control +		5,0			2,5		
Promedios mejores 3 valores		2,03	2,17	1,97	1,63	2,00	1,63
Promedio relativo de inhibición respecto al control		41%	43%	39%	65%	80%	65%

Variación de salinidad

Tabla 4: Actividad antibiótica de la cepa ST2-7A de *Streptomyces* sp. medida según los diámetros de los halos de inhibición de crecimiento bacteriano contra *E. coli* y *B. subtilis*, variando salinidad (en % (m/v) de NaCl). El promedio relativo de inhibición respecto al control se calcula según la media aritmética de los mejores 3 valores (verde claro) de cada variable. El porcentaje de bioactividad mostrado es relativo al control positivo (cloranfenicol para Gram- y carbomicina para Gram+, ambos a 50 [mg/mL]).

Diámetro [cm]		<i>E. coli</i>			<i>B. subtilis</i>		
		10%	15%	20%	10%	15%	20%
Matraz	(1)	1,3	1,1	1,4	1,1	1,5	1,4
		1,3	1,4	1,3	1,5	1,4	1,4
		1,0	1,2	1,1	1,3	1,2	1,2
	(2)	1,2	1,2	1,1	1,5	2,0	1,9
		1,4	1,3	1,1	1,3	1,6	1,1
		1,2	1,4	1,0	1,0	1,2	1,0
Control +		6,0			4,0		
Promedios mejores 3 valores		1,23	1,27	1,17	1,43	1,70	1,57
Promedio relativo de inhibición respecto al control		21%	21%	19%	36%	43%	39%

Cinética de crecimiento: Medición de OD600

Tabla 5: Resultados de medición de absorbancia de los cultivos en condiciones originales y optimizadas, utilizando como blanco de lectura solución Ringer 1/4 fuerza iónica. En celeste los resultados en los cuales se diluyó en un 25% la muestra para su lectura.

Tiempo [h]	Condiciones originales			Condiciones optimizadas		
	Matraz 1	Matraz 2	Matraz 3	Matraz 1	Matraz 2	Matraz 3
0	0,51	0,58	0,46	0,43	0,48	0,45
2	0,53	0,56	0,46	0,44	0,49	0,43
4	0,70	0,78	0,62	0,81	0,89	0,78
5	1,09	1,18	0,98	1,10	1,25	1,13
6	1,37	1,45	1,27	1,34	1,45	1,35
7	1,61	1,67	1,51	1,51	1,62	1,50
8	1,79	1,83	1,69	1,67	1,75	1,60
24	1,70	1,72	1,68	1,69	1,53	1,98
48	1,88	-	1,92	1,78	1,78	1,66
72	-	1,57	1,84	1,77	1,74	1,69

Cinética de crecimiento: Peso seco

Tabla 6: Resultados de medición de peso seco de los cultivos en condiciones originales y optimizadas. Los valores se detallan en unidades de concentración másica, considerando un volumen de muestra de 1 [mL].

Tiempo [h]	Concentración biomasa [mg/mL]					
	Condiciones originales			Condiciones optimizadas		
	Matraz 1	Matraz 2	Matraz 3	Matraz 1	Matraz 2	Matraz 3
0	2,5	3,3	2,0	1,8	2,2	2,3
2	1,9	1,8	1,3	1,8	1,4	1,7
4	2,1	2,1	1,7	2,1	1,7	1,7
5	2,2	1,9	1,8	2,1	2,0	1,8
6	2,0	2,0	2,2	1,9	1,8	2,2
7	1,7	2,1	2,2	2,2	1,9	2,1
8	2,4	2,6	1,9	2,3	2,0	2,2
24	5,1	5,1	4,7	4,5	4,1	4,3
48	5,4	5,1	5,0	4,4	5,0	4,6
72	4,8	4,9	5,0	4,9	5,0	4,8

Halos de inhibición de crecimiento condiciones optimizadas vs originales

Tabla 7: Actividad antibiótica de la cepa ST2-7A de *Streptomyces* sp. medida según los diámetros de los halos de inhibición de crecimiento bacteriano contra *E. coli* y *B. subtilis*, comparando las condiciones iniciales de cultivo con las óptimas obtenidas en este trabajo. El promedio relativo de inhibición respecto al control se calcula según la media aritmética de los mejores 3 valores (verde claro) para cada condición de cultivo utilizada. El porcentaje de bioactividad mostrado es relativo al control positivo (cloranfenicol para Gram- y carbomicina para Gram+, ambos a 50 [mg/mL]).

Diámetro [cm]		E. coli			B. subtilis		
		Alicuotas por placa			Alicuotas por placa		
		(1)	(2)	(3)	(1)	(2)	(3)
Original	(1)	1,4	1,5	1,5	1,8	1,8	2,0
	(2)	1,4	1,4	1,5	1,8	1,8	1,7
	(3)	1,6	1,5	1,6	1,6	1,7	1,8
Óptimo	(1)	1,7	1,8	1,8	1,9	1,9	2,0
	(2)	1,8	2,0	2,1	2,2	2,0	2,0
	(3)	1,7	2,0	2,1	1,9	1,9	1,9
Control +		5,5			3,3		
Original	Promedio	1,57			1,87		
	Promedio relativo de inhibición	28,5%			56,6%		
Óptimo	Promedio	2,07			2,07		
	Promedio relativo de inhibición	37,6%			62,6%		

Escalamiento en biorreactor: Densidad óptica

Tabla 8: Resultados de medición de absorbancia a 600 [nm] de los cultivos de la cepa ST2-7A de *Streptomyces sp.* en biorreactor de 1 [L] bajo condiciones de cultivo optimizadas para la producción de metabolitos bioactivos, sin control de pH y con pH constante igual a 9. En celeste los resultados en los cuales se diluyó en un 25% la muestra para su lectura.

Tiempo [h]	Sin control de pH		pH 9
	OD600	pH	OD600
0	0,509	9	0,635
2	0,828	8,75	0,653
3	0,921	8,59	0,651
4	1,124	7,91	0,662
5	1,37	6,87	0,67
6	1,562	5,75	0,662
24	1,736	5,42	1,455
48	1,796	7,76	1,471
72	1,749	8,14	1,468

Escalamiento en biorreactor: Bioensayos

Tabla 9: Actividad antibiótica de la cepa ST2-7A de *Streptomyces sp.* medida según los diámetros de los halos de inhibición de crecimiento bacteriano contra *E. coli* y *B. subtilis*. El cultivo se realiza en biorreactor de 1[L] bajo condiciones optimizadas para la producción, sin controlar el pH. Se compara el uso de dos proporciones de sobrenadante de cultivo: disolvente, 8:1 y 1:1. El promedio relativo de inhibición respecto al control se calcula según la media aritmética para cada condición de cultivo utilizada. El porcentaje de bioactividad mostrado es relativo al control positivo (cloranfenicol para Gram- y carbomicina para Gram+, ambos a 50 [mg/mL]).

Diámetro [cm]		E. coli			B. subtilis		
		Alícuotas por placa			Alícuotas por placa		
		(1)	(2)	(3)	(1)	(2)	(3)
8:1	(1)	1,4	1,7	1,6	1,7	1,7	1,6
	(2)	1,6	1,6	1,5	1,6	1,5	1,8
	(3)	1,6	1,6	1,7	1,6	1,7	1,8
1:1	(1)	1,5	1,4	1,4	1,5	1,5	1,6
	(2)	1,6	1,6	1,5	1,5	1,7	1,5
	(3)	1,5	1,5	1,6	1,4	1,5	1,5
Control +		5,5			3,7		
Promedio 8:1		1,59			1,67		
Promedio 1:1		1,51			1,52		
Promedio relativo de inhibición respecto al control (8:1)		28,9%			45,0%		
Promedio relativo de inhibición respecto al control (1:1)		27,5%			41,1%		

Tabla 10: Actividad antibiótica de la cepa ST2-7A de *Streptomyces sp.* medida según los diámetros de los halos de inhibición de crecimiento bacteriano contra *E. coli* y *B. subtilis*. El cultivo se realiza en biorreactor de 1[L] bajo condiciones optimizadas para la producción, con pH 9 constante. Se compara el uso de dos proporciones de sobrenadante de cultivo:disolvente, 8:1 y 1:1. El promedio relativo de inhibición respecto al control se calcula según la media aritmética de los mejores 3 valores (verde claro) para cada condición de cultivo utilizada. El porcentaje de bioactividad mostrado es relativo al control positivo (cloranfenicol para Gram- y carbomicina para Gram+, ambos a 50 [mg/mL]).

Diámetro [cm]		E. coli			B. subtilis		
		Alícuotas por placa			Alícuotas por placa		
		(1)	(2)	(3)	(1)	(2)	(3)
8:1	(1)	1,8	1,7	1,7	1,7	2,0	1,8
	(2)	1,8	1,6	1,5	1,7	1,7	1,9
	(3)	1,6	1,7	1,7	1,8	1,7	1,9
1:1	(1)	1,5	1,6	1,6	1,8	1,7	1,7
	(2)	1,7	1,4	1,6	1,7	1,9	1,7
	(3)	1,6	1,6	1,5	1,4	1,6	1,5
Control +		5,5			3,7		
Promedio 8:1		1,68			1,80		
Promedio 1:1		1,57			1,67		
Promedio relativo de inhibición respecto al control (8:1)		30,5%			48,6%		
Promedio relativo de inhibición respecto al control (1:1)		28,5%			45,0%		

Anexo C: Memoria de cálculo

Cinética de crecimiento

A los datos experimentales que se muestran en Anexo B: Cinética de crecimiento: Medición de OD600, se calculan la media aritmética, desviación estándar, y luego, el logaritmo natural, obteniendo los resultados de la Tabla 11, con estos se construye la gráfica mostrada en la Figura 6 (en el cuerpo del informe).

Tabla 11: Datos utilizados para la construcción de las curvas de cinética de crecimiento para condiciones originales y optimizadas. En verde claro se muestran los datos de la fase de crecimiento exponencial.

Tiempo [h]	Condiciones originales			Condiciones optimizadas		
	Promedio OD600	Desviación estándar OD600	Ln (OD600)	Promedio OD600	Desviación estándar OD600	Ln (OD600)
0	0,519	0,059	-0,655	0,454	0,025	-0,790
2	0,517	0,051	-0,660	0,452	0,031	-0,794
4	0,699	0,083	-0,358	0,826	0,054	-0,191
5	1,081	0,100	0,078	1,159	0,080	0,147
6	1,362	0,088	0,309	1,378	0,062	0,320
7	1,597	0,083	0,468	1,545	0,067	0,435
8	1,771	0,071	0,572	1,671	0,074	0,514
24	1,699	0,021	0,530	1,733	0,102	0,454
48	1,898	0,121	0,445	1,739	0,059	0,231
72	1,707	0,091	0,433	1,734	0,069	0,225

Peso seco y curva de calibración

De los valores de peso obtenidos para los cultivos en condiciones originales y optimizadas, se busca el mínimo de cada conjunto. Se asume que este valor corresponde a los componentes del medio que precipitan tras la centrifugación, de este modo, para estimar el peso de células se resta cada valor a su conjunto de datos respectivos.

Por ejemplo, para la medición de los matraces 1 de las condiciones originales y optimizadas, las concentraciones de biomasa vienen dadas por las ecuaciones (1) y (2):

$$BM = 1,9 - 1,3 = 0,6 [mg/mL] \quad (1)$$

$$BM = 1,8 - 1,4 = 0,4 [mg/mL] \quad (2)$$

Debido a que los valores de la hora 24 en adelante fueron diluidos en un 25% para su medición de absorbancia, para la construcción de la curva de calibración, los valores de peso seco son divididos por 4, obteniendo así la

Tabla 12.

Tabla 12: Resultados de medición de peso seco de los cultivos en condiciones originales y optimizadas, tras haber restado los valores mínimos de cada conjunto de datos y aplicado el factor de dilución a los datos de la hora 24 en adelante. En naranja datos que no son considerados en la construcción de la curva de calibración.

Tiempo [h]	Concentración biomasa [mg/mL]					
	Condiciones originales			Condiciones optimizadas		
	Matraz 1	Matraz 2	Matraz 3	Matraz 1	Matraz 2	Matraz 3
0	1,20	2,00	0,70	0,40	0,80	0,90
2	0,60	0,50	0,00	0,40	0,00	0,30
4	0,80	0,80	0,40	0,70	0,30	0,30
5	0,90	0,60	0,50	0,70	0,60	0,40
6	0,70	0,70	0,90	0,50	0,40	0,80
7	0,40	0,80	0,90	0,80	0,50	0,70
8	1,10	1,30	0,60	0,90	0,60	0,80
24	0,95	0,95	0,85	1,12	0,68	0,73
48	1,03	0,95	0,93	0,75	0,90	0,80
72	0,88	0,90	0,92	0,88	0,90	0,85

Luego, se calculan los valores promedios de las concentraciones de biomasa y densidad óptica y se obtiene la Tabla 13, utilizada para la construcción de la curva de calibración mostrada en la Figura 7, mostrada en el cuerpo del informe.

Tabla 13: Valores de biomasa y densidad óptica utilizados para construir la curva de calibración.

Condiciones originales		Condiciones optimizadas	
Biomasa promedio [mg/mL]	OD600 promedio	Biomasa promedio [mg/mL]	OD600 promedio
0,550	0,517	0,300	0,452
0,667	0,699	0,433	0,826
0,667	1,081	0,567	1,159
0,700	1,362	0,650	1,378
0,700	1,510	0,667	1,545
0,850	1,771	0,767	1,671
0,917	1,699	0,842	1,611
0,967	1,876	0,817	1,739
0,900	1,843	0,875	1,734

La ecuación (3) describe la relación lineal entre concentración de biomasa y densidad óptica:

$$Biomasa[mg/mL] = \frac{OD600 + 0,0587}{2,0903} \times N \quad (3)$$

Donde N es el factor de dilución aplicado para la lectura de OD600, por ejemplo, para diluciones del 25 y 50%, N tomaría los valores 4 y 2, respectivamente.

Concentración de biomasa calculada versus real

Para evaluar el desempeño de la curva de calibración determinada se compara la biomasa real con la calculada según la curva de calibración y se determina error porcentual medio. A modo de ejemplo, se calcula en la ecuación (4) la concentración de biomasa para el cultivo en condiciones originales para la hora 24:

$$Biomasa[mg/mL] = \frac{1,699 + 0,0587}{2,0903} \times 4 = 3,363[mg/mL] \quad (4)$$

El error viene dado según la ecuación (5):

$$Error[\%] = 1 - \frac{Biomasa\ calculada}{Biomasa\ real} \quad (5)$$

A modo de ejemplo se calcula el error para las condiciones originales en la hora 24:

$$Error[\%] = 1 - \frac{3,363}{3,667} = 8,28\% \quad (6)$$

Con el procedimiento descrito se obtienen los resultados que se muestran en la Tabla 14 y Tabla 15, que permiten construir las gráficas mostradas en la Figura 8: Comparación entre la biomasa real y calculada, según la curva de calibración, para el crecimiento de la cepa ST2-7A de *Streptomyces* sp. bajo las condiciones originales de cultivo. Figura 8 y Figura 9, respectivamente.

Tabla 14: Comparación entre la biomasa calculada según la curva de calibración y la biomasa real en cultivo bajo condiciones originales.

Condiciones originales				
Tiempo [h]	OD600	Biomasa calculada [mg/mL]	Biomasa real [mg/mL]	Error
2	0,517	0,275	0,550	49,95%
4	0,699	0,363	0,667	45,60%
5	1,081	0,545	0,667	18,21%
6	1,362	0,680	0,700	2,93%
7	1,597	0,792	0,700	-13,18%
8	1,771	0,875	0,850	-2,98%
24	1,699	3,363	3,667	8,28%
48	1,876	3,702	3,867	4,25%
72	1,843	3,639	3,600	-1,09%
Error promedio				12,44%

Tabla 15: Comparación entre la biomasa calculada según la curva de calibración y la biomasa real en cultivo bajo condiciones optimizadas para la producción de metabolitos bioactivos.

Condiciones optimizadas				
Tiempo [h]	OD600	Biomasa calculada [mg/mL]	Biomasa real [mg/mL]	Error
2	0,452	0,244	0,300	18,56%
4	0,826	0,423	0,433	2,29%
5	1,159	0,582	0,567	-2,77%
6	1,378	0,687	0,650	-5,72%
7	1,545	0,767	0,667	-15,06%
8	1,671	0,828	0,767	-7,95%
24	1,611	3,194	3,367	5,12%
48	1,739	3,440	3,267	-5,31%
72	1,734	3,431	3,500	1,97%
Error promedio				-0,99%