

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
Unidad Iztapalapa

POSGRADO EN INGENIERÍA QUÍMICA
DIVISIÓN DE CIENCIAS BÁSICAS E INGENIERÍA

**RESPUESTAS FISIOLÓGICAS DE *Streptomyces lividans* TK24,
ASOCIADAS A LA PRODUCCIÓN DE COMPUESTOS
ANTIMICROBIANOS, EN PRESENCIA DE UN CAMPO
ELÉCTRICO y Mg^{2+}**

Tesis para obtener el grado de:
MAESTRA EN CIENCIAS (INGENIERÍA QUÍMICA)

PRESENTA:

I.Q. Hernández Orozco Aurora Montserrat

Director:

Dr. Victor Sánchez Vázquez

Codirector:

Dr. José de Jesús Álvarez Ramírez

Sinodales:

Presidente: Dr. Omar Castillo Araiza

Secretario: Dr. Armando Mejía Álvarez

Vocal: Dra. María Isabel Reyes Arreozola

Iztapalapa, Ciudad de México, octubre 2022



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
UNIDAD IZTAPALAPA

POSGRADO EN INGENIERÍA QUÍMICA
DIVISIÓN DE CIENCIAS BÁSICAS E INGENIERÍA

**RESPUESTAS FISIOLÓGICAS DE *Streptomyces lividans* TK24,
ASOCIADAS A LA PRODUCCIÓN DE COMPUESTOS
ANTMICROBIANOS, EN PRESENCIA DE UN CAMPO
ELÉCTRICO y Mg^{2+}**

TESIS

Para obtener el grado de:

MAESTRA EN CIENCIAS (INGENIERÍA QUÍMICA)

PRESENTA:

I.Q. Hernández Orozco Aurora Montserrat

Director:

Dr. Victor Sánchez Vázquez

Codirector:

Dr. José de Jesús Álvarez Ramírez

AGRADECIMIENTOS

Al consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la oportunidad y el apoyo financiero otorgado para la realización de este proyecto.

Al Dr. Victor Sánchez Vázquez por todo el apoyo y paciencia que me ha otorgado, confiando en mí, y fomentando la confianza en mí misma y en mi trabajo. Brindándome su conocimiento, experiencia y tiempo, abriendo mi panorama en la investigación, hacia una nueva y emocionante línea de conocimiento, contagiándome de su entusiasmo y dedicación y guiándome hacia mis objetivos dentro de mi formación académica.

Al Dr. José de Jesús Álvarez Ramírez, por todo su apoyo, paciencia, confianza y tranquilidad brindada en la realización de este proyecto, inspirándome en mi formación académica, confiando y fomentando la confianza en mí misma y en mi trabajo, brindándome su conocimiento, dedicación, experiencia y entusiasmo. No dejando de lado, las charlas afables en cada reunión.

A mis compañeros de laboratorio Fernanda y Gerardo por brindarme su conocimiento y tiempo, incluyéndome dentro de su equipo de trabajo. A Fernanda, por su paciencia al estar presente en todo mi proceso de aprendizaje dentro de la realización de este proyecto.

A mis padres, por estar presentes en todos los momentos de mi vida, en la buenas y en las malas, brindándome su apoyo, motivando mi desarrollo espiritual, emocional, y profesional, guiándome en todos mis caminos, desarrollando la confianza en mí misma.

A mi madre, que ha sido totalmente incondicional hacía mí, por enseñarme el no dejarme rendir, siendo la persona que más me ha amado y a la cual más he amado.

Finalmente, más que a nada en la vida, agradezco a DIOS por la vida que me presta a diario, por permitirme conocerlo y por permitirme llegar hasta estas instancias de mi vida.

DEDICATORIA

A Dios, por permitirme conocerlo y acercarme al bello mundo de la ciencia.

“El primer trago de la copa de las ciencias naturales te volverá ateo; pero en el fondo de esa copa te espera Dios”

Werner Karl Heisenberg

RESUMEN

La latente búsqueda de la implementación de bioprocesos en diversos sectores industriales, aunada a la creciente demanda de productos de alta necesidad y alto valor agregado, ha conllevado a la necesidad de la innovación e intensificación de dichos bioprocesos. La innovación e intensificación quedan en virtud de factores nutrimentales, ambientales, microbiológicos y de la configuración del biorreactor. Dado que las células y sus funciones están relacionadas con la composición química del medio de cultivo, y del potencial electroquímico de sus componentes iónicos, al modificar la concentración de iones y/o aplicar un campo eléctrico externo, se pueden generar estímulos capaces de reorientar los flujos metabólicos, y en general, los procesos bioquímicos de las células microbianas, con lo cual se podría favorecer la obtención y producción de compuestos de interés.

Streptomyces son una clase de actinobacterias Gram positivas, aerobias, las cuales están ampliamente focalizadas como grandes productoras de compuestos bioactivos con propiedades anticancerígenas, antivirales y antibacterianas. Estos compuestos tienen un importante papel en varios sectores de la industria, como el agrícola y el farmacéutico, por lo cual se caracterizan como compuestos de alto valor agregado. Sin embargo, aunque existen numerosos grupos de investigación trabajando en la caracterización genética de rutas de síntesis de nuevas y diversas moléculas bioactivas, en particular, aquellas con actividad antimicrobiana derivadas de *Streptomyces*, existen muy pocos grupos que trabajen en la optimización de bioprocesos sustentables, para su producción. Por su parte, *Streptomyces lividans* TK24 es una cepa ampliamente utilizada como cepa hospedera para la expresión heteróloga de diversas proteínas y enzimas sintetizadoras de antibióticos. Sin embargo, recientemente se ha demostrado que, de manera natural, en un medio que contiene glicerol como fuente de carbono y energía, y bacto triptona como fuente de nitrógeno es capaz de producir una proteína con actividad antimicrobiana.

Por otro lado, se ha comprobado que la aplicación de un campo eléctrico de baja intensidad, como un factor de estrés abiótico, en cultivos microbianos, provoca cambios fisiológicos, tales como la morfología y el metabolismo de los microorganismos, favoreciendo la producción de sus metabolitos. No obstante, estos estudios aún no han sido focalizados ni estandarizados en la comprensión de los fenómenos que ocurren a nivel celular, con el objetivo de establecer las bases para el diseño de nuevas configuraciones de biorreactores que puedan mejorar la producción de moléculas bioactivas.

En este trabajo se presenta una evaluación de las respuestas fisiológicas de *Streptomyces lividans* TK24 asociadas a la producción de compuestos con actividad antimicrobiana, durante el crecimiento y la producción de compuestos antimicrobianos, en presencia de un campo eléctrico de baja intensidad, buscando obtener respuestas que ayuden a la comprensión de los fenómenos implicados a nivel celular, que sienten las bases para el diseño de biorreactores, con configuraciones novedosas y de mayor eficiencia. Para esto, fue

necesario modificar la composición del medio de cultivo, agregando 0.5 g/L de MgSO₄ para mejorar la transferencia de carga eléctrica en el medio.

Se evaluaron los cambios fisiológicos en *Streptomyces lividans* TK24, por la adición de los iones Mg²⁺ en el medio de cultivo, ya que el magnesio juega importantes roles en los procesos bioquímicos celulares. Se encontró que el estímulo químico limitó el crecimiento del microorganismo, así como la concentración de proteína total extracelular, pero a su vez, promovió la generación de actividad antimicrobiana. Se presentaron cambios en la pigmentación del medio de cultivo, el cual presentó un color azul, lo que sugiere la presencia de metabolitos como actinorrodina, un metabolito secundario producido por algunas especies del género *Streptomyces*, que se caracterizan por esa pigmentación y actividad antimicrobiana.

Por otro lado, la aplicación del campo eléctrico de baja intensidad fue abordada en dos etapas del metabolismo de *Streptomyces lividans* TK24: (I) fase del crecimiento, al inicio del cultivo y (II) fase estacionaria o de mantenimiento, a las 48 h de cultivo. El campo eléctrico, tratado como un factor de estrés abiótico, no intervino con el crecimiento y/o la viabilidad del microorganismo. Al aplicarse en la etapa de crecimiento, el campo eléctrico inhibió la producción de actividad antimicrobiana, así como el pigmento azul. Por otro lado, la concentración de proteínas extracelulares no fue disminuida. Los espectros infrarrojos de la biomasa obtenida mostraron que la aplicación del campo eléctrico, en la etapa de crecimiento, provocó un aumento en la síntesis de lípidos, lo que podría estar relacionado con la nula producción de actividad antimicrobiana. Por otro lado, el aplicar el campo eléctrico durante la fase estacionaria (no crecimiento) mejoró la producción de actividad antimicrobiana sin afectar la pigmentación del medio de cultivo.

Finalmente, se demostró que la actividad antimicrobiana presente en los medios de cultivo UP_{MgSO₄} sin estímulo eléctrico y los medios de cultivo UP_{MgSO₄} electroestimulados en la fase de mantenimiento, está relacionada con la presencia de alguna proteína, más que a los metabolitos producidos, lo que da pie a una investigación más profunda, enfocada a encontrar los efectos provocados, tanto por el campo eléctrico, como por la presencia de Mg²⁺, sobre el proteoma y metaboloma de *Streptomyces lividans* TK24.

CONTENIDO

.....	0
RESUMEN	4
NOMENCLATURA	8
1. ESTADO DEL ARTE	10
1.1. Necesidad de la innovación de bioprocesos en la industria actual.....	10
1.2. Intensificación de bioprocesos a través de un campo eléctrico	11
1.2.1. Efectos de un campo eléctrico sobre cultivos bacterianos	13
1.3. Implementación del magnesio en cultivos microbianos y su función celular.....	16
1.4. Streptomyces, importantes productores industriales	17
1.4.1. Ciclo de vida de Streptomyces	18
1.5. Streptomyces lividans	19
1.6. Streptomyces lividans TK24	19
1.6.1. El metabolismo de Streptomyces lividans TK24.....	20
1.6.2. Streptomyces lividans TK24 como productora de moléculas bioactivas	24
2. JUSTIFICACIÓN	25
3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	26
Hipótesis	26
Objetivos	26
General	26
Particular	26
4. MATERIALES Y MÉTODOS.....	27
4.1. Microorganismos empleados	27
4.2. Medios de cultivo	27
4.3. Metodología experimental.....	29
4.3.1. Estrategia experimental	29
4.3.2. Siembra para esporular y colección de esporas en glicerol	30
4.3.3. Reactivación y adaptación de S. lividans TK24	30
4.3.4. Fermentaciones en medio UP	30
4.3.5. Selección del medio de cultivo a utilizar en las electroestimulaciones.....	30
4.3.6. Selección de las condiciones operacionales para las electroestimulaciones	31
4.3.7. Electroestimulaciones en medio de cultivo UP_{MgSO4}	32
4.3.8. Cuantificación de biomasa.....	33

4.3.9. <i>Actividad antimicrobiana</i>	34
4.3.10. <i>Fraccionamiento del sobrenadante por tamaño molecular</i>	34
4.3.11. <i>Cuantificación de proteínas en medio extracelular</i>	34
4.3.12. <i>Espectroscopía infrarroja</i>	35
4.3.13. <i>Potencial zeta</i>	35
5. RESULTADOS	36
5.1. <i>Selección del medio de cultivo a utilizar en las electroestimulaciones</i>	36
5.2. <i>Pigmentación en los medios de cultivo y cambios morfológicos</i>	37
5.3. <i>Cuantificación de biomasa respecto al tiempo</i>	40
5.4. <i>Actividad antimicrobiana respecto al tiempo</i>	41
5.5. <i>Fraccionamiento del sobrenadante por tamaño molecular</i>	42
5.6. <i>Concentración de proteínas extracelulares</i>	43
5.7. <i>Actividad antimicrobiana específica respecto a la concentración de proteínas extracelulares</i>	45
5.8. <i>Espectroscopia infrarroja</i>	47
5.9. <i>Potencial zeta</i>	51
6. DISCUSIÓN DE RESULTADOS	53
7. CONCLUSIONES	62
8. PERSPECTIVAS	63
BIBLIOGRAFÍA	64
ANEXOS	68
A.1. RUTAS CATABOLICAS	68
A.2. Anabolismo: biosíntesis de ácidos grasos en bacterias	69
A.3. Relación entre la síntesis de ácidos grasos y policétidos en <i>Streptomyces</i>	71

NOMENCLATURA

- **S. lividans:** *Streptomyces lividans*
- **B. Subtilis:** *Bacillus Subtilis*
- **PMF, ΔpH :** gradiente de protón o fuerza motriz del protón
- **N:** nitrógeno
- **Oxígeno:** oxígeno
- **C:** carbono
- **O₂:** molécula de oxígeno
- **H₂:** molécula de hidrógeno
- **CO₂:** molécula de dióxido de carbono
- **NaCl:** cloruro de sodio
- **NaOH:** hidróxido de sodio
- **HCl:** ácido clorhídrico
- **ATP:** adenosín trifosfato
- **ADP:** difosfato de adenosín o adenosin trifosfato.
- **NAD⁺:** dinucleótido de nicotidamida y adenina en su forma oxidada
- **NADH:** dinucleótido de nicotidamida y adenina en su forma reducida
- **P_i:** grupo fosfato.
- **FAD:** dinucleótido de flavína y adenina en su forma oxidada
- **FADH₂:** dinucleótido de flavína y adenina en su forma reducida
- **GDP:** guanosin difosfato.
- **GTP:** guanosin trifosfato.
- **GAP:** 3-fosfato de gliceraldehído
- **DHAP:** fosfato de dihidroxiacetona
- **TPI:** triosa fosfato
- **NADP⁺/NADPH+H⁺:** nicotinamida-adenina dinucleótido fosfato en su forma oxidada/en su forma reducida
- **μ_i^α :** Potencial químico de la especie i, en la fase α
- **ϕ_β :** Potencial eléctrico en la fase β
- **Φ :** Potencial de Galvani
- **PepB15:** péptido catiónico con actividad antimicrobiana
- **vis:** promotor fuerte constitutivo
- **vis-ss:** péptido señal
- **MI:** hifas compartimentadas
- **MII:** hifas multinucleadas
- **PCD:** muerte celular programada, por sus siglas en inglés
- **CoA:** coenzima A
- **CAC:** ciclo del ácido cítrico
- **RED:** undecilprodigiosina
- **ACT:** actinorrodina
- **CDA:** antibiótico de calcio peptídico
- **TAG:** triacilglicerol
- **FAME:** ésteres metílicos de ácidos grasos, por sus siglas en inglés
- **NH₄⁺:** ion amonio
- **Mg²⁺:** ion magnesio, en este trabajo también referido como magnesio
- **K⁺:** ion potasio
- **ADN:** ácido desoxirribonucleico
- **Mg-ADN:** interacción magnesio y ácido desoxirribonucleico
- **ARN:** ácido ribonucleico
- **ARNr:** ácido ribonucleico ribosómico
- **ARNm:** ácido ribonucleico mensajero
- **Redox:** reacción de reducción-oxidación

- **DPR:** divergencia del potencial redox
- **CA:** condiciones ambientales
- **p/p:** partes por millón
- **BC:** biocatalizador
- **CE:** campo eléctrico
- **ALB:** biorreactor airlift
- **MgSO₄·7H₂O:** sulfato de magnesio heptahidratado
- **CaCl₂·2 H₂O:** cloruro de calcio dihidratado
- **LB:** medio de cultivo Luria-Bertani
- **UP:** medio de cultivo conformado por glicerol y bacto triptona
- **UP_{MgSO₄}:** medio de cultivo que contiene medio UP y 0.5 g de MgSO₄·7H₂O
- **UP_{CaCl₂}:** medio de cultivo que contiene medio UP y 0.74 g de CaCl₂·2H₂O
- **UP_{MgSO₄ y CaCl₂}:** medio de cultivo que contiene medio UP, 0.5 g de MgSO₄ y 0.74 g de CaCl₂·2H₂O
- **CEo:** electroestimulación aplicada en la etapa de crecimiento, a inicios de cultivo
- **CE_{48 h}:** electroestimulación aplicada en la etapa de mantenimiento, 48 h
- **AA:** actividad antimicrobiana
- **rpm:** revoluciones por minuto
- **DO:** densidad óptica
- **IR:** infrarrojo
- **KDa:** Kilodalton

UNIDADES

- **m:** metros
- **T:** temperatura
- **h:** horas
- **cm:** centímetros
- **mg:** miligramos
- **ml:** mililitros
- **mm:** milímetros
- **A:** amperio
- **V:** voltio
- **KV:** kilovoltio
- **°C:** grados centígrados

1. ESTADO DEL ARTE

1.1. Necesidad de la innovación de bioprocesos en la industria actual

En los últimos años, ha estado latente la necesidad de incorporar en diversos sectores industriales el uso de bioprocesos, con el fin de obtener alternativas de procesos más limpios y afables con el medio ambiente, y que, a su vez, sean autosustentables. Muchos de estos bioprocesos hacen uso de las actividades metabólicas de diversos microorganismos para obtener compuestos de valor agregado, o eliminar moléculas indeseables. Sin embargo, debido a la alta demanda en productos de alto valor agregado y alta necesidad, como lo son alimentos y fármacos, es necesaria la optimización e intensificación de los bioprocesos actuales implementados a escala industrial, requiriendo altos rendimientos de producción, tiempos de proceso relativamente cortos, y de igual forma, de bajo costo que sostenga su rentabilidad [1].

El éxito con el que se llevan los bioprocesos depende de factores nutrimentales, ambientales, microbiológicos y de la configuración del biorreactor. Dado que las células y sus funciones dependen de la composición extracelular que se encuentra en el medio del cultivo, y del estado eléctrico en el cual se encuentra [2], al modificar la composición química de los medios de cultivo y el ambiente eléctrico, se pueden generar estímulos capaces de reorientar los flujos metabólicos, y en general, los procesos bioquímicos de las células microbianas [3] (procesos a escala genómica, proteómica y metabólica), con lo cual se podría favorecer la obtención y producción de compuestos de interés (figura 1). La comprensión de los impactos fisiológicos que se obtengan en cada una de las escalas a nivel celular es una tarea difícil que requiere de una gran diversidad de grupos de investigación. Sin embargo, las respuestas fisiológicas que se obtengan pueden ir desde niveles genómicos hasta niveles de *estímulo-respuesta* que nos ayudan a ir formando una comprensión en las diferentes escalas de los fenómenos ocurridos [4].

Lo anterior, conllevaría a la incorporación de nuevas configuraciones de los biorreactores; en donde la mayor parte de la industria actual visualiza a los biorreactores de una manera muy general, como simples contenedores en los cuales se llevan a cabo las fermentaciones, sin llevar a cabo un estudio profundo de la ingeniería de reactores enfocado a cada proceso, y menos aún, sin implementar nuevas técnicas de intensificación. Incluso, muchos de los bioprocesos que se desarrollan a escala laboratorio no llegan a implementarse a escala industrial, debido a que no se le da la importancia necesaria al diseño e innovación del biorreactor [5].

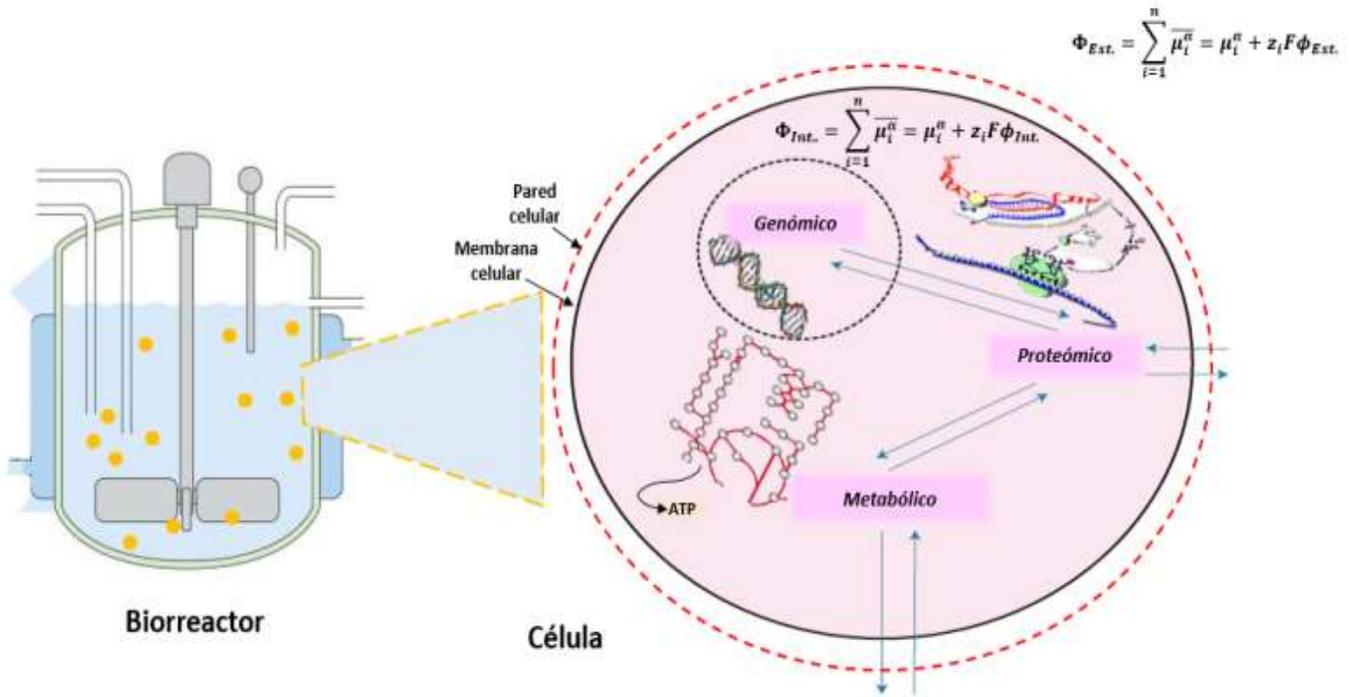


Figura 1. Representación de la célula en donde se muestra la sinergia entre niveles genómicos, proteómicos y metabólicos. De igual forma se observa el potencial químico (μ_i^{α}) y el potencial eléctrico (ϕ) de las especies que conforman las fases internas y externas de la célula, los cuales en conjunto conforman el potencial electroquímico ($\bar{\mu}_i^{\alpha}$). $\Phi_{Ext.}$ y $\Phi_{int.}$ son los potenciales de Galvani del exterior y el interior de la célula respectivamente, lo cuales, están determinados por la sumatoria de los potenciales electroquímicos de las especies que conforman las fases. De esta forma es evidente que al inferir en la composición química del medio de cultivo se tendrá un impacto en el potencial químico interno y externo de la célula, y al tratarse de especies cargadas, también se tendrá un impacto en los potenciales eléctricos. De igual forma, si se infiere en el estado eléctrico de la célula, se tendrá un impacto en el potencial eléctrico interno y externo.

1.2. Intensificación de bioprocesos a través de un campo eléctrico

La implementación de campos eléctricos en cultivos bacterianos es una técnica que ha sido utilizada para la intensificación de bioprocesos, básicamente en el área de la ingeniería ambiental. Se ha utilizado mayoritariamente en el tratamiento de aguas residuales y la descontaminación de suelos [6], aunque también se ha implementado en el aumento de la actividad en la desnitrificación/nitrificación, aceleración de la tasa de consumo de sustrato, aumento en la resistencia a los contaminantes, incremento de la biomasa, aumento de la actividad metabólica o enzimática, entre otros [7]. A continuación, se mencionan algunos reportes encontrados en la literatura, los cuales describen los procesos más representativos en los cuales se ha hecho uso de la implementación de campos eléctricos, y los resultados obtenidos.

En el caso del tratamiento biológico de aguas, se ha demostrado que el suministro continuo o intermitente de un campo eléctrico aumenta significativamente los recuentos bacterianos observados, así como las tasas de crecimiento, y, además, los procesos son de alta eficiencia, minimizan la adición de químicos externos y facilita la automatización [8].

Recientemente, se ha demostrado que el efecto de la electroestimulación sobre la desnitrificación biológica en un reactor bioelectroquímico, ha sido bastante favorable. Se encontró que la densidad de corriente óptima fue de 250 mA/m^2 , independientemente de la relación C/N, en donde se obtuvo una eficiencia máxima de eliminación de nitrato, y, además, el contenido de ATP (como indicador de actividad microbiana) y la permeabilidad de la membrana celular de las bacterias desnitrificantes aumentaron significativamente en dicha densidad de corriente óptima. Este aumento en la permeabilidad de la membrana provocó que más contenido bacteriano se desbordará hacia la solución.

Sánchez-Vázquez y col. (2017) al trabajar en la degradación de una mezcla de hidrocarburos (hexadecano, fenantreno-pireno; 100:1:1 p/p) con un biocatalizador (BC) de células enteras fúngicas (BC; *Aspergillus brasiliensis* unido a perlita) pretratado con un campo eléctrico (CE) de 1 V/cm^{-1} durante 24 h después de la germinación de las esporas, en un biorreactor airlift (ALB), demostraron que el pretratamiento con CE promovió cambios en las propiedades superficiales del BC, los cuales mejoraron la afinidad entre el BC y los hidrocarburos, mejorando el consumo de hidrocarburos por contacto directo. De igual forma, el pretratamiento con CE promovió la producción de una proteína emulsificante en ALB. La emulsión resultante fue asociada con resistencias de transferencia de masa interna y externa disminuidas, mientras que los efectos del pretratamiento con campo eléctrico se describen como un mecanismo de consumo combinado (contacto directo seguido de forma emulsionada), lo cual disminuye las limitaciones de transferencia de masa, resultando en una mejor degradación de hidrocarburos no específica [9]. Por otro lado, también se observó que la tasa de producción de CO_2 fue mejorada por la corriente eléctrica, esto se asocia con el hecho de que un campo eléctrico de baja intensidad actúa como una bomba de electrones acelerando así la actividad respiratoria [10].

Por su parte, Loghavi y col. (2007) aplicaron un campo eléctrico moderado en los medios de crecimiento microbiano de *Lactobacillus acidophilus* y observaron que el estrés causado por el campo eléctrico inducía un aumento en la producción de bacteriocina (toxinas proteicas producidas por bacterias) y un aumento en la conductividad transmembrana y la permeabilidad difusiva de nutrientes, tensioactivos, bacteriocina y autoinductores [8].

Los fenómenos mencionados en el uso de campos eléctricos en cultivos bacterianos están en función del tipo de microorganismo, y, en general, son proporcionales a la intensidad de campo/corriente aplicada y al tiempo de exposición. Los resultados han sido la estimulación de la actividad bacteriana, cambios morfológicos y el aumento de la movilidad celular, observados en campos de baja intensidad, sin embargo, también se han reportado daños irreversibles a los microorganismos, con pérdida de la integridad de la membrana, en el caso de exposición a campos eléctricos de alta intensidad. Aunque cada especie presenta diferencias en sensibilidad, los campos eléctricos de alta intensidad (en el rango de los kV), por ejemplo 1000 kV/m , o las corrientes continuas circulantes de 1A, dañan la célula de

forma irreversible llegando a provocar la muerte. Las membranas expuestas a un campo eléctrico se cargan, tal como un condensador, lo cual induce a un potencial transmembrana el cual, sí es superior a 1V, provoca la muerte celular [7].

1.2.1. Efectos de un campo eléctrico sobre cultivos bacterianos

Los efectos que la aplicación de campos eléctricos tiene sobre las células bacterianas, así como los mecanismos mediante los cuales ejerce su influencia es un tema que aún se encuentra en desarrollo, y el cual implica un gran interés y desafío. La aplicación de campos eléctricos para influir en la biología celular ha sido un tema importante en el campo biotecnológico durante varias décadas, en donde se han reportado modificaciones en la fisiología de los microorganismos, tales como: cambios en la forma de las células, las características fisicoquímicas de la membrana celular, la permeabilidad y el potencial de membrana [11], con consecuencias en la capacidad de intercambio con el medio exterior, el metabolismo celular y la movilidad [12]. Por ejemplo, Ruijuan Fan y col. (2022), al estudiar el mecanismo de remediación bioelectrocínética del suelo contaminado con pireno, encontró que el campo eléctrico mejoró la expresión de genes funcionales relacionados con el metabolismo, los resultados indicaron que el campo eléctrico promueve la expresión de metabolitos asociados a 14 carbohidratos, 13 lípidos, 13 aminoácidos, y, en particular 11 xenobióticos, mejorando la biodegradación del pireno debido al metabolismo microbiano mejorado [13].

Por otro lado, cuando se aplica una corriente eléctrica a una suspensión bacteriana con electrodos sumergidos, la electrólisis en los electrodos puede generar una variedad de oxidantes químicos, según la presencia de oxígeno y los iones coexistentes, en donde dichos oxidantes son los causantes de la mayor inactivación y mortalidad derivados de la corriente aplicada. No obstante, mediante algunas electrooxidaciones y la hidrólisis del agua en los cultivos bacterianos, se ha aumentado la disponibilidad de oxígeno e hidrógeno, favoreciendo respectivamente la biodegradación aeróbica [14] y la biodegradación anaeróbica [15]. Por ejemplo, en sistemas bioeléctricos basados en la electrólisis del agua, con diferentes configuraciones y variaciones de parámetros operacionales para la remoción de nitrógeno proveniente de aguas residuales, en donde en el cátodo, mediante la producción de hidrógeno se promovían las reacciones de desnitrificación, y en el ánodo, mediante la producción de oxígeno se estimulaba la nitrificación aeróbica.

Además de los cambios promovidos por la hidrólisis del agua, se han identificado otros fenómenos ligados a reacciones electroquímicas, como la oxidación/reducción parcial de contaminantes, la liberación o remoción de iones en solución, la posibilidad de ajustar el potencial redox para activar y/o estimular la producción enzimática específica, o bien provocar cambios en la gran diversidad de reacciones oxido/reducción que conforman al metabolismo bacteriano [7].

Por su parte, la corriente eléctrica también puede afectar la orientación de los lípidos de la membrana, y, por consecuencia, la viabilidad celular. Una corriente eléctrica elevada puede causar una permeabilización irreversible de la membrana celular e incluso puede oxidar directamente los constituyentes celulares. Además, la hidrofobicidad bacteriana puede presentar cambios significativos cuando se presenta estrés oxidativo y la presencia de la corriente eléctrica [16].

Al evaluar el impacto de la corriente eléctrica en las propiedades de la superficie celular de bacterias que degradan fenol en líquidos, se reveló que una corriente eléctrica débil (menor a 20 mA) no indujo cambios significativos en las propiedades superficiales de las bacterias degradadoras de fenol, sin embargo, la exposición a una corriente continua de más de 20 mA podría provocar un aumento de la hidrofobicidad de la superficie, el aplanamiento de las células y la presencia de exudado en la superficie celular. También se encontró que al realizar mediciones del potencial zeta, estos mostraron que la superficie de las células estaba cargada más negativamente cuando las células estaban expuestas a una corriente continua más alta, 40 mA [16].

Los efectos adversos sobre la actividad biológica que se han reportado en los procesos inducidos por campos eléctricos o generados por corrientes continuas están relacionados en su mayoría con: (1) variaciones importantes en el pH, sobre todo en las proximidades de los electrodos, (2) reacciones electroquímicas con producción de especies reactivas de oxígeno, cloro, iones metálicos, dependiendo de las especies presentes y de los electrodos utilizados, y (3) calentamiento excesivo debido a la pérdida óhmica. Por último, cabe señalar que todos estos efectos no deseados pueden ser controlados o evitados. En la figura 2 se muestra un esquema de diversos fenómenos resultantes de la aplicación de campos eléctricos o una corriente continua, estos fenómenos pueden presentarse por separado o en simultaneo, según las condiciones operacionales y los tipos de microorganismos sometidos a dicho estrés [7]

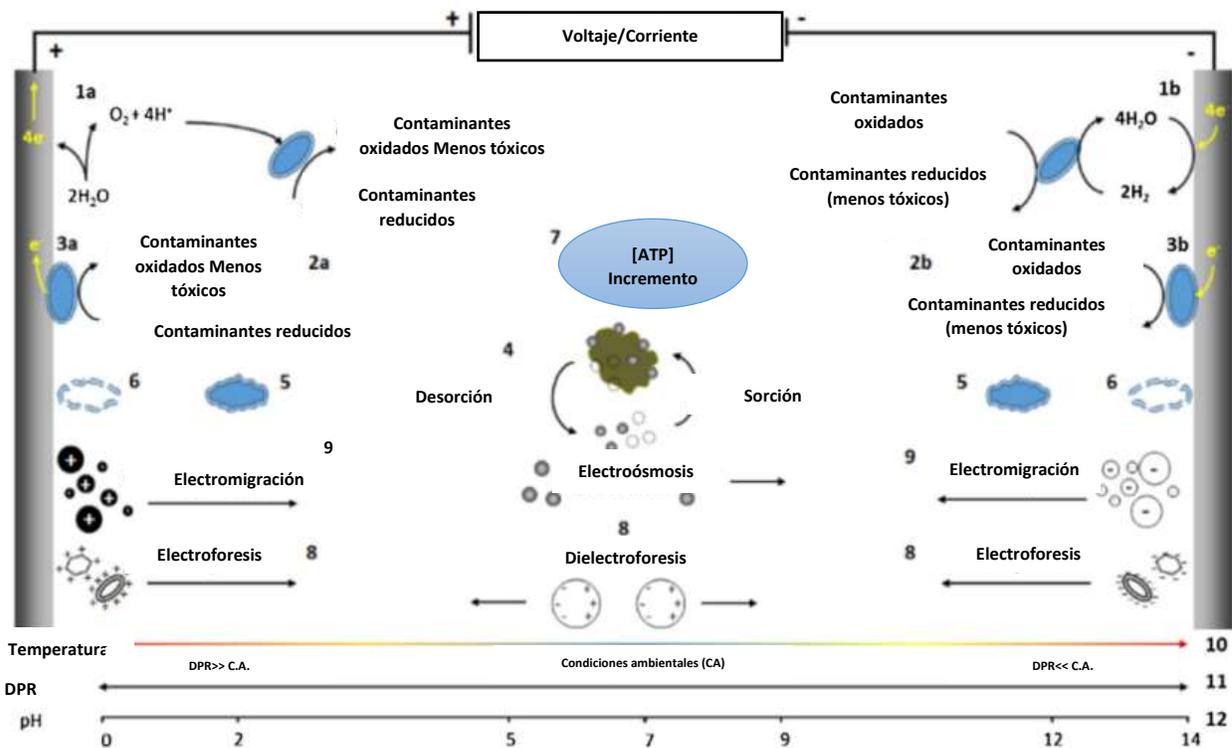


Figura 2. Esquema de diversos fenómenos resultantes de la aplicación de campos eléctricos o una corriente continua. (1) hidrólisis que da como resultado la producción de O₂ (a) y H₂ (b); (2) oxidación parcial (a)/reducción (b) de contaminantes; (3) electrodos sólidos comoceptor de electrones (a)/donante (b); (4) aumento de la biodisponibilidad de contaminantes; (5) modificación en la fisiología y morfología de la célula; (6) pérdida de membrana integridad, con liberación de material citoplasmático y muerte celular; (7) aumento de la concentración de ATP intracelular; (8) aumento en el transporte de moléculas orgánicas, nutrientes y células bacterianas debido a electroósmosis, electroforesis y dielectroforesis; (9) transporte de iones disueltos por electromigración; (10) aumento en temperatura cerca de los electrodos; (11) divergencia del potencial redox de las condiciones ambientales; (12) variación de pH cerca de los electrodos [7].

Las evidencias presentadas en los párrafos anteriores son un importante referente en la aplicación de estímulos eléctricos en microorganismos, donde las condiciones descritas brindan un enfoque acerca de las condiciones operacionales dentro de las cuales se puede trabajar, y que tipo de resultados se pueden esperar. Queda claro que tanto las condiciones de operación, así como las respuestas fisiológicas, están en función de los microorganismos en cuestión, así como de los objetivos a perseguir en cada línea de investigación.

De esta forma, aunque la implementación de campos eléctricos sobre cultivos bacterianos no ha sido una técnica enfocada, y mucho menos estandarizada en la intensificación de los procesos de obtención de productos metabólicos derivados de microorganismos, es claro que se han obtenido efectos positivos sobre dicho proceso, los cuales brindan una innovadora posibilidad en el diseño de nuevas configuraciones de biorreactores haciendo uso de esta técnica, con los cuales se pueda intensificar y optimizar los procesos de obtención de biomoléculas de interés derivadas de microorganismos.

1.3. Implementación del magnesio en cultivos microbianos y su función celular

La alteración en las condiciones de cultivo, como puede ser, la variación de las composiciones de macro y micronutrientes en los medios de cultivo es un método simple y efectivo para activar grupos de genes silenciosos y evaluar el potencial metabólico de una cepa bacteriana [17].

Por su parte, el magnesio es esencial para los procesos bioquímicos de las células procariotas y eucariotas. Además, dicha importancia trasciende a los ámbitos de la aplicación, debido a que la disponibilidad de Mg^{2+} en cultivos celulares y medios de fermentación puede influir drásticamente en el crecimiento y el metabolismo de las células. Debido a sus propiedades fisicoquímicas, el rol biológico del magnesio es primordialmente intracelular, ya que este puede unirse a las membranas celulares, los ribosomas y a las macromoléculas que se encuentran en el citoplasma. De esta forma, el magnesio mantiene la conformación de los ácidos nucleicos, estabiliza los ribosomas, juega un papel importante en la eliminación de daños del ADN y en la síntesis de proteínas, brinda integridad estructural a las membranas celulares, y como activador de más de 300 enzimas diferentes, participa en muchos procesos del metabolismo. A continuación, se describen algunas de las acciones fisiológicas fundamentales del magnesio como catión regulador [18].

Mantenimiento de la integridad celular

El magnesio es de vital importancia en la estabilización de los ácidos nucleicos, las proteínas, los polisacáridos y los lípidos. Además, este participa en la estabilización de la envoltura celular y en la conservación de las barreras de permeabilidad (Walker, 1994). Tanto en los ácidos nucleicos como en la membrana celular constituida por una bicapa lipídica, el magnesio neutraliza los grupos fosfato cargados negativamente brindando así estabilidad. Para que esto suceda, en las bacterias Gram positivas, se debe producir una fuerte unión de Mg^{2+} con los ácidos teicoicos contenido en la pared celular.

Influencia del magnesio sobre el ADN

Como sabemos los ácidos nucleicos son polianiones, por tanto, requieren contraiones que neutralicen los grupos fosfato cargados negativamente (este mecanismo resulta similar a la neutralización ejercida sobre los grupos fosfato en los fosfolípidos de la membrana celular, la cual le brinda estabilidad e integridad). La estructura secundaria y terciaria del ADN logra estabilizarse mediante las interacciones Mg-ADN, en donde los iones metálicos interactúan con las bases de purina en el sitio N7, y las bases de pirimidina en el sitio N3. De igual forma el magnesio estabiliza mediante las interacciones con los átomos de oxígeno cargados negativamente de los grupos fosfato de las cadenas de nucleótidos. Por otro lado, el Mg^{2+} es esencial en para la integridad física del ADN de doble cadena en los ribosomas, en donde este está asociado con el ARNr o las proteínas esenciales para el mantenimiento de la estabilidad física, así como para la agregación de estas estructuras en polisomas, capaces de iniciar la síntesis de proteínas. El Mg^{2+} también actúa como cofactor para las enzimas del

ARN (ribozimas) capaces de reconocer y dividir de manera específica al ARNm objetivo, como cofactor en los procesos de eliminación de daños del ADN [19].

Influencia del magnesio en el metabolismo

Como activador de más de 300 enzimas diferentes, el magnesio participa en diversos procesos metabólicos como la glucólisis, el ciclo de Krebs, la β -oxidación, el transporte activo de iones y el acoplamiento electroquímico a través de las membranas celulares. Todo esto, a su vez, hace que el Mg^{2+} juegue un papel esencial en la síntesis de ATP [19]. El dominio principal de acción del magnesio es la activación de enzimas responsables de la formación, almacenamiento y uso de compuestos de alta energía. Todas las reacciones que involucran ATP requieren la presencia de iones de magnesio, en donde, los complejos de Mg-ATP son esenciales para la actividad catalítica de, por ejemplo, fosfotransferasas (quinasas), nucleotidiltransferasas y ATPasas. Por otro lado, se ha demostrado que el Mg^{2+} es un compuesto integral del citocromo c oxidada o complejo IV, la última enzima de la cadena respiratoria que cataliza la reducción de oxígeno [19].

1.4. Streptomyces, importantes productores industriales

Streptomyces, son una clase de actinobacterias (Gram positivas y aerobias), se encuentran predominantemente en el suelo y la vegetación en descomposición, tienen un ciclo de vida complejo, creciendo como sustratos y micelios aéreos que finalmente forman exosporas [20]. Algunas de sus principales características son: tienen alto contenido de guanina y citocina en su ADN, no forman cuerpos de inclusión, tienen un nivel relativamente bajo de actividad de proteasas extracelulares (las cuales puede afectar la integridad y rendimientos de las proteínas producidas), y tienen una alta capacidad de secreción de metabolitos de interés. Estas propiedades son muy útiles para dirigir la proteína expresada como parte de su metabolismo en una configuración soluble y funcional al sobrenadante del cultivo, una ventaja importante en términos de procesamiento posterior [21]. El género *Streptomyces*, además, exhibe una diversidad metabólica de gran importancia en la industria farmacéutica y biológica, ya que son productoras de una amplia gama de metabolitos y proteínas de alto valor agregado, derivados del metabolismo de dichas bacterias, y también, se han aplicado con éxito como una buena plataforma de expresión alternativa para la creación y producción de proteínas heterólogas. En especial, aproximadamente dos tercios de todos los antibióticos conocidos son producidos por actinobacterias, principalmente por *Streptomyces*, y varias especies se han caracterizado como importantes productores de medicamentos contra el cáncer, antioxidantes, antihelmínticos, inmunosupresores, herbicidas, insecticidas entre otros, por lo cual, el género *Streptomyces* es de crucial importancia para la humanidad [21].

1.4.1. Ciclo de vida de *Streptomyces*

El complejo ciclo de vida de *Streptomyces*, en conjunto con la producción de sus compuestos de interés, hacen que *Streptomyces* sea muy diferente de otros microorganismos Gram positivos.

El crecimiento en cultivos sólidos comienza desde la germinación de las esporas con el desarrollo de hifas compartimentadas (MI; Figura 3) en el medio de cultivo. A la formación de estas hifas le sigue la muerte celular programada (PCD, por sus siglas en inglés), que promueve la evolución de hifas multinucleadas (MII; Figura 3) en hifa productoras de antibióticos y micelio aéreo. Una segunda etapa de PCD ocurre al final del ciclo de vida y el micelio restante se compartimenta para formar esporas unigenómicas.

En cultivo líquido no se presentan las mismas etapas de crecimiento que en medio sólido. En este, la formación de MI es la primera etapa, en lugar de la germinación de esporas. A la formación de MI le sigue la PCD, y la formación de micelio productor de metabolitos secundarios. Cabe señalar que en muchas cepas de *Streptomyces*, la formación de esporas y micelio aéreo se bloquea. Mediante un estudio proteómico de *Streptomyces coelicolor*, demuestra que las proteínas expresadas durante la MII están implicadas en la producción de metabolitos secundarios [22]. En la figura 3 se muestra la representación del complejo ciclo de vida de *Streptomyces*, y las diferencias presentadas en cultivos líquidos y sólidos.

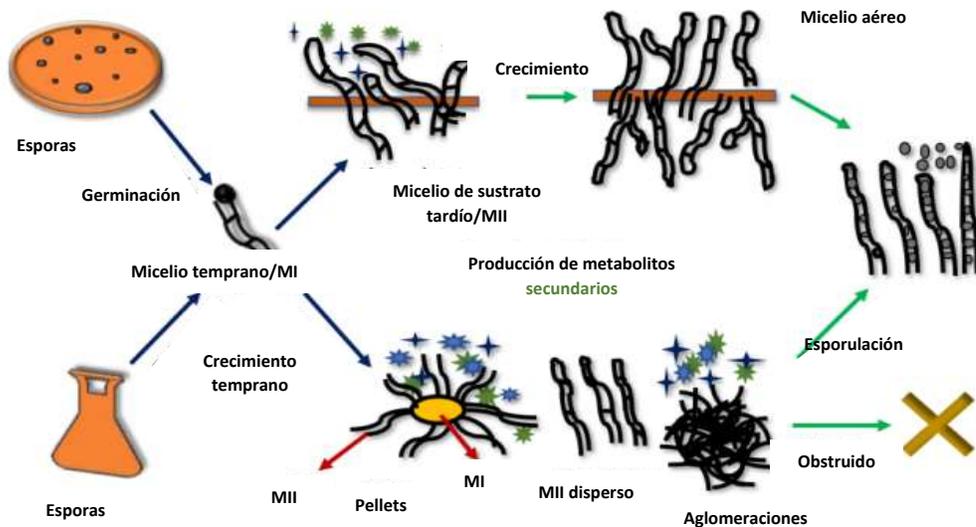


Figura 3. Representación esquemática del complejo ciclo de vida de *Streptomyces* en medio líquido y sólido [22].

1.5. Streptomyces lividans

Streptomyces lividans se han probado con éxito para la producción de proteínas, incluidas terapias humanas y enzimas de importancia industrial [23]. Se estima que los rendimientos de producción más altos superan los 500 mg L⁻¹, incluidas las proteínas con expresión baja o nula en otros sistemas bacterianos tradicionales [24]. A pesar de que existe una gran proyección, todavía se tienen varias limitaciones en la utilización de este microorganismo a escala industrial. Por ejemplo, *Streptomyces* se cultiva generalmente en fermentación discontinua en reactores de tanque agitado con un impulsor de turbina de paletas, donde su micelio vegetativo forma una red de hifas, formando un estilo de vida micelial que da como resultado cultivos heteromorfos y viscosos, que son desfavorables para la fermentación industrial, debido al estrés mecánico, problemas de transferencia de calor y estrés oxidativo, lo cual influye fuertemente en la eficiencia general de la producción, e integridad del producto final deseado [25]. Por otro lado, debemos considerar que las condiciones de funcionamiento del biorreactor, como la agitación, la aireación, entre otras, influyen en gran medida en el crecimiento, la morfología, la transferencia de oxígeno y nutrientes, y, por tanto, en la producción y secreción de los metabolitos de interés [26].

De esta forma, la optimización de los procesos de fermentación de *Streptomyces* (entre ellos, *Streptomyces lividans*) a nivel industrial requiere conocimientos en más aspectos relacionados con la ingeniería de reactores, que, a su vez, van de la mano con los problemas relacionados con el crecimiento y la morfología. Aunque actualmente se les ha dado un sobresaliente énfasis a las herramientas de ingeniería genética para construir rápidamente grandes bibliotecas de cepas, el desarrollo y optimización de bioprocesos todavía constituye un cuello de botella en la industrialización de los productos derivados por *Streptomyces* [25].

1.6. Streptomyces lividans TK24

Streptomyces lividans TK24 es una cepa derivada sin plásmido de *S. lividans* 66. Se desarrolló antes de la secuenciación del genoma en el marco del mapeo de ligamiento cromosómico de *S. lividans* 66, y es la cepa de *Streptomyces* mejor caracterizada genéticamente. Ha sido ampliamente utilizada como cepa hospedadora para la producción de proteínas heterólogas, con la ventaja de que posee baja actividad de proteasas extracelulares, las cuales afectan el rendimiento y la integridad de las proteínas producidas. Por lo general se usa como una fábrica experimental de células microbianas, para la producción de proteínas heterólogas secretadas, incluidas las citocinas humanas, enzimas industriales y varios tipos de antibióticos. Debido a todos estos usos, de *S. lividans* TK24 es una cepa de importancia biotecnológica central. El conocimiento completo de la secuencia del genoma permite la intervención genética para la optimización de la expresión heteróloga de proteínas y fármacos [27].

1.6.1. El metabolismo de Streptomyces lividans TK24

El metabolismo se entiende como el conjunto de las reacciones bioquímicas efectuadas en las células y catalizadas enzimáticamente necesarias para sustentar la vida. En las células bacterianas, el metabolismo es llevado a cabo en el citoplasma y en la membrana plasmática, este incluye dos procesos fundamentales los cuales se encuentran coordinados entre sí (figura 4):

(I) Catabolismo: podemos definir al catabolismo como el conjunto de reacciones que degradan moléculas complejas para transformarlas en productos finales simples, con la finalidad de obtener energía útil para la célula.

(II) Anabolismo: el anabolismo se puede definir como el conjunto de reacciones cuyo fin es la sintetizar de material celular, en donde se forman biomoléculas grandes a partir de otras más pequeñas. La síntesis de biomoléculas más complejas a partir de otras más sencillas requiere de energía y de poder reductor.

La ruta anabólica por la cual una sustancia se sintetiza no es la inversa de la ruta catabólica por la cual la misma sustancia se degrada. Ambas rutas deben diferir en ciertos aspectos, pero ambas están energéticamente favorecidas.

En plantas, hongos y bacterias, como es el caso de *S. lividans*, se suele diferenciar dos tipos de metabolismo, primario y secundario. El metabolismo primario se define como el conjunto de reacciones catabólicas y anabólicas cuyo propósito es el de mantener los procesos vitales y el incremento de la biomasa total. En el metabolismo secundario se forman productos que no son esenciales para el crecimiento del microorganismo. La síntesis de los metabolitos secundarios se produce al final de la fase de crecimiento exponencial o en la fase estacionaria y es provocada por algunas limitaciones nutricionales u otros factores de estrés. Además, dicha fase se encuentra estrechamente relacionada con la diferenciación morfológica en *Streptomyces* [28].

Por su parte, los metabolitos secundarios son producto de una compleja red biosintética, en donde se cree que los miembros de esta red están involucrados en la detección de la disponibilidad de carbono nitrógeno y/o fosfato, y en donde sus precursores son los mismos productos del metabolismo primario (aminoácidos y acetil-CoA). Aunque se han realizado un arduo esfuerzo en conocer la regulación de la biosíntesis de metabolitos secundarios en *Streptomyces*, las características metabólicas que acompañan estas bioproducciones así como la naturaleza y el momento de cambio entre el metabolismo primario y secundario aún no se ha dilucidado por completo [29]. Debido a la complejidad que caracteriza la naturaleza entre el metabolismo primario y secundario, en el presente trabajo nos referiremos a los estadios del metabólicos en *S. lividans TK24* como: (I) metabolismo asociado al crecimiento, (II) metabolismo asociado al mantenimiento o a la fase estacionaria.

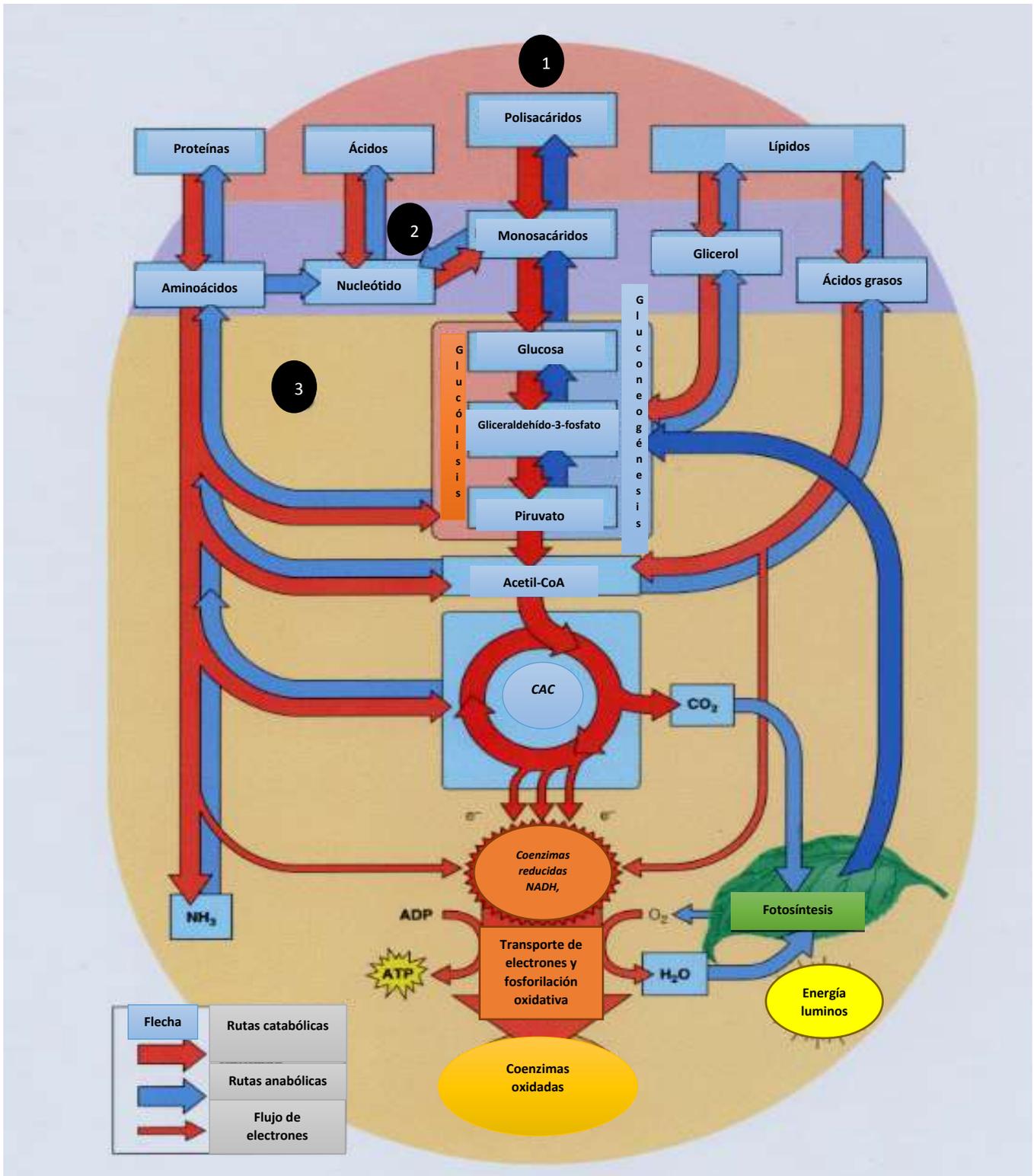


Figura 4. Resumen del metabolismo celular. El metabolismo utiliza la moneda energética del ATP para acoplar las reacciones exergónicas del catabolismo a las reacciones endergónicas del anabolismo.

Estudios que realizaron un análisis proteómico comparativo entre *Streptomyces lividans* TK24 y *Streptomyces coelicolor* M145, dos cepas estrechamente relacionadas, confirmaron que *S. lividans* TK24 posee un metabolismo principalmente glucolítico (el cual se caracteriza por generar ATP a nivel sustrato, y no mediante la fosforilación oxidativa) mientras que el metabolismo de *Streptomyces coelicolor* M145 es principalmente oxidativo (generación de ATP principalmente mediante la fosforilación oxidativa). Dicho estudio también reveló que *S. coelicolor* catabolizó la glucosa de forma menos activa que *S. lividans*, mientras que los aminoácidos fueron catabolizados de forma menos activa por *S. lividans* que por *S. coelicolor*. La abundancia de proteínas glucolíticas en *S. lividans* fue acorde con su alta actividad glucolítica, por otro lado, la abundancia en proteínas involucradas en el metabolismo de los aminoácidos sentó las bases en el entendimiento del metabolismo oxidativo en *S. coelicolor*. Dichas cepas poseen vías biosintéticas idénticas que dirigen la síntesis de tres antibióticos bien caracterizados: antibiótico dependiente de calcio peptídico (CDA), antibiótico policétido rojo undecilprodigiosina (RED), y el antibiótico policétido azul actinorrodina (ACT), pero sólo *Streptomyces coelicolor* los expresa a un alto nivel [30]. De igual forma, estudios previos establecieron que el productor de antibióticos *S. coelicolor* se caracteriza por un metabolismo oxidativo que genera abundante ATP y un contenido reducido de triacilglicerol (TAG) comparado con el no productor, *S. lividans*, cuyo metabolismo es glucolítico y presenta un alto contenido de TAG [29]. Estas características sugieren la existencia de una estrecha correlación ente la capacidad de acumular TAG en conjunto con un metabolismo glucolítico y la de sintetizar antibióticos en un contexto de metabolismo oxidativo.

El análisis global del proteoma en ambas cepas detectó tres grupos principales de proteínas. El grupo 1 contenía proteínas más abundantes en *S. coelicolor* que en *S. lividans*. Este grupo incluye la mayor de las proteínas involucradas en la biosíntesis de los metabolitos secundarios mencionados. El grupo 2 incluía proteínas con un patrón de expresión similar en ambas cepas. Por último, el grupo 3 estaba constituido por proteínas más abundantes en *S. lividans* que en *S. coelicolor*.

El correcto funcionamiento metabólico de una célula requiere de la regulación coordinada de los metabolismos del carbono, fósforo, nitrógeno y energético, de esta forma, al analizar las diferencias en la abundancia de proteínas pertenecientes al metabolismo central del carbono en ambas cepas, encontraron que las enzimas de la glucólisis, la ruta de las pentosas fosfato, el complejo piruvato deshidrogenasa y el metabolismo del desbordamiento fueron más abundantes en *S. lívidas* que en *S. coelicolor*. Esta abundancia en proteínas es consistente con una mayor captación de glucosa, mayor actividad glucolítica y una mejor capacidad para acumular TAG, ya que es un proceso que requiere abundante NADPH sintetizado por la vía de la pentosa fosfato.

Al analizar las capacidades biosintéticas de ambas cepas en función de dos fuentes de carbono utilizadas para el crecimiento, glucosa y glicerol, mediante un análisis comparativo sin etiquetas de los proteomas, se encontró que el glicerol es más lipogénico para ambas

cepas, ya que el contenido de ésteres metílicos de ácidos grasos (FAME) en *S. coelicolor* fue 3.6 veces mayor en glicerol que con glucosa, mientras que para *S. lividans* sólo fue 1.6 veces mayor en glicerol que en glucosa. Curiosamente, la ausencia de TAG en glucosa o la reducción en glicerol en *S. coelicolor* se correlacionó con la biosíntesis de ACT y RED. Por su parte, el consumo de prolina, el aminoácido más abundante del medio y que probablemente constituye la principal fuente de NH_4^+ , aunque siguió siendo mayor por parte de *S. coelicolor*, en glicerol la diferencia fue menos marcada para *S. lividans*.

Por otro lado, en la glucosa, las enzimas que catabolizan los primeros cuatro pasos de la glucólisis y que dan como resultado las triosas fosforiladas GAP y DHAP eran más abundantes en *S. lividans* que en *S. coelicolor*. En la glucosa, estas triosas pasan a ser glicerol-3-fosfato mediante la glicerol-3-fosfato deshidrogenasa, mientras que, en glicerol, el glicerol-3-fosfato resulta de la fosforilación del glicerol por una quinasa de glicerol dependiente de ATP. Es importante mencionar que el glicerol-3-fosfato es un precursor necesario para la biosíntesis de fosfolípidos y/o TAG. La fructosa bis-fosfato aldolasa, la triosa fosfato isomerasa (TPI), la piruvato fosfato diquinasa y la fructosa 1,6-bisfosfatasa fueron más abundantes en glicerol que en glucosa para ambas cepas, lo cual parece lógico ya que estas son enzimas que contribuyen a la gluconeogénesis a partir del glicerol.

Por su parte, la mayoría de las enzimas del ciclo del ácido cítrico (CAC), y en particular las de la parte superior del CAC, la citrato sintasa y la aconitasa, así como la enzima málica dependiente de NADP^+ , fueron de mayor abundancia en *S. lividans* que en *S. coelicolor*, tanto en glucosa como en glicerol. Esto tiene sentido con el mayor crecimiento presentado por *S. lividans*, y, por tanto, con su mayor actividad anabólica. De igual forma, una mayor abundancia de enzimas málicas podría estar relacionada con una mayor acumulación de lípidos, como el alto contenido en TAG. Por el contrario, las enzimas de la parte inferior del CAC que generan cofactores reducidos fueron de 2 a 7 veces más abundantes en *S. coelicolor*, en mayor medida sobre glicerol.

De manera inesperada las proteínas de la cadena respiratoria y del complejo ATP sintasa fueron más abundantes en *S. lividans* que en *S. coelicolor*. Esta menor abundancia de proteínas de la cadena respiratorio en *S. coelicolor* podría entenderse como contradictorio a la sobreexpresión de enzimas que generan cofactores reducidos y con la alta concentración de ATP intracelular de esta cepa, sin embargo, puede darse que en *S. coelicolor*, niveles elevados de ATP ejercen un control regulador de retroalimentación negativa sobre la expresión de enzimas de la cadena respiratoria.

1.6.2. Streptomyces lividans TK24 como productora de moléculas bioactivas

En el laboratorio de Ingeniería Genética y Metabolitos Secundarios de la Universidad Autónoma Metropolitana de la Unidad Iztapalapa, Calderón-de la Sancha (2017) demostró que *S. lividans* TK24, únicamente en un medio de cultivo conformado por glicerol como fuente de carbono y energía, y bacto triptona como fuente de nitrógeno (denominado medio UP), presenta actividad antimicrobiana contra *B. Subtilis*. Este resultado fue totalmente inesperado debido a que *S. lividans* TK24 no presentaba, hasta ese momento, producción de proteínas bioactivas, por lo cual, se había utilizado como microorganismo hospedador en diversos reportes de producción heteróloga de proteínas recombinantes. Esta molécula encontrada, se trata de una molécula bioactiva de gran tamaño, mayor a 3 KDa, que posee actividad antagonista contra *B. subtilis*, la cual, hasta la fecha, se encuentra en vías de aislamiento y caracterización, así como en la búsqueda de evaluar su actividad antagonista contra diferentes microorganismos [31].

Aunque la obtención de moléculas bioactivas derivadas de *Streptomyces* es un tema que ocupa a varios grupos de investigación en la actualidad, aunado con los hallazgos obtenidos en la implementación de campos eléctricos en cultivos bacterianos, hasta el momento no se tienen reportes acerca de la implementación de campos eléctricos sobre el género *Streptomyces*, como una vía para mejorar la obtención de sus moléculas bioactivas de interés. Por lo cual, no se cuenta con conocimientos acerca de los efectos que dicho factor de estrés pueda producir sobre la fisiología del microorganismo, y, por consiguiente, no se tiene conocimiento acerca de la respuesta que un campo eléctrico pueda tener sobre la producción y secreción de sus metabolitos.

A partir de los hallazgos encontrados sobre *Streptomyces lividans* TK24 como productora de una molécula bioactiva con actividad antimicrobiana en condiciones especiales de medio de cultivo UP, y con el conocimiento reportado acerca de los efectos que tiene la aplicación de un campo eléctrico de baja intensidad sobre cultivos microbianos, en donde se ha demostrado que su aplicación influye sobre la fisiología de los microorganismos, lo cual ha llegado a promover la producción y/o secreción de sus productos metabólicos, es factible proponer que la aplicación de un campo eléctrico de baja intensidad sobre cultivos de *Streptomyces lividans* TK24 podría influir sobre la producción y/o secreción de sus moléculas bioactivas con carácter antimicrobiano.

2. JUSTIFICACIÓN

La producción de moléculas bioactivas de interés industrial, a bajo costo y en gran escala, es uno de los principales objetivos de diversos sectores industriales y académicos [23]. Los organismos filamentosos del género *Streptomyces* desempeñan un papel importante en los procesos de producción industrial de moléculas bioactivas de interés, entre ellas, se encuentran algunas con capacidad antimicrobiana. Sin embargo, aunque existen numerosos grupos de investigación trabajando en la caracterización genética de rutas de síntesis de nuevas moléculas bioactivas, en particular, aquellas con actividad antimicrobiana, derivadas de *Streptomyces*, existen muy pocos grupos que trabajen en la intensificación y optimización de bioprocesos sustentables a gran escala.

Actualmente, se ha demostrado que la aplicación de campos eléctricos de baja intensidad en cultivos bacterianos ha provocado cambios fisiológicos, tales como la forma, el metabolismo, el movimiento y la permeabilidad de la membrana celular, los cuales podría favorecer la secreción de sus productos metabólicos [12]. No obstante, no se cuenta con estudios focalizados ni estandarizados en la implementación de campos eléctricos de baja intensidad como una vía para el incremento de la producción de moléculas bioactivas de interés.

Por otro lado, una modificación en la composición química del medio de cultivo es un método simple y efectivo en la búsqueda del aumento en la actividad y producción de compuestos de interés de las células bacterianas. De esta forma, la adición de Mg^{2+} resulta atractivo debido al importante papel que juega en varios procesos celulares relacionados con el crecimiento y el metabolismo [17], al modificar su potencial químico y electroquímico dentro y fuera de la célula.

Por tal motivo, es este trabajo se propone explorar las modificaciones, a nivel fisiológico, que se provocan en *Streptomyces lividans* TK24, durante su crecimiento y producción de moléculas antimicrobianas, por la presencia de iones Mg^{2+} y un campo eléctrico de baja intensidad, buscando obtener respuestas que guíen en la comprensión de los fenómenos implicados a nivel celular, que permitan establecer las bases para el diseño, a futuro, de nuevos biorreactores, con configuraciones novedosas y de mayor eficiencia.

Por último, cabe destacar que, hasta el momento no se cuenta con estudios previos sobre las respuestas fisiológicas asociadas a la aplicación de un campo eléctrico de baja intensidad sobre *Streptomyces lividans* TK24, así como del impacto que tendría la presencia del Mg^{2+} en la composición del medio de cultivo, por lo que este estudio, resulta de gran relevancia en la descripción de los fenómenos involucrados, a nivel celular, y que den paso a investigaciones futuras, orientadas a la ingeniería de biorreactores electroquímicos, que permitan la intensificación de procesos de producción de moléculas de interés industrial.

3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Hipótesis

La aplicación de un campo eléctrico de baja intensidad y la presencia del Mg^{2+} en *Streptomyces lividans* TK24 provocará cambios fisiológicos sobre el microorganismo, los cuales, favorecerán la producción y actividad de moléculas antimicrobianas, sin comprometer la viabilidad de la bacteria.

Objetivos

General

Evaluar las respuestas fisiológicas asociadas a la producción de compuestos antimicrobianos de *Streptomyces lividans* TK24 al aplicar un campo eléctrico de baja intensidad y al incorporar Mg^{2+} en el medio de cultivo, durante la producción de moléculas antimicrobianas.

Particular

- Diseñar un medio de cultivo, líquido, que permita el paso de carga eléctrica y el crecimiento de *Streptomyces lividans* TK24, produciendo moléculas con actividad antimicrobiana.
- Evaluar las respuestas en crecimiento, actividad antimicrobiana, producción de proteínas extracelulares, estructura y superficie celular por parte de *Streptomyces lividans* TK24 en el medio de cultivo diseñado.
- Definir las condiciones de aplicación de campo eléctrico: voltaje, material de los electrodos a utilizar, tiempo de cultivo y período de exposición al campo eléctrico.
- Evaluar los efectos del campo eléctrico sobre el crecimiento, la actividad antimicrobiana, la producción de proteínas extracelulares, estructura y superficie celular de *Streptomyces lividans* TK24.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Microorganismos empleados

Streptomyces lividans TK24

En este trabajo se utiliza la cepa parental *Streptomyces lividans* TK24 como cepa utilizada en las electroestimulaciones. El stock de dicha cepa consiste en una suspensión de esporas en glicerol al 40% v/v a -20 °C. La suspensión de esporas se obtuvo a partir de una siembra en placas con medio SFM incubada por 12 días a 30 °C.

Bacillus subtilis

Es el microorganismo testigo utilizado para medir la actividad antimicrobiana de la molécula de interés. El stock de esta cepa se conservó en suspensión de micelio en glicerol al 40 % v/v a -20 °C. La suspensión de micelio fue obtenida a partir de un cultivo en medio LB durante 16 h a 30 °C y 180 rpm.

4.2. Medios de cultivo

Todos los medios de cultivo descritos a continuación fueron esterilizados a 121°C y 15 lb/in² durante 20 minutos. La composición de cada uno de ellos se expresa en gramos por litro de agua destilada.

Medio Phage

Medio utilizado para el crecimiento de *Streptomyces lividans* TK24:

0.5 g de MgSO₄·7H₂O, 0.74 g de CaCl₂·2H₂O, 10 g de glucosa, 5 g de triptona, 5 g de extracto de levadura, 5 g de Lab Lemco powder. Se ajustó el pH a 7.2±0.1.

Medio SFM

Medio utilizado para la esporulación y formación de micelio en *S. lividans* TK24:

20 g de manitol, 20 g de harina de soya, 20 g de agar bacteriológico.

Medio UP

Medio de producción de la molécula con actividad antimicrobiana de interés utilizado como control positivo sobre la producción de dicha molécula en las electrofermentaciones:

5 g de Bacto triptona (BD), 10 g de Glicerol. Se ajustó el pH a 7.2± 0.1.

Medio UP_{MgSO_4}

Al igual que el medio UP, UP_{MgSO_4} es el medio producción de la molécula con actividad antimicrobiana, donde el sulfato de magnesio permite la transferencia de carga eléctrica al medio:

5 g de Bacto triptona (BD), 10 g de Glicerol, 0.5 g de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$. Se ajustó el pH a 7.0 ± 0.1 .

Medio Luria-Bertani (LB)

Medio utilizado para cultivar a *B. subtilis*:

5 g de NaCl, 10 g de Bacto triptona, 5 g de Extracto de levadura. Se ajustó el pH a 7.0 ± 0.1 .

Medio LB suave

Medio empleado para realizar los bioensayos de actividad antimicrobiana de la molécula de interés:

5 g de NaCl, 10 g de Bacto triptona, 5 g de extracto de levadura a un pH ajustado de 7.0 ± 0.1 , adicionando 10 g de agar bacteriológico.

4.3. Metodología experimental

4.3.1. Estrategia experimental

En el siguiente diagrama se resume la estrategia experimental que se siguió para poder dar cumplimiento a los objetivos establecidos.

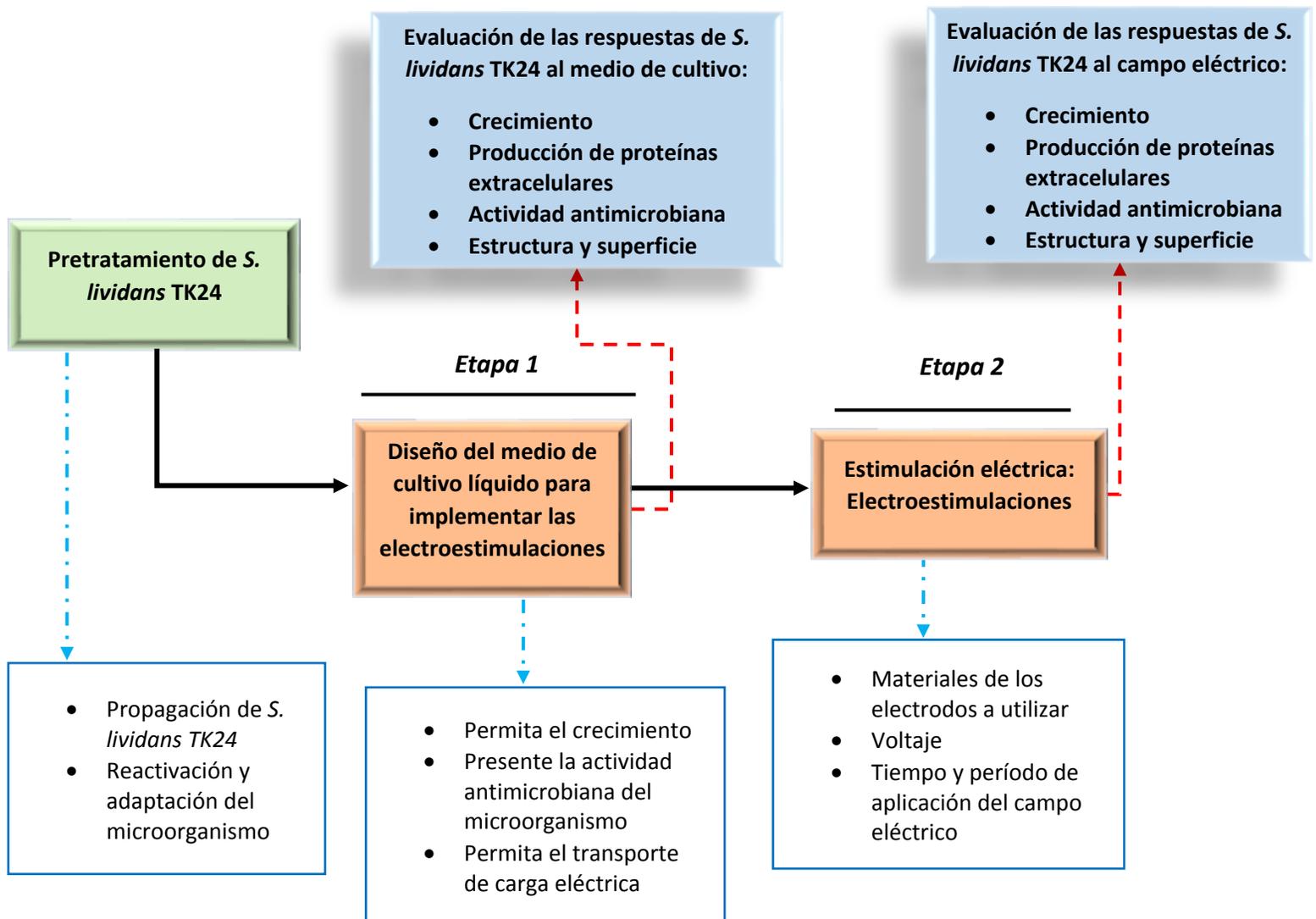


Figura 5. Diagrama de la estrategia experimental abordada en este trabajo.

A continuación, se describe la estrategia experimental mostrada en la figura 5.

4.3.2. Siembra para esporular y colección de esporas en glicerol

Con el fin de tener disponibles los stocks de *S. lividans* TK24 en suspensión de esporas en glicerol, se partió de un liofilizado de *S. lividans* TK24. Se prepararon cajas Petri con 30 ml de medio SFM que fueron inoculadas con 60 μ l de *S. lividans* TK24 silvestre por el método de estrías para obtener colonias aisladas. Las placas se dejaron en incubación por 12 días a 30 °C y posteriormente fueron colocadas en *Tween* 80 (0.01% v/v), y glicerol (80%v/v), relación 1:1. Los stocks de las colonias se conservaron en refrigeración a -20 °C.

4.3.3. Reactivación y adaptación de S. lividans TK24

Como primera etapa experimental del proyecto, se llevó a cabo la reactivación y adaptación de *S. lividans* TK24, partiendo de un stock. Con la finalidad de proporcionar al microorganismo los recursos nutrimentales y las condiciones ambientales necesarios para promover su crecimiento y adaptación, se inocularon 60 μ l de *S. lividans* TK24 en 50 ml de medio Phage líquido contenidos en matraces bafleados de 250 ml bajo las siguientes condiciones: 30 °C, 180 rpm, 48 h.

4.3.4. Fermentaciones en medio UP

El medio de producción UP ha sido recientemente implementado y reconocido como aquel en el cual *S. lividans* TK24 puede producir la molécula con actividad antimicrobiana de interés para este trabajo [31], por tal motivo, el medio UP fue empleado como control positivo en las electroestimulaciones. Se empleó 1 ± 0.1 g de biomasa proveniente de un cultivo previo en medio Phage, se obtuvo por centrifugación (8500 Hertz, 10 minutos, 10°C) y se inoculó en 100 ml de medio UP en matraces bafleados de 250 ml bajo las siguientes condiciones: 30 °C, 180 rpm, durante 96 h.

4.3.5. Selección del medio de cultivo a utilizar en las electroestimulaciones

Debido a que el medio UP no es un buen transportador de carga eléctrica, no puede ser el medio de cultivo en el cual se efectúen las electroestimulaciones, por tal motivo, se realizaron pruebas de medios de cultivo alternos, en donde cada uno contaba con diferentes tipos de sales (capaces de transportar la carga eléctrica) y todos tenían en común los componentes del medio UP previamente descrito. Por su parte, las sales seleccionadas son componentes del

medio Phage utilizado en la etapa de reactivación y adaptación del microorganismo, por lo tanto, son sales que no afectan al crecimiento de *S. lividans* TK24. Los medios de cultivo modificados que se evaluaron fueron los siguientes:

- Medio UP_{MgSO_4} : Contiene medio UP y 0.5 g de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$.
- Medio UP_{CaCl_2} : Contiene medio UP y 0.74 g de $CaCl_2 \cdot 2H_2O$.
- Medio $UP_{MgSO_4 \text{ y } CaCl_2}$: Contiene medio UP, 0.5 g de $MgSO_4$ y 0.74 g de $CaCl_2 \cdot 2H_2O$.

Se empleó 1 ± 0.1 g de biomasa proveniente de un cultivo previo en medio Phage, y se inoculó en 100 ml de cada uno de los medios modificados, contenidos en matraces bafleados de 250 ml respetivamente. El medio UP se tomó como control positivo. Las condiciones de los cultivos fueron las siguientes: 30 °C, 180 rpm, durante 96 h. Todos los medios de cultivo evaluados transportaron la corriente eléctrica y permitieron el crecimiento del microorganismo, sin embargo, el único medio en el cual se presentó actividad antimicrobiana contra el microorganismo indicador fue el medio UP_{MgSO_4} , por tal motivo, este fue el medio seleccionado para llevar a cabo las electroestimulaciones.

4.3.6. Selección de las condiciones operacionales para las electroestimulaciones

4.3.6.1 Selección de los tiempos de cultivo para la aplicación de las electroestimulaciones

Para elegir los tiempos del cultivo a los cuales se iba a aplicar el campo eléctrico en las electroestimulaciones, se evaluó el crecimiento de la biomasa respecto al tiempo (mediante peso seco) y la actividad antimicrobiana respecto al tiempo (mediante el método de difusión en pozos, utilizando a *B. subtilis* como bacteria testigo) de *S. lividans* TK24 en medio UP_{MgSO_4} . De esta forma, se optó por aplicar el campo eléctrico en dos etapas; (1) al inicio del cultivo, donde el microorganismo se encuentra dentro de la etapa de crecimiento y (2) dentro de la etapa estacionaria de crecimiento, donde se presentó la mayor actividad antimicrobiana, a las 48 h.

4.3.6.2. Selección del voltaje y período de aplicación de las electroestimulaciones

En la electroestimulación bacteriana, se ha demostrado que cuando se aplica un campo eléctrico de baja intensidad en un medio de cultivo que actúa como una resistencia eléctrica (comportamiento óhmico) se evitan reacciones secundarias, permitiendo únicamente las reacciones de electrólisis del agua, de esta manera, la composición y propiedades del medio no se modifican [6]. De igual forma, para fines de este trabajo, la selección de los materiales que conforman a los electrodos debe estar hecha de tal forma que no propicien la presencia de reacciones ajenas a la de la electrólisis, por tal motivo se optó por trabajar con electrodos recubiertos de óxido de rutenio y titanio.

Por su parte, se evaluó el comportamiento del voltaje frente a la corriente eléctrica del medio UP_{MgSO_4} , en un rango de 5 a 30 V (considerado como un campo eléctrico de baja intensidad). Se observó que, en dicho rango, el medio de cultivo presenta un comportamiento óhmico, por tanto, se decidió trabajar a un valor intermedio de 15 V. Por otro lado, derivado de experiencias empíricas por parte de Sánchez y col. (2017), se optó por implementar el campo eléctrico durante 10 h consecutivas, con el fin de que el estrés eléctrico no interfiera con la viabilidad del microorganismo.

4.3.7. Electroestimulaciones en medio de cultivo UP_{MgSO_4}

Una vez que se reactivó y adaptó a *S. lividans* TK24, esta se llevó a condiciones propicias para la producción de la molécula con actividad antimicrobiana, en las cuales también, fue aplicado el campo eléctrico. Se empleó 1 ± 0.1 g de biomasa proveniente del cultivo previo en medio Phage, y se inoculó en 100 ml de medio UP_{MgSO_4} contenidos en matraces bafleados de 250 ml, los cuales contenían dos electrodos opuestos entre sí (ánodo y cátodo), recubiertos de óxido de rutenio y titanio.

Se realizaron dos etapas de electroestimulaciones, cada una de ellas en dos cultivos diferentes (figura 5):

- I. Aplicación del Campo eléctrico en la fase de crecimiento (CE_0):** Se aplicó un campo eléctrico de 15 V durante 10 h consecutivas al inicio del cultivo en medio UP_{MgSO_4} bajo las siguientes condiciones: 30 °C, 180 rpm, durante 96 h.

- II. Aplicación del campo eléctrico en la fase estacionario o de mantenimiento (CE_{48h}):** Se aplicó un campo eléctrico de 15 V durante 10 h consecutivas, a las 48 h de cultivo en medio UP_{MgSO_4} bajo las siguientes condiciones: 30 °C, 180 rpm, durante 96 h.

Las dos etapas mencionadas tuvieron como control positivo al medio UP y al medio UP_{MgSO_4} para los cultivos electroestimulados. En la figura 6 se representan las dos etapas de electroestimulaciones tratadas en este trabajo.

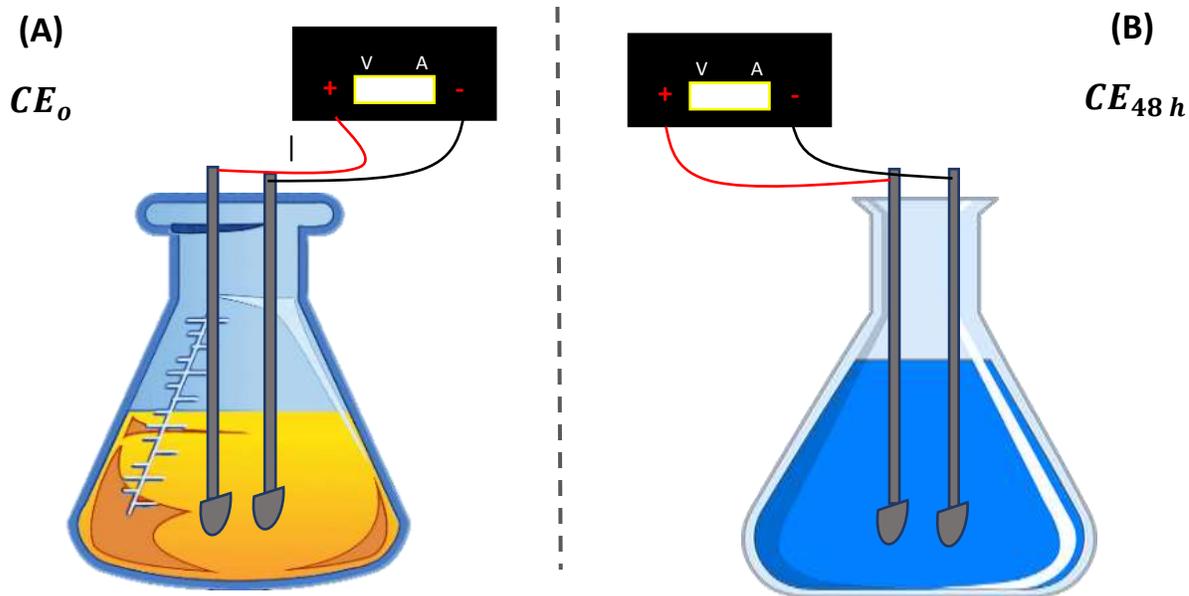


Figura 6. Representación de las dos etapas de electroestimulación tratadas en este trabajo: (A) Cultivo electroestimulado en la fase de crecimiento, al inicio del cultivo (CE_0), (B) Cultivo electroestimulado en la fase estacionaria o de mantenimiento, a las 48 h (CE_{48h}). A y B fueron tratados en el medio de cultivo UP_{MgSO_4} .

4.3.8. Cuantificación de biomasa

Para poder cuantificar la biomasa y la actividad antimicrobiana a través del tiempo, se llevaron a cabo muestreos de cada uno de los cultivos a evaluar (en medio UP, UP_{MgSO_4} y UP_{MgSO_4} con cada una de las etapas de electroestimulaciones mencionadas) a las 10, 20, 24, 48, 58, 69 y 96 h. Se tomó 1 ml de cultivo y se separó la biomasa del sobrenadante por centrifugación (microcentrífuga Thermo Scientific Legend Micro 17) bajo las siguientes condiciones; 10 minutos, 13,300 rpm. La biomasa se lavó dos veces con solución salina (0.9% NaCl) para eliminar los compuestos residuales del medio, posteriormente se secó a 60 °C durante 24 h y el sobrenadante fue almacenados a -20 °C. El crecimiento celular fue evaluado mediante peso seco.

4.3.9. Actividad antimicrobiana

Para evaluar la actividad antimicrobiana se empleó el método de difusión en pozos. Se prepararon cajas Petri cuadradas con 250 ml de medio LB suave embebido con 25 μ l de una solución 1:10 de *B. subtilis* (DO1). Una vez gelificado el medio, este fue perforado mediante un sacabocado estéril de 9 cm de diámetro. En cada pozo se agregaron 200 μ l del sobrenadante obtenido en cada uno de los cultivos a los diferentes tiempos de muestreo. Las cajas fueron llevadas a 4 °C durante 30 minutos, y posteriormente se incubaron a 30 °C durante 16h.

4.3.10. Fraccionamiento del sobrenadante por tamaño molecular

Para establecer si la actividad inhibitoria presente en las diferentes condiciones de cultivo estaba dada por alguna molécula bioactiva de gran tamaño como puede ser una proteína o péptido de alto peso molecular [31], o bien, por algún metabolito, se realizó un fraccionamiento molecular mediante ultrafiltración en tubos Amicon® de 3 KDa, en una centrifuga BECKAM COULTER J6-M1, rotor J1-14. 15 ml del sobrenadante libre de biomasa obtenido a las 70 h de cada medio de cultivo fue llevado a los tubos Amicon® de 3KDa y centrifugado a 4000 xg a 10 °C por 40 minutos. Las fracciones obtenidas fueron colectadas y utilizadas para realizar bioensayos, donde se utilizaron 25 ml de medio LB inoculado con 25 μ l de cultivo de *B. subtilis* (DO1) como microorganismo indicador por el método de difusión en pozos (apartado 5.3.10), se agregó a cada pozo 200 μ l de cada fracción recolectada.

4.3.11. Cuantificación de proteínas en medio extracelular

La cuantificación de proteínas en medio extracelular es un importante referente de los cambios fisiológicos que pudiese presentar *S. lividans* TK24. Esta se llevó a cabo mediante el método de Bradford (1976), para cada uno de los cultivos a los diferentes tiempos de muestreo. Se realizó una curva patrón de albúmina bovina (Bio-Rad, 1.33mg/ml) mediante diluciones de 1:2, 1:5, 1:10, y de esta última, se formaron diluciones en un rango de 900 a 100 μ l, obteniendo un volumen de muestra de 1 ml. Una vez obtenida la curva patrón, se prosiguió a mezclar 480 μ l de sobrenadante y 120 μ l de reactivo de Bradford (Bio-Rad), para formar 600 μ l de solución. Se dejó reaccionar cada una de las soluciones durante 15 minutos en la oscuridad, y posteriormente, se midieron las absorbancias a una longitud de onda de 595 nm en un espectrómetro UV-vis (UV Express PerkinElmer versión 4.1.3, 2012).

4.3.12. Espectroscopía infrarroja

Para este estudio, se midieron los espectros de absorción infrarroja ($400\text{-}4000\text{ cm}^{-1}$) de la biomasa obtenida en cada uno de los cultivos de estudio a las 58 h de cultivo (tiempo uniforme para todas las condiciones de cultivo, en el cual, los cultivos $E_{48\text{ h}}$ ya muestran los efectos de la electroestimulación) en un PerkinElmer Spectrum IR (versión 10.7.2, 2020). La biomasa utilizada para las mediciones fue lavada dos veces con solución salina (0.9% NaCl) para eliminar los compuestos residuales del medio, posteriormente se secó a $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 24 h.

4.3.13. Potencial zeta

La carga superficial de *S. lividans* TK24 a las diferentes condiciones de cultivo entre las 48-69 h fue determinada utilizando un Malvern/Zetasizer (Malvern Instruments 2013), en donde también se evaluó el cambio en la carga superficial en función del pH (para la biomasa obtenida a las 58 h). La biomasa recolectada fue lavada, resuspendida y vortexeada en una solución salina (0.9% NaCl). Las muestras obtenidas fueron analizadas en condiciones naturales de pH, y posteriormente, se realizaron mediciones del potencial Z ajustando el pH en un rango de 0.7-8 mediante soluciones de NaOH 0.5 M y HCl 0.5 M con el fin de poder encontrar el punto isoeléctrico de la célula en cada condición.

5. RESULTADOS

5.1. Selección del medio de cultivo a utilizar en las electroestimulaciones

Como se mencionó en el apartado anterior, debido a que el medio UP no es capaz de conducir la corriente eléctrica, se realizaron pruebas de medios de cultivo alternos capaces de conducir la corriente eléctrica, en donde todos tenían en común los componentes del medio UP previamente descrito. Los medios de cultivo modificados que se evaluaron fueron los siguientes; medio UP_{MgSO_4} , medio UP_{CaCl_2} y medio UP_{MgSO_4} y $CaCl_2$. Los tres medios señalados promovieron el crecimiento del microorganismo, y tuvieron un comportamiento óhmico, en donde el medio UP_{MgSO_4} fue el que presentó una mayor resistencia (figura 7). Por otro lado, el medio UP_{MgSO_4} fue el único en el cual se presentó actividad antimicrobiana contra *B. subtilis* (figura 8). De esta forma, se determinó que el medio de cultivo a utilizar en las electroestimulaciones sería el medio UP_{MgSO_4} .

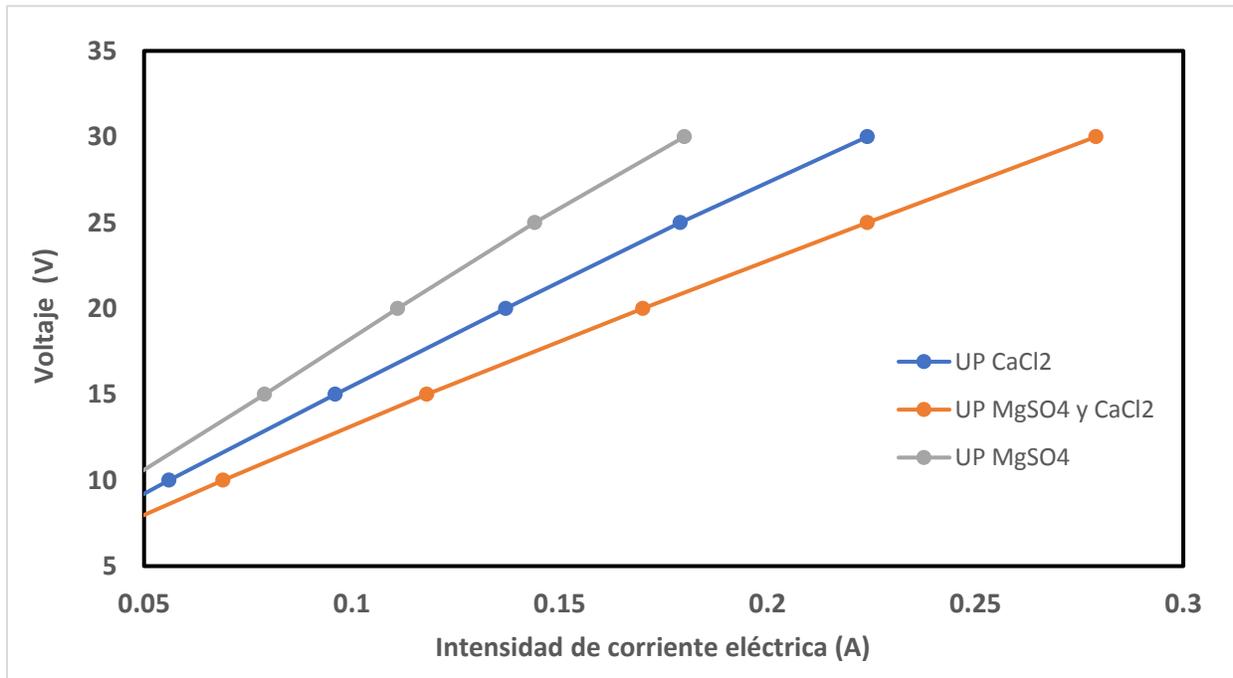


Figura 7. Comportamiento del voltaje frente a la corriente eléctrica para los tres medios de cultivo evaluados: UP_{MgSO_4} , UP_{CaCl_2} y UP_{MgSO_4} y $CaCl_2$. Las resistencias que presentaron los tres medios fueron las siguientes: UP_{MgSO_4} : 151.97Ω , UP_{CaCl_2} : 121.44Ω , UP_{MgSO_4} y $CaCl_2$: 97.02Ω .

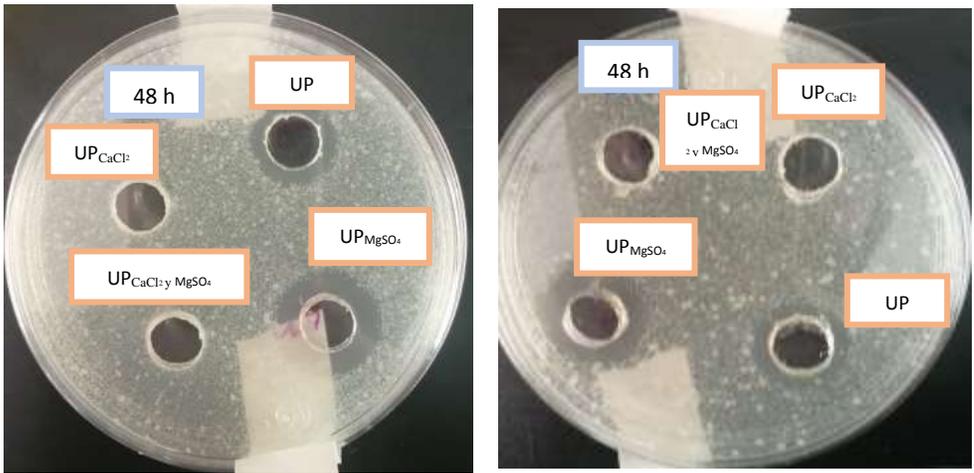


Figura 8. Bioensayos realizados para cada uno de los medios de cultivo (a las 48 h) que estuvieron a prueba. El medio UP_{MgSO_4} fue el único medio que presentó actividad antimicrobiana. El control positivo para estos bioensayos fue el medio UP.

5.2. Pigmentación en los medios de cultivo y cambios morfológicos

Uno de los cambios más evidentes que *S. lividans* TK24 presentó en los resultados de este trabajo, fue la pigmentación de su medio de cultivo propiciada ya sea por, (I) el estrés químico generado por la presencia del sulfato de magnesio en el medio de cultivo (iones Mg^{2+}), o bien, (II) el estrés generado por el campo eléctrico aplicado en la etapa de crecimiento (CE_0), y en la etapa estacionaria o de mantenimiento (CE_{48h}). Los resultados se muestran en la figura 9.

Inicio



58 h

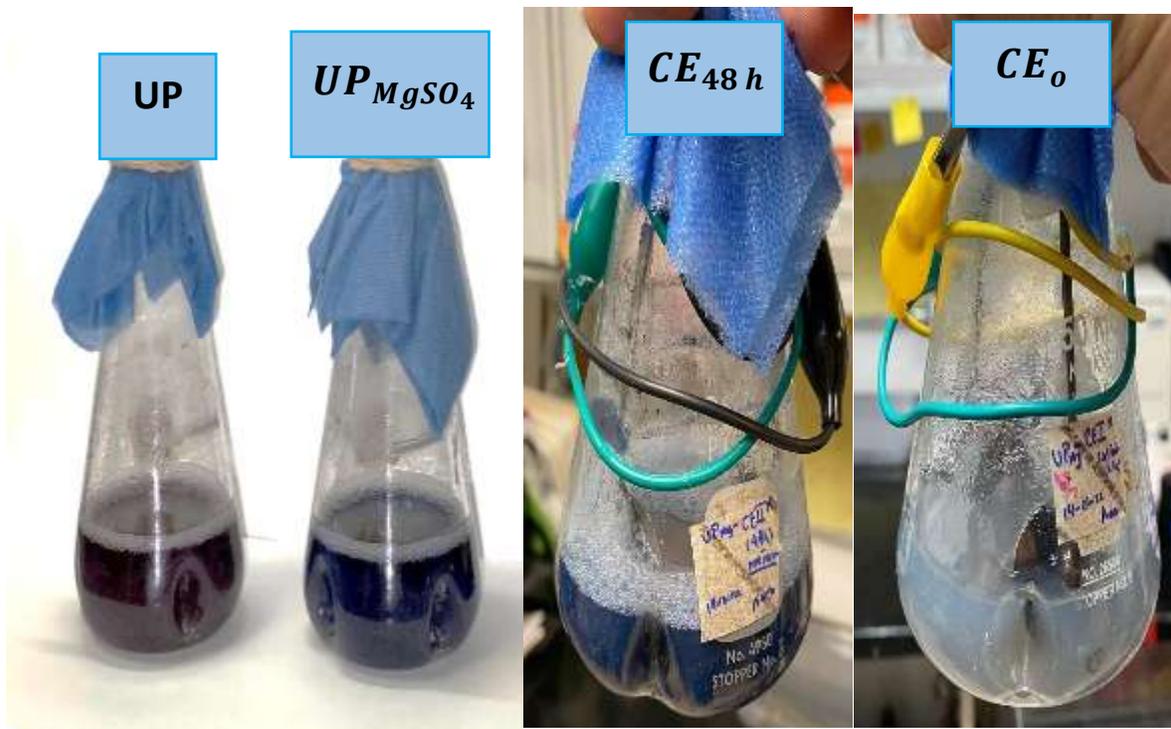


Figura 9. Pigmentación presentada para cada uno de los cultivos, de inicio hasta las 58 h, donde ya no sé mostraron cambios de pigmentación. *S. lividans* TK24 en medio UP_{MgSO4} pigmentó su medio de color azul desde las 20 h, en medio UP pigmentó de color morado a partir de las 48 h, los cultivos CE_0 no mostraron el pigmento azul mostrado en el medio UP_{MgSO4} sin estímulo eléctrico y los cultos CE_{48h} conservaron su pigmento azul.

Como se puede observar, a partir de las 20 h, dentro de la fase de crecimiento, es evidente la diferencia de pigmentación de *S. lividans* TK24 en los medios de cultivo UP y UP_{MgSO4}, se puede observar un color rosa pálido para el medio UP, y azul para el medio UP_{MgSO4}. Por su parte, los cultivo electroestimulados en la etapa de crecimiento (CE_0) parecen tener un color azul grisáceo. Alcanzadas las 48 h (antes de iniciar la segunda etapa de electroestimulaciones), se observa que el medio UP ha alcanzado un color morado, el medio UP_{MgSO4} conserva su color azul, y el medio correspondiente a los cultivos CE_0 conserva el color adquirido a las 20 h. A las 58 h, después de la segunda etapa de electroestimulaciones, se puede notar que no hay cambios evidentes en la pigmentación de los medios de cultivo a los cuales se les aplicó el campo eléctrico en la etapa estacionaria o de mantenimiento (CE_{48h}), en donde, en el intervalo de 58-96 h, ya no se perciben cambios en la pigmentación para ninguno de los medios de cultivo. Dichos resultados podrían estar indicando que la

presencia de iones Mg^{2+} estimulan la producción y/o secreción de la actinorrodina, el cual es un antibiótico policétido de color azul, principalmente reportado como un metabolito secundario producido por *S. coelicor*, pero no por *S. lividans* [32]. Por su parte, se observa que el estímulo eléctrico aplicado en la fase de crecimiento del microorganismo inhibe la presencia del pigmento azul presente en el medio UP_{MgSO_4} , lo cual a su vez podría estar relacionado con la inhibición en la producción y/o secreción de la actinorrodina. Sin embargo, para poder afirmar que el medio UP_{MgSO_4} estimula la producción y/o secreción de la actinorrodina, se requieren técnicas focalizadas a la identificación de metabolitos (como la espectrometría de masas), sin embargo, el cambio en la pigmentación de su medio es un importante indicador que nos habla acerca de los cambios que están ocurriendo en la fisiología de *S. lividans* TK24 derivados tanto del estrés químico como del eléctrico.

Para evaluar los posibles cambios morfológicos derivados de las condiciones de cultivo presentadas, se realizaron microscopías de la biomasa obtenida en cada una de ellas, en un microscopio Velab (VE-B7) objetivo 100X. Los resultados se muestran en la figura 10. Como se puede observar, las microscopías no muestran cambios morfológicos de *S. lividans* TK24 en los diferentes tratamientos, ya que preserva su forma filamentosa en cualquiera de los tratamientos.

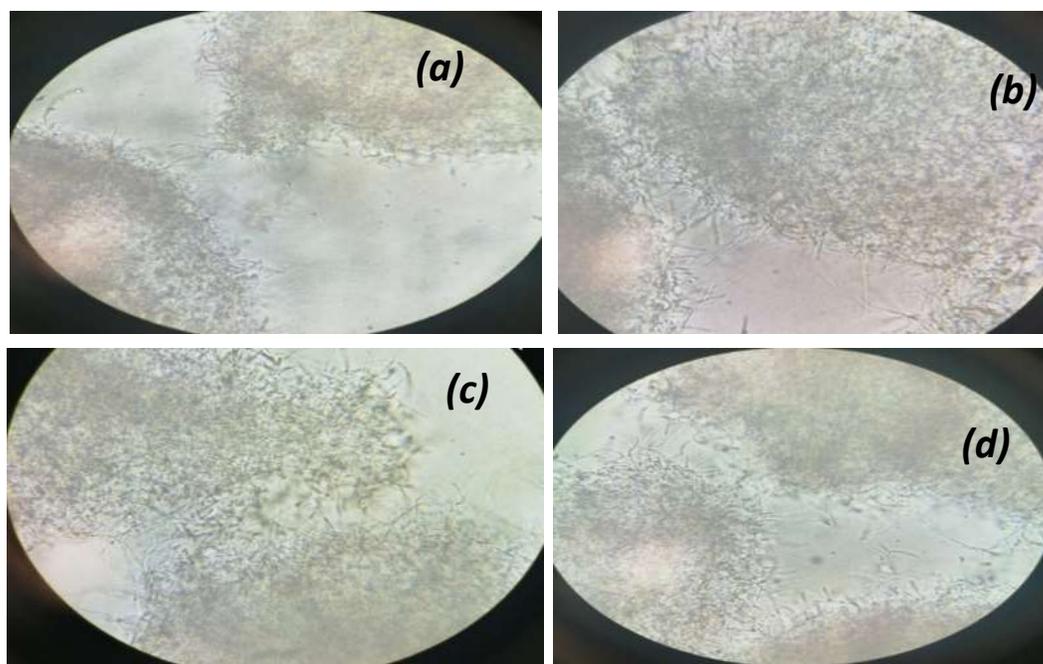


Figura 10. Microscopías de *S. lividans* TK24 a las 58 h de cultivo para cada una de las condiciones tratadas en este trabajo: (a) *S. lividans* TK24 en medio UP, (b) *S. lividans* TK24 en medio UP_{MgSO_4} sin estímulo eléctrico, (c) *S. lividans* TK24 con tratamiento eléctrico CE_0 , (d) *S. lividans* TK24 con tratamiento eléctrico CE_{48h} . Las microscopías no muestran variaciones morfológicas para el microorganismo en las distintas condiciones de cultivo tratadas.

5.3. Cuantificación de biomasa respecto al tiempo

Con el fin de evaluar la respuesta que tuvo el crecimiento de *S. lividans* TK24 al medio de cultivo UP_{MgSO_4} , y a la aplicación del campo eléctrico, se llevaron a cabo muestreos de cada uno de los cultivos a evaluar en un rango de 0-96 h. Se cuantificó el crecimiento respecto al tiempo mediante el peso seco de la biomasa obtenida de los cultivos en medio UP_{MgSO_4} , utilizando como control positivo a los cultivos en medio UP, y de los cultivos a los cuales se les aplicó el campo eléctrico en la fase de crecimiento (CE_0) y en la fase de mantenimiento (CE_{48h}), utilizando como control positivo a los cultivos en medio UP_{MgSO_4} . A continuación, se muestran los resultados obtenidos (figura 11).

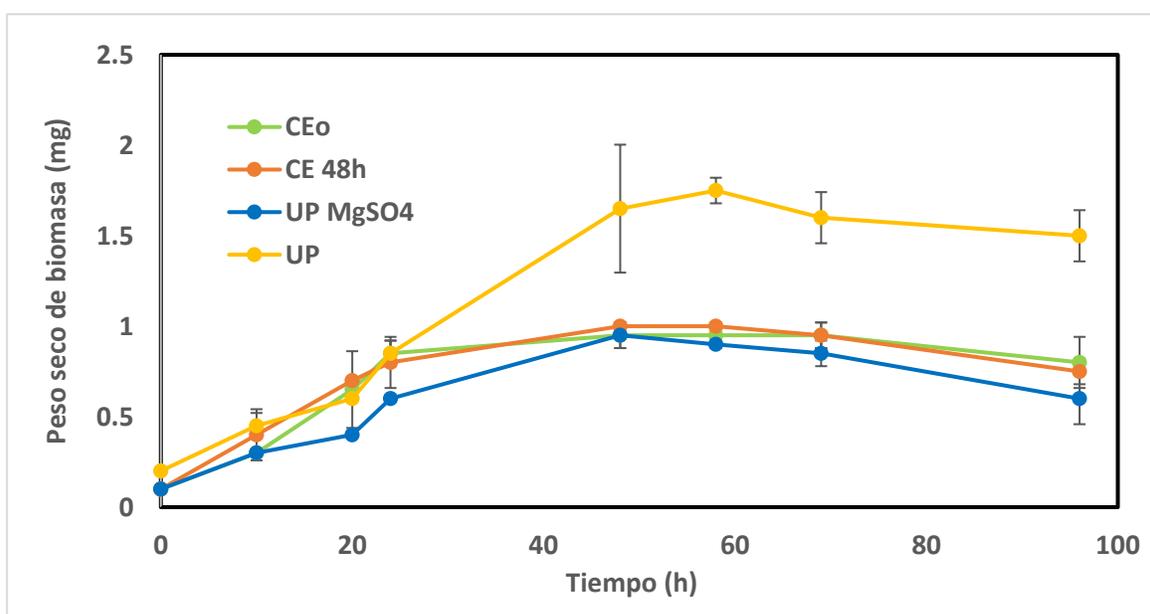


Figura 11. Resultados del crecimiento respecto al tiempo de *S. lividans* TK24 para cada condición. UP y UP_{MgSO_4} representan los cultivos tratados en los respectivos medios, CE_0 representa los cultivos electroestimulados en la fase de crecimiento, CE_{48h} representa los cultivos electroestimulados en la fase de mantenimiento, ambas electroestimulaciones tratadas en el medio UP_{MgSO_4} .

De manera general, los resultados obtenidos del crecimiento respecto al tiempo en todas las condiciones de cultivo tratadas no muestran tener una fase lag o de adaptación, si no que, *S. lividans* TK24 comienza a crecer una vez iniciado el cultivo. Por otro lado, *S. lividans* TK24 en medio UP mantiene el crecimiento hasta las 48 h, donde después comienza su etapa estacionaria, la cual se mantiene hasta las 69 h aproximadamente, seguida de una ligera etapa de decaimiento. Por su parte, los cultivos en medio UP_{MgSO_4} con y sin la aplicación del campo eléctrico, también presentan una etapa de crecimiento hasta las 48 h aproximadamente, sin

embargo, está es más discreta respecto de los cultivos en medio UP. De igual forma, después de las 48 h el microorganismo entra a la fase estacionaria, y a las 69 h aproximadamente también se percibe una ligera etapa de decaimiento.

La figura 11 nos muestra el efecto del sulfato de magnesio sobre el crecimiento del microorganismo, en donde es evidente que la sal de magnesio limitó el crecimiento al compararse con el control positivo, el medio UP. De igual forma, podemos observar el efecto que tuvo la aplicación del campo eléctrico en las dos etapas de electroestimulaciones mencionadas (CE_0 y CE_{48h}) al compararlas con el control positivo, el medio UP_{MgSO_4} . En este caso, el campo eléctrico no muestra tener efectos adversos sobre el crecimiento de *S. lividans* TK24, tampoco muestra inferir sobre los tiempos de las etapas metabólicas (metabolismo asociado al crecimiento y metabolismo asociado al mantenimiento) del microorganismo, con lo cual se puede decir que el campo eléctrico bajo las condiciones operacionales establecidas no afecta a la viabilidad del microorganismo.

5.4. Actividad antimicrobiana respecto al tiempo

La actividad antimicrobiana fue evaluada mediante la medición del halo de inhibición presente en los bioensayos realizados por el método de difusión en pozos del sobrenadante libre de biomasa, obtenido en las distintas condiciones de cultivo a través de las 96 h (figura 12).

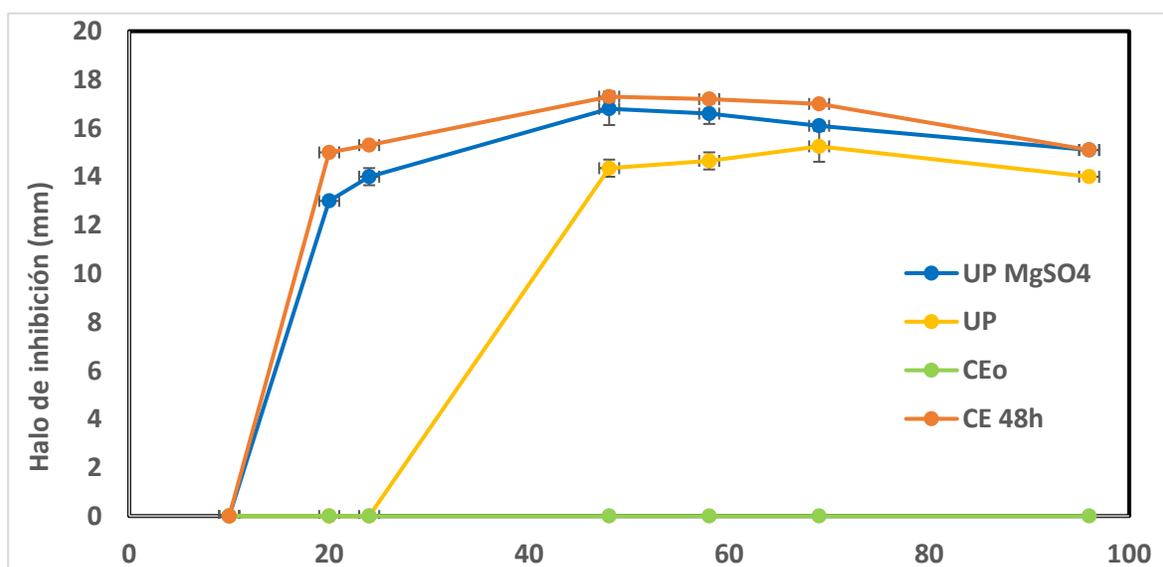


Figura 12. Resultados de la actividad antimicrobiana (AA) respecto al tiempo presentada por *S. lividans* TK24. Se puede observar la respuesta de la (AA) al estrés químico, UP y UP_{MgSO_4} representan los cultivos tratados en los respectivos medios, y la respuesta de la (AA) al estrés eléctrico: CE_0 representa los cultivos electroestimulados en la fase de crecimiento, CE_{48h} representa los cultivos electroestimulados en la fase de mantenimiento, ambas electroestimulaciones tratadas en el medio UP_{MgSO_4} .

En la figura 12 se puede observar el efecto del sulfato de magnesio sobre la actividad antimicrobiana de *S. lividans* TK24. Dicha actividad se ve favorecida en respuesta al estrés químico propiciado por los iones Mg^{2+} , ya que, esta se presenta desde las 20 h del cultivo, en contraste con el control positivo, en el cual se presenta actividad inhibitoria hasta las 48 h. También se observa un incremento en dicha actividad derivado de la presencia del magnesio, la cual alcanza su máximo a las 48 h, y se mantiene favorecida respecto al control positivo hasta las 96h. Estos resultados en conjunto con el conocimiento que se tiene acerca de la influencia del magnesio en los procesos bioquímicos celulares, nos sugiere que la presencia de los iones Mg^{2+} podrían estar ocasionando lo siguiente: (i) cambios en la superficie de la célula (en la pared y/o membrana celular) que modifican su permeabilidad y favorecen la secreción de los productos metabólicos asociados a compuestos antimicrobianos, (ii) cambios a nivel metabólico, favoreciendo un metabolismo oxidativo que promueve la síntesis de antibióticos [30] (iii) cambios a nivel proteómico, y, por último, (iv) cambios a nivel genómico. Estos últimos (iii-iv) estarían favoreciendo la expresión de genes y/o proteínas relacionadas con la biosíntesis de antibióticos.

Por su parte, como se observa en la figura 12, las electroestimulaciones aplicadas al inicio del cultivo no permitieron la presencia de actividad antimicrobiana, por el contrario, las electroestimulaciones aplicadas en la etapa estacionaria o de mantenimiento (a las 48 h), permitieron la conservación de la actividad presente en el medio UP_{MgSO_4} , en donde incluso, esta se observa ligeramente favorecida. Dichos resultados sugieren que el aplicar el estrés eléctrico en la fase de crecimiento inhibe la secreción o la formación de los productos metabólicos antimicrobianos de *S. lividans* TK24 producidos en el medio UP_{MgSO_4} . De igual forma, lo anterior puede estar relacionado con modificaciones superficiales en la célula, modificaciones a nivel metabólico, o bien, cambios a nivel genómico y/o proteómico, en donde se estaría inhibiendo un metabolismo oxidativo, favoreciendo un metabolismo biosintético que limita la producción de compuestos antimicrobianos. Curiosamente, para los cultivos electroestimulados en la fase de crecimiento, la inhibición de la actividad antimicrobiana se empalmó con la inhibición del pigmento azul presente en el medio de cultivo. Estos resultados nos dieron a pensar que el someter a *S. lividans* TK24 a un estrés eléctrico en la fase de crecimiento, de alguna forma inhibía la producción y/o secreción de alguna proteína con actividad antimicrobiana, o bien, la presencia de algún metabolito con actividad antimicrobiana (como la actinorrodina).

5.5. Fraccionamiento del sobrenadante por tamaño molecular

Al no saber si la actividad antimicrobiana presentada por *S. lividans* TK24 en el medio de cultivo UP_{MgSO_4} , y en la etapa de electroestimulación CE_{48h} estuviera dada por alguna proteína bioactiva, como se verificó en el trabajo realizado por Calderón-de la Sancha (2017),

y no por la presencia de algún nuevo metabolito secretado y/o producido, ya sea por el estrés generado por parte de los iones Mg^{2+} , o por el estrés derivado de la aplicación del campo eléctrico, se realizó un fraccionamiento molecular del sobrenadante libre de biomasa obtenido a las 70 h de cultivo mediante ultrafiltración en tubos Amicon® de 3 KDa para cada una de las condiciones de cultivo tratadas en este trabajo. Dichas pruebas estuvieron a su vez acompañadas de bioensayos de cada una de las fracciones obtenidas. Los resultados se muestran en la figura 13.

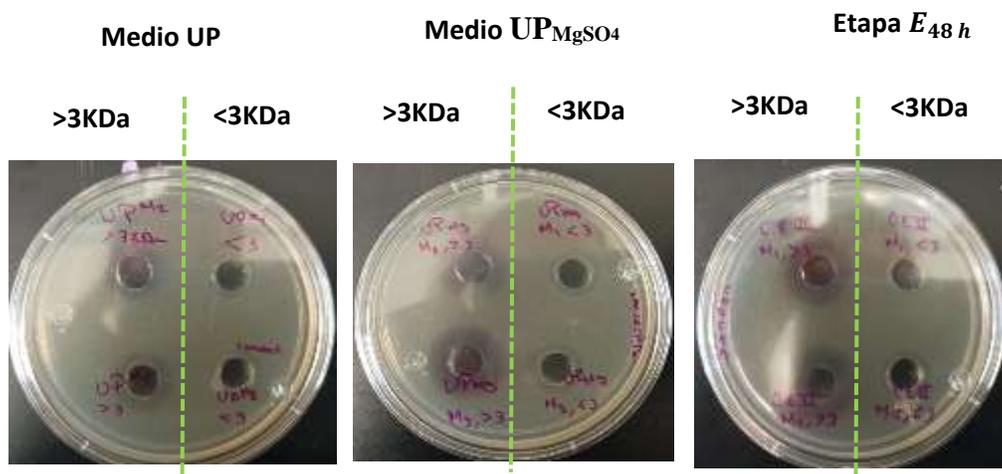


Figura 13. Bioensayos realizados con las fracciones obtenidas mediante ultrafiltración de los sobrenadantes de los medios UP, UP_{MgSO_4} , y UP_{MgSO_4} electroestimulado en la fase de mantenimiento, obtenidos a las 70 h de cultivo.

Los resultados de los bioensayos realizados nos indican que la actividad antimicrobiana está asociada principalmente con alguna proteína bioactiva, ya que la inhibición bacteriana se presenta básicamente en las fracciones $>3KDa$ para los tres casos presentados (incluyendo el control positivo UP). Los halos de inhibición de menor longitud en las fracciones $<3KDa$ podría estarnos hablando acerca de presencia de algún metabolito sintetizado y secretado que está presentando una débil actividad inhibitoria, o bien, dicha actividad pudo presentarse por una deficiencia en el proceso de filtración. No obstante, es claro que la actividad inhibitoria se encuentra predominantemente en las fracciones $>3 KDa$, la cual podría estar relacionada con la molécula bioactiva de gran tamaño reportada por Calderón de la Sancha y col. (2017).

5.6. Concentración de proteínas extracelulares

Al comprobar que la actividad inhibitoria en el medio de cultivo UP_{MgSO_4} , y en la etapa de electroestimulación $CE_{48 h}$ está asociada con una proteína bioactiva, el siguiente paso fue cuantificar la concentración de proteínas en medio extracelular, siendo también, un importante referente de los cambios fisiológicos presentes en *S. lividans* TK24, derivados del estrés químico proveniente de la presencia del sulfato de magnesio en el medio UP_{MgSO_4} , o

derivados del estrés eléctrico proveniente de las electroestimulaciones. Por tanto, la cuantificación de proteínas en medio extracelular resulta importante a la hora de evaluar la actividad antimicrobiana específica causada por la proteína bioactiva. Los resultados de la cuantificación de proteínas en medio extracelular llevada a cabo por el método de Bradford se muestran en la figura 14.

En la figura 14 podemos observar que la presencia del magnesio disminuyó la concentración de proteínas en medio extracelular a partir de las 24 h de cultivo (dentro de la fase de crecimiento), al compararla con el medio de cultivo UP. Por su parte, podemos observar que la aplicación del campo eléctrico en la etapa de crecimiento disminuye dicha concentración hasta las ≈ 48 h, dentro de la fase de crecimiento, después de este tiempo, la concentración de proteínas no se ve mermada al compararse con el control positivo, el medio UP_{MgSO_4} . En cuanto a la aplicación del campo eléctrico en la etapa estacionaria o de mantenimiento, podemos observar como el estrés eléctrico reduce la concentración de proteínas extracelulares (después de las 58 h).

Es claro que, en lo que respecta a la producción y/o secreción de proteínas extracelulares, el estrés químico juega un papel preponderante sobre el estrés eléctrico. El hecho de que el Mg^{2+} este interfiriendo en la producción y/o secreción de proteínas extracelulares no es de sorprender, como se sabe, este es esencial en el desarrollo de las funciones bioquímicas de las células bacterianas. El magnesio intracelular interactúa con los ácidos nucleicos que conforman al ADN, puede unirse a los ribosomas, las membranas celulares o a las macromoléculas que se encuentran dentro del citoplasma, siendo indispensable en la síntesis y transformación de proteínas. De igual forma, este juega un papel en diversos procesos metabólicos como la glucólisis, el ciclo de Krebs, la β -oxidación, el transporte activo de iones y el acoplamiento electroquímico a través de las membranas celulares [19]. De esta forma, los efectos obtenidos sobre la concentración de proteínas derivados del estrés químico que ejerce el magnesio pueden estar asociados a múltiples factores.

Por otro lado, aunque el estrés eléctrico tuvo un impacto menos significativo en la concentración de proteínas extracelulares, podemos ver como la aplicación del campo eléctrico disminuye dicha concentración en cada una de las etapas en las cuales fue aplicado, sin embargo, los efectos de las electroestimulaciones aplicadas en la fase del metabolismo asociado al crecimiento no se prolongan hasta la fase del metabolismo asociado al mantenimiento.

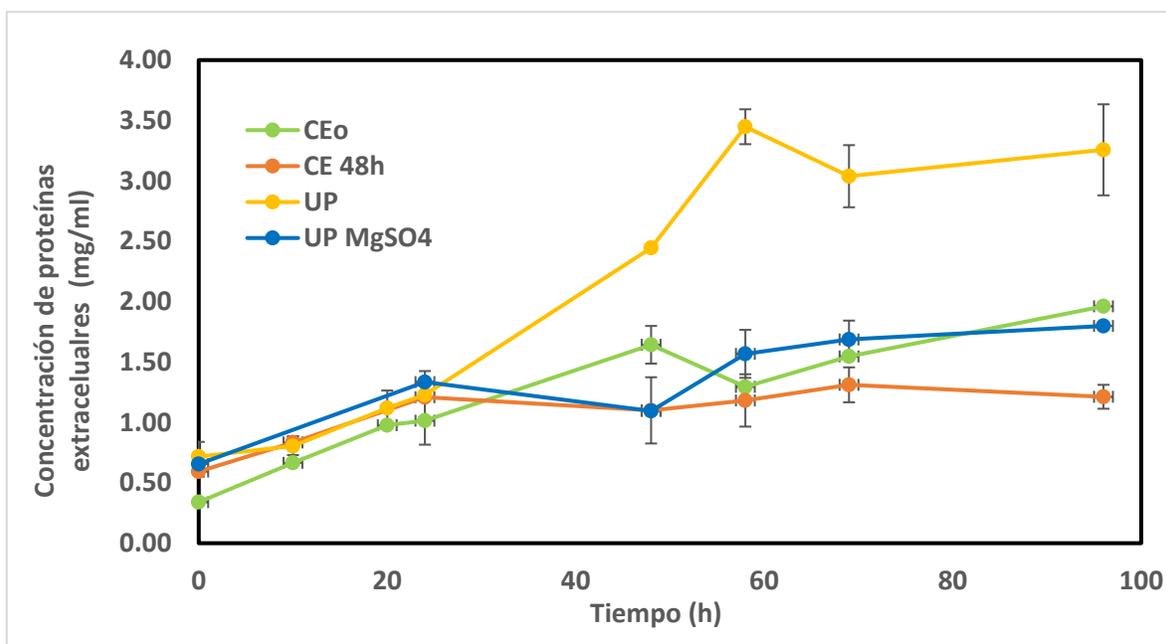


Figura 14. Resultados de la concentración de proteínas extracelulares para cada condición de cultivo. Se puede observar la respuesta de la concentración de proteínas extracelulares derivada del estrés químico: UP y UP_{MgSO4} representan los cultivos tratados en los respectivos medios. De igual forma, se puede observar la respuesta de la concentración de proteínas y péptidos extracelulares derivada del estrés eléctrico: CE₀ representa los cultivos electroestimulados en la fase de crecimiento, CE_{48h} representa los cultivos electroestimulados en la fase de mantenimiento, ambas electroestimulaciones tratadas en el medio UP_{MgSO4}.

5.7. Actividad antimicrobiana específica respecto a la concentración de proteínas extracelulares

Para evaluar la actividad antimicrobiana específica, se comparó la actividad antimicrobiana (longitud de halo de inhibición) respecto a la concentración de proteínas extracelulares presentes en cada condición de cultivo. Los resultados de la actividad específica se muestran en la figura 15.

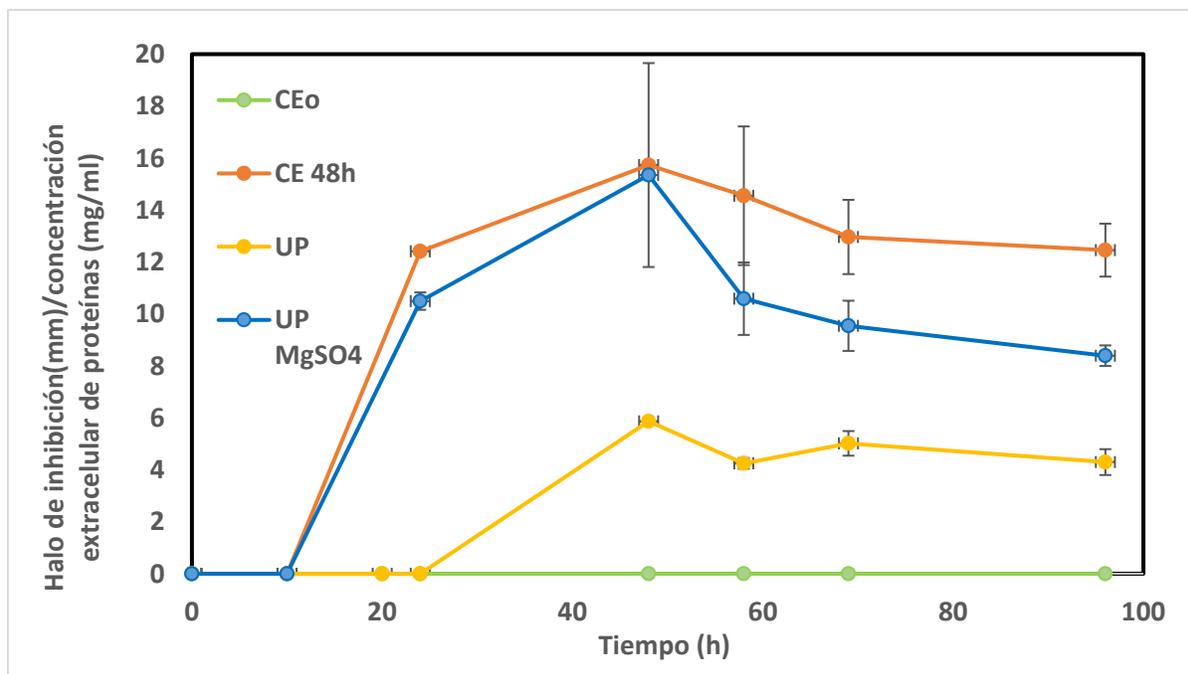


Figura 15. Actividad antimicrobiana específica respecto a la concentración de proteínas extracelulares, correspondiente a cada condición de cultivo tratada. UP y UP_{MgSO4} representan los cultivos tratados en los respectivos medios, CE_o representa los cultivos electroestimulados en la fase de crecimiento, CE_{48h} representa los cultivos electroestimulados en la fase de mantenimiento, ambas electroestimulaciones tratadas en el medio UP_{MgSO4}.

Evidentemente los cultivos a los cuales se les aplicó campo eléctrico al inicio del cultivo no muestran actividad específica, ya que no hubo actividad antimicrobiana. Sin embargo, los cultivos en medio UP pese a tener la mayor concentración de proteínas extracelulares, muestran una menor actividad específica respecto a los cultivos llevados a cabo en medio UP_{MgSO4}. Por otro lado, después de las 58 h, los cultivos a los cuales se les aplicó el campo eléctrico en la etapa estacionaria o de mantenimiento, muestran una mayor actividad específica respecto a los cultivos sin estímulo eléctrico, la cual se mantiene hasta las 96 h. Por otro lado, la actividad específica de los cultivos CE_{48 h} se muestra estable a partir de que es aplicado el estrés eléctrico y hasta las 96 h de cultivo, en contraste con el control UP_{MgSO4}, en el cual decae la actividad inhibitoria precisamente después de las 48 h. Esto sugiere que además de un mayor rendimiento, el campo eléctrico está brindando estabilidad a la actividad antimicrobiana presente en el medio UP_{MgSO4}, o bien, estabiliza a dicha proteína bioactiva presente en el medio extracelular.

5.8. Espectroscopia infrarroja

En este estudio, se utilizó la espectroscopia infrarroja con el fin de detectar cambios moleculares y estructurales en *S. lividans* TK24. De esta forma, es factible detectar dichos cambios celulares relacionados al estrés químico proveniente del sulfato de magnesio contenido en el medio UP_{MgSO_4} o al estrés provocado por el campo eléctrico. Los resultados se muestran en la figura 16.

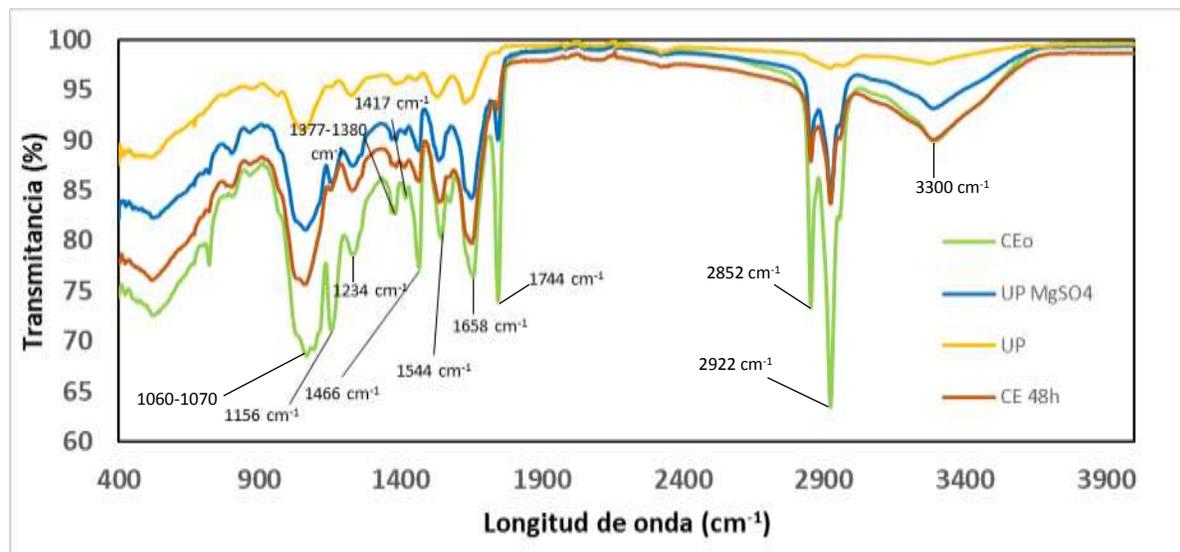


Figura 16. Espectros infrarrojos de *S. lividans* TK24 para cada condición tratada a las 58 h de cultivo.

En la figura 16 podemos distinguir las regiones espectrales de *S. lividans* TK24 proveniente de las distintas condiciones de cultivo tratadas en este trabajo a las 58 h de cultivo: medio UP, UP_{MgSO_4} , y UP_{MgSO_4} con las etapas de electroestimulaciones descritas previamente (CE_o y CE_{48h}). La banda presente en 3300 cm^{-1} está asociada a los estiramientos entre el enlace N-H, característicos de las aminas secundarias [33]. Las bandas correspondientes a 2922 y 2852 cm^{-1} , están asociadas a los enlaces C-H, a sus estiramientos asimétrico y simétrico respectivamente, los cuales entran dentro de la ventana lipídica ($\approx 2986\text{-}2841\text{ cm}^{-1}$), en la cual, las diferencias espectrales reflejan la composición lipídica de la pared celular de las bacterias Gram-positiva y Gram-negativa [34]. El pico en $\approx 1744\text{ cm}^{-1}$ corresponde al estiramiento C=O de lípidos. La banda presente en $\approx 1658\text{ cm}^{-1}$ está relacionada a las amidas primarias (estiramiento del grupo C=O), y es la más sensible a la estructura secundaria de la proteína. De igual forma, para los cultivos tratados en medio UP_{MgSO_4} , se puede observar un ligero hombro $\approx 1630\text{ cm}^{-1}$ asociado con la presencia de fracciones considerables de β -estructuras y/o componentes irregulares en el canal de K^+ [35]. En $\approx 1544\text{ cm}^{-1}$ se muestra un pico correspondiente a las amidas secundarias (combinación de estiramiento C-N y flexión N-H). En ≈ 1466 y 1417 cm^{-1} , se encuentran bandas asociada a la flexión del grupo CH_2 y

CH₃ en lípidos, mientras que, los picos consecutivos entre ≈ 1377 - 1380 cm^{-1} corresponden a las amidas terciarias. Las bandas correspondientes a 1234 y 1156 cm^{-1} corresponden a estiramientos de los enlaces C-O encontrados en los lípidos, y el intervalo de 1200 - 900 cm^{-1} corresponde a deformaciones en la estructura de carbohidratos (estiramiento de enlaces C-C), y grupos fosfato. Por último, la región de 900 - 700 cm^{-1} es la denominada huella dactilar que refleja características no definidas, como pueden ser estructuras cuaternarias de las proteínas y otras macromoléculas, pero específicas a cada microorganismo [36].

En los espectros mostrados, podemos observar importantes diferencias tanto en la intensidad como en la forma de las señales. Las señales que hacen referencia a la composición lipídica de la célula, incluyendo a la composición lipídica de la pared celular de las bacterias, son muy intensas en los cultivos electroestimulados en la fase de crecimiento, siguiéndole, en menor medida, los cultivos electroestimulados en la fase de mantenimiento. Aunque los cultivos tratados en medio UP_{MgSO₄} sin electroestimulación también presentan una importante intensidad de señales en dichas ventanas lipídicas, esta intensidad se presente en menor medida que la de los cultivos electroestimulados. El mismo comportamiento lo podemos observar en las señales referentes a las moléculas nitrogenadas (como aminas, amidas, péptidos y proteínas), y en la ventana referente a la estructura de los carbohidratos, y grupos fosfato. Sin embargo, las señales referentes a las estructuras de los carbohidratos y grupos fosfato no sólo se muestran de mayor intensidad para los cultivos CE_o, si no que, también se muestran diferentes en su forma respecto a los otros espectros, al presentar un mayor número de hombros. Por su parte, entre los cultivos tratados en medio UP y los cultivos tratados en medio UP_{MgSO₄} (con y sin electroestimulación) se observa un cambio en intensidad y forma de la señal referente a las amidas primarias.

Los resultados de los espectros nos sugieren que el contenido de lípidos, carbohidratos y moléculas nitrogenadas constituyentes de la pared y membrana celular, principalmente, está en función del estrés al cual es sometido *S. lividans* TK24, en donde las células a las cuales se les sometió al estímulo eléctrico en la fase de crecimiento, presentan un mayor contenido de dichos componentes. Esto podría explicarse como una respuesta metabólica del microorganismo, en donde se estaría propiciando, derivado del estrés eléctrico, una alta actividad anabólica y un metabolismo glucolítico, el cual estuviese enfocado en sintetizar gruesas capas de recubrimiento en la pared y en la membrana celular, conformando una barrera de protección en respuesta al estrés. De igual manera, el cambio en la forma de las señales correspondientes a la ventana de carbohidratos y grupos fosfato, podría sugerir cambios estructurales en la pared y membrana celular, posiblemente en el peptidoglucano constituyente de la pared celular y en los grupos fosfato. Lo anterior está íntimamente relacionado con los resultados obtenidos de los cultivos CE_o, donde se observa la inhibición tanto del pigmento presente en el medio de cultivo con en la actividad antimicrobiana, sustentando la hipótesis de la desviación de los flujos metabólicos que conlleva a una biosíntesis sin producción de compuestos con actividad antimicrobiana.

Derivado de los espectros infrarrojos obtenidos, se realizaron las deconvoluciones en la región de las Amidas primarias (figura 17). Las deconvoluciones muestran cambios en las estructuras secundarias de las proteínas presentes en *S. lividans* TK24 a las distintas

condiciones de cultivo. La tabla 1 nos indica que las células provenientes del medio UP_{MgSO_4} , cambian drásticamente la configuración de sus proteínas respecto al control positivo, en donde, las estructuras hélice α disminuyen un 42 %, aumentando la cantidad de estructuras hoja β , y presentando estructuras giro β ausentes en las células provenientes del medio UP. Respecto a las células a las cuales se les aplicó el estrés eléctrico, podemos decir que no sufrieron cambios significativos en cuanto a la configuración de la estructura secundaria de sus proteínas al compararse con el control positivo, las células provenientes de los cultivos en medio UP_{MgSO_4} . Estos cambios en la estructura secundaria de las proteínas ocasionados por el estrés químico podrían estar sugiriendo cambios involucrados con las estructuras de las proteínas transmembrana, las cuales, a su vez, forman canales que regulan de manera selectiva la entrada y salida de componentes extra e intracelulares respectivamente, como pueden ser nutrientes, compuestos iónicos, productos metabólicos, desechos celulares entre otros. Sin embargo, dicha hipótesis requiere de un análisis de espectroscopia infrarroja específica a la membrana plasmática de la célula en conjunto con otros estudios de carácter proteómico que puedan confirmarla.

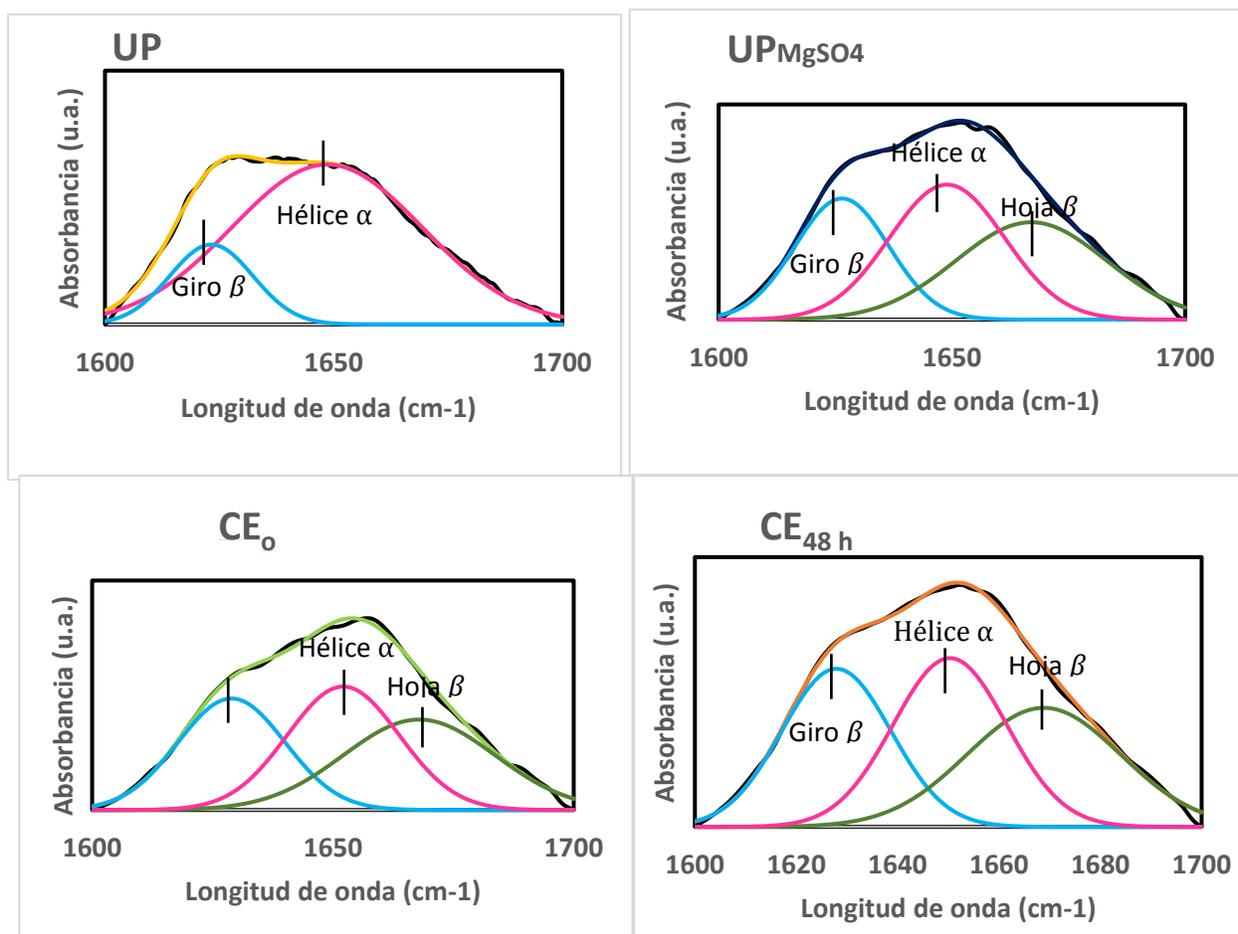


Figura 17. Deconvoluciones de los espectros infrarrojos en la región de amida I para cada uno de los tratamientos.

Tabla 1. Distribución de la estructura secundaria de las proteínas presentes en *S. lividans* TK24 a las distintas condiciones de cultivo.

Condición de cultivo de la cual proviene <i>S. lividans</i> TK24	Hoja β (%)	Hélice α (%)	Giro β (%)
UP	18.10 \pm 0.83 ^c	81.89 \pm 0.92 ^a	00.0 \pm 0.00 ^c
UP_{MgSO4}	27.44 \pm 0.87 ^{a,b}	37.67 \pm 0.82 ^b	34.87 \pm 0.88 ^a
CE₀	30.36 \pm 0.91 ^a	34.32 \pm 0.93 ^c	35.31 \pm 0.92 ^a
CE_{48h}	31.62 \pm 0.96 ^a	35.26 \pm 0.93 ^c	33.11 \pm 0.87 ^b

*Valores medios \pm desviación estándar de tres replicas. Las medias en las columnas que no comparten la misma letra son significativamente diferentes (p<0.05).

5.9. Potencial zeta

Con el fin de evaluar los cambios en la carga superficial de *S. lividans* TK24 derivados de la presencia del sulfato de magnesio en los medios de cultivo, o bien, derivados de la aplicación del campo eléctrico, se midió el potencial zeta de las células provenientes de cada una de las condiciones de cultivo tratadas a las 58 h (después de la última etapa de electroestimulaciones), en un rango de pH de 0.7-8 (figura 18).

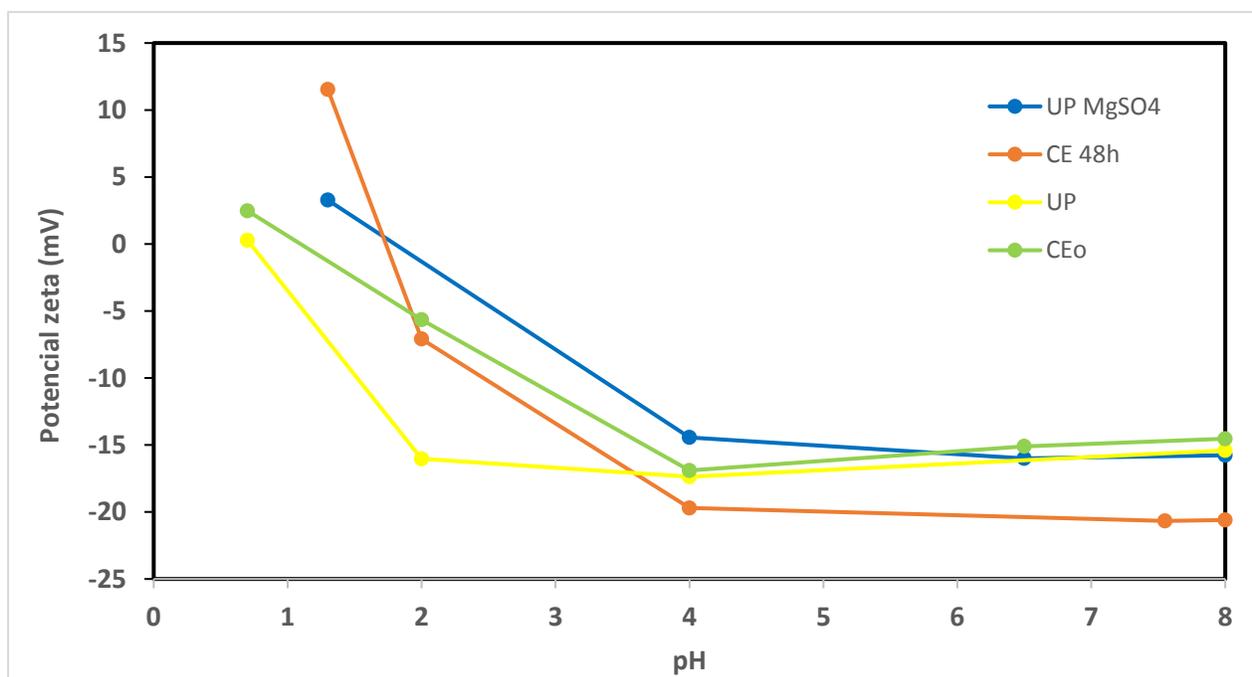


Figura 18. Potencial zeta de *S. lividans* TK24 respecto al pH proveniente de las distintas condiciones de cultivo a las 58 h.

Como se puede observar en la figura 18, la biomasa proveniente de todas las condiciones de cultivo presenta una carga eléctrica negativa superficial en el rango de pH al cual fueron abordados los cultivos ($\approx 7 - 8$), sin embargo, las células de los cultivos CE_{48h} presentan una superficie más negativa, es decir, el estímulo eléctrico aplicado en la etapa de mantenimiento redistribuyó el exceso de carga superficial.

Por su parte, podemos observar que a valores de pH intermedios (≈ 4), la presencia de Mg^{2+} hace más positiva la carga superficial de la célula, al comparar la biomasa proveniente de los cultivos en UP_{MgSO_4} con la de los cultivos en medio UP. De igual forma, se observa como el estímulo eléctrico hace más negativa la carga superficial en dicho valor intermedio de pH, siendo los cultivos CE_{48h} los que vuelven a presentar la carga eléctrica más negativa.

El punto isoeléctrico de las células provenientes de todas las condiciones de cultivo se alcanza a valores de pH ácidos (0.7-2), en donde las células provenientes de los cultivos en medio UP presentan valores de pH más ácidos (0.7) del punto isoeléctrico. Cabe señalar que,

a condiciones de pH ácidas, las células electroestimuladas en la fase de mantenimiento presentan valores de carga superficial considerablemente más positivos, lo cual contrasta con los resultados observados a condiciones de pH intermedias y básicas.

Estos resultados pueden sugerir que el Mg^{2+} (en pH 's intermedios), y el campo eléctrico aplicado en la fase de mantenimiento (en todo el rango de pH) redistribuye el exceso de carga negativa neta de la pared celular (haciéndola más negativa, o positiva en valores ácidos), en donde las moléculas que conforman la envoltura celular externa que contribuyen a la electronegatividad neta son estructuras dispares. En bacterias Gram positivas, la pared celular de peptidoglicano influye en la electronegatividad de la superficie en virtud de los grupos fosforilo ubicados en los residuos de ácido teicoico y teicurónico sustituyentes, así como los grupos carboxilato no sustituidos [37]. Aunque no se conocen los mecanismos por los cuales tanto el estímulo químico como el eléctrico están influyendo en la carga superficial de las células, queda claro que se están presentando cambios importantes en la composición química de la superficie celular, los cuales, se pueden atribuir a una protonación y/o deprotonación de los grupos funcionales que la conforman.

6. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Los estudios relacionados con la electroestimulación en procesos biológicos se han enfocado mayoritariamente en el tratamiento biológico de aguas residuales, tratamiento de suelos, desnitrificación biológica, entre otros procesos referentes a la biorremediación. Estos estudios han demostrado que la aplicación de un campo eléctrico produce cambios fisiológicos, motrices, morfológicos y estructurales en los microorganismos utilizados. De igual forma, se ha demostrado que dichos cambios se asocian con el incremento en la producción y liberación de los metabolitos intracelulares producidos por el microorganismo en cuestión, en donde, muchos de dichos metabolitos tienen un carácter de alto valor agregado [38]. Centrándonos en la obtención de moléculas bioactivas a partir de cultivos bacterianos, la implementación de un campo eléctrico en el mejoramiento de la obtención y/o producción de dichas moléculas aún no se ha implementado de manera focalizada ni estandarizada. De igual forma, la comprensión a nivel fisiológico de los efectos de la aplicación de un campo eléctrico sobre cultivos microbianos es un tema en desarrollo.

Victor-Sánchez y col. (2020) han trabajado en el mejoramiento de procesos biotecnológicos enfocados en la ingeniería ambiental mediante la aplicación de campos eléctricos, en donde han presentado una metodología estandarizada en sus resultados. Establecieron que la aplicación del campo eléctrico de baja intensidad sobre biomasa fúngica cultivada en medio poroso resultó favorable sólo cuando el medio actuaba como una resistencia eléctrica. Cuando se aplica un campo eléctrico de baja intensidad en un medio de cultivo que presenta un comportamiento óhmico se evitan reacciones secundarias, permitiendo únicamente las reacciones de electrólisis del agua, de esta manera, la composición y propiedades del medio no se modifican. De esta forma, el campo eléctrico actúa como un factor de estrés abiótico que modifica las respuestas bioquímicas (como cambios en la producción de biomasa, mejora en la absorción de nutrientes, mayor obtención de los productos metabólicos de interés), las cuales estarían asociadas únicamente con la magnitud del campo eléctrico aplicado [6].

Por otro lado, en el laboratorio de investigación de Ingeniería Genética y Metabolismo Secundario de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa, Calderón-de la Sancha y col. (2017) han trabajado con *S. lividans* TK24. Previo a dicho trabajo, *S. lividans* TK24 como cepa parental, no tenía reportes de producción de proteínas bioactivas. Sin embargo, lograron encontrar que, únicamente en medio UP (el cual contiene glicerol como fuente de carbono y energía, y bacto triptona como fuente de nitrógeno), *S. lividans* TK24 presentaba actividad antimicrobiana. Hasta el momento, se sabe que la actividad antimicrobiana presentada contra *B. subtilis* es debida a una proteína bioactiva desconocida, no obstante, aún se sigue trabajando en su aislamiento y caracterización [31].

Dicho lo anterior, en el presente trabajo, se planteó utilizar a *S. lividans* TK24 con el fin de estudiar las respuestas fisiológicas que la aplicación de un campo eléctrico de baja intensidad puede tener sobre dicho microorganismo, de manera tal, que se pueda abordar su aplicación como una vía de intensificación en los procesos de producción y/u obtención de sus

moléculas bioactivas. Para poder abordar el estudio de dichas respuestas fisiológica, debido a que el medio UP mencionado previamente no permite el paso de la corriente eléctrica, primero fue necesario diseñar un medio de cultivo que permitiese el crecimiento y la producción de la actividad antimicrobiana del microorganismo, y que al mismo tiempo permitiese el transporte de carga eléctrica.

Para el diseño del nuevo medio de cultivo, se planteó que este debería de cumplir con los componentes nutrimentales y energéticos que el medio de producción UP proporciona a *S. lividans* TK24, los cuales provocan la producción y secreción de la proteína bioactiva. Por tal motivo, el nuevo medio de cultivo debía contener los mismos componentes que el medio UP. Para propiciar el transporte de carga eléctrica, se propuso el uso de dos sales, las cuales son elementos del medio de cultivo Phage utilizado en este trabajo, y a su vez, son sales que propician el crecimiento y buen funcionamiento del microorganismo. Como se ha mencionado, el medio Phage es el medio que se utiliza en la etapa de reactivación y adaptación de *S. lividans* TK24 (sección 4.3.3.) por tal motivo se infirió que la implementación de las sales, o de alguna de las sales, que conforman dicho medio, podría ser beneficioso o al menos no interferirían con la viabilidad del microorganismo. Los medios de prueba fueron los siguientes: UP_{MgSO_4} (contiene medio UP y 0.5 g de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$), UP_{CaCl_2} (contiene medio UP y 0.74 g de $CaCl_2 \cdot 2H_2O$) y $UP_{MgSO_4 \text{ y } CaCl_2}$ (contiene medio UP, 0.5 g de $MgSO_4$ y 0.74 g de $CaCl_2 \cdot 2H_2O$). Los tres medios permitieron la transferencia de carga de manera adecuada y promovieron el crecimiento de *S. lividans* TK24, sin embargo, el único medio que presentó actividad inhibitoria contra *B. subtilis* fue el medio UP_{MgSO_4} (figura 8), de esta forma, fue el medio seleccionado para llevar a cabo las electroestimulaciones.

Una vez establecido el medio de cultivo en el cual se realizarían las electroestimulaciones, se evaluó el crecimiento y la actividad antimicrobiana respecto al tiempo de *S. lividans* TK24 en medio UP_{MgSO_4} , con el fin de tener un primer acercamiento de la respuesta del microorganismo al nuevo medio de cultivo implementado, y de igual forma, con el fin de establecer los tiempos de cultivo a los cuales se efectuarían las electroestimulaciones. Con el propósito de inferir en: (I) el metabolismo asociado al crecimiento del microorganismo, y (2) el metabolismo asociado al mantenimiento del microorganismo, así como en la producción de los bioproductos asociados a cada etapa, se plantearon dos tiempo de cultivo para la implementación de las electroestimulaciones (abordadas en cultivos por separado): (I) Electroestimulación al inicio del cultivo (CE_0), en la fase de crecimiento sin actividad inhibitoria, y (II) Electroestimulación a las 48 h del cultivo ($CE_{48 h}$) en la fase estacionaria o de mantenimiento, en la cual se tiene la mayor actividad inhibitoria.

Por su parte, para establecer el voltaje con el cual se trabajaría en ambas etapas de electroestimulaciones, se evaluó el comportamiento del voltaje frente a la corriente eléctrica del medio UP_{MgSO_4} , en un rango de 5 a 30 V (considerado como un campo eléctrico de baja intensidad). Se observó que, en dicho rango, el medio de cultivo presenta un comportamiento óhmico (el cual descarta reacciones ajenas a las de la electrólisis del agua [6]), por tanto, se decidió trabajar a un valor intermedio de 15 V. De igual forma, la selección de los materiales de los electrodos fue hecha con el propósito de no propiciar la presencia de reacciones ajenas a la de la electrólisis del agua, por tal motivo se optó por trabajar con electrodos recubiertos

de óxido de rutenio y titanio. Por otro lado, derivado de experiencias empíricas por parte de Sánchez y col. (2017), se optó por implementar el campo eléctrico durante 10 h consecutivas, con el fin de que el estrés eléctrico no interfiera con la viabilidad del microorganismo.

En el presente trabajo los resultados obtenidos nos hablan acerca de las respuestas fisiológicas que *S. lividans* TK24 presentó ante el estrés químico, derivado de los iones Mg^{2+} provenientes del sulfato de magnesio en el medio UP, y ante el estrés eléctrico, derivado del campo eléctrico aplicado en las dos etapas de electroestimulación abordadas.

Los resultados obtenidos respecto al crecimiento (figura 11), indican que la presencia del sulfato de magnesio limitó el crecimiento del microorganismo, al compararlo con el control positivo, el medio UP, esto nos dice que el estrés químico resultó inferir de manera significativa en el metabolismo asociado al crecimiento. Por su parte, el estrés eléctrico implementado a *S. lividans* TK24 no aumentó ni limitó su crecimiento, incluso, no cambio los tiempos de sus fases metabólicas (crecimiento y mantenimiento), de tal manera que se comprobó que las electroestimulaciones, ya sea CE_o o $CE_{48 h}$, no afectan a la viabilidad del *S. lividans* TK24, lo cual es bastante alentador en la exploración de la aplicación de estímulos eléctricos sobre *S. lividans* TK24, ya que, muchos trabajos han reportado que el campo eléctrico ha llegado a limitar el crecimiento o incluso ha provocado la muerte de los microorganismos con los cuales han tratado [39].

Por su parte, los resultados obtenidos respecto al crecimiento del microorganismo estuvieron acompañados con interesantes cambios de pigmentación en los medios de cultivo. *S. lividans* TK24 en medio de cultivo UP pigmenta su medio hasta las 48 h de un color morado, sin embargo, al crecer en medio UP_{MgSO_4} , comenzó a pigmentar su medio desde las 20 h, y dicho pigmento fue de color azul, totalmente diferente al presentado en el medio UP (figura 9). La presencia de este pigmento producido dentro de la fase de crecimiento nos sugiere que posiblemente, los iones Mg^{2+} están estimulando la producción y/o secreción de la actinorrodina, el cual es un antibiótico policétido de color azul, principalmente reportado como un metabolito secundario producido por *S. coelicolor*, pero no por *S. lividans* [32]. Sin embargo, para comprobar la presencia o no de dicho metabolito haría falta realizar otros estudios de identificación de metabolitos, como puede ser la espectrometría de masas. Por su parte, la implementación del estrés eléctrico en la fase de crecimiento del microorganismo inhibió casi en su totalidad la presencia de dicho pigmento. Estos resultados, sugieren que la presencia del campo eléctrico en la fase de crecimiento podría estar relacionado con la inhibición en la producción y/o secreción del metabolito pigmentado.

La evaluación de la respuesta en la actividad antimicrobiana fue uno de los resultados más esperados en la definición de los efectos fisiológicos que el campo eléctrico pudiese causar sobre *S. lividans* TK24, debido a que ya se había comprobado que la presencia del Mg^{2+} permitía la actividad antimicrobiana. En primer lugar, como se muestra en la figura 12, el efecto del estrés químico en el medio de cultivo sobre la actividad antimicrobiana de *S. lividans* TK24 fue favorable, ya que, esta se presenta desde las 20 h del cultivo, en contraste con el control positivo, en el cual se presenta actividad inhibitoria hasta las 48 h. También se observa un incremento en dicha actividad, el cual se mantiene hasta las 96h respecto a los

cultivos en medio UP. Por su parte las electroestimulaciones aplicadas al inicio del cultivo inhibieron la presencia de actividad antimicrobiana, por el contrario, las electroestimulaciones aplicadas en la etapa estacionaria o de mantenimiento (a las 48 h), permitieron la conservación de la actividad presente en el medio UP_{MgSO_4} , en donde incluso, esta se observa ligeramente favorecida. Dichos resultados sugieren que el aplicar el estrés eléctrico en la fase de crecimiento inhibe la producción o secreción de los productos metabólicos antimicrobianos de *S. lividans* TK24 producidos en el medio UP_{MgSO_4} .

Los resultados discutidos en los párrafos anteriores podrían estarnos sugiriendo que la presencia del estrés químico proveniente del Mg^{2+} pudiese estar promoviendo en *S. lividans* TK24 un metabolismo oxidativo, debido a que; se tiene una disminución en la tasa de crecimiento del microorganismo, y a su vez, se presenta una mayor actividad antimicrobiana, en conjunto con la producción o secreción de algún nuevo metabolito pigmentado, el cual se sugiere que podría ser la actinorrodina. Estas características contrastan con el metabolismo glucolítico que se presenta en *S. lividans* TK24, el cual mantiene un alto crecimiento y producción lipídica, pero presenta una limitada expresión de compuestos antimicrobianos [29]. Además, como se ha discutido, el magnesio tiene una importante inferencia en diversos procesos intracelulares, los cuales influyen en la conformación de los ácidos nucleicos, estabilidad de los ribosomas, en la síntesis de proteínas, en la integridad estructural de las membranas celulares, y como activador de más de 300 enzimas diferentes, participa en muchos procesos del metabolismo [19]. De esta forma, se podría pensar que el magnesio pudiese estar relacionado en la expresión de genes y/o proteínas que propicien cambios en los flujos metabólicos relacionados con la producción de moléculas con actividad antimicrobiana. Por otro lado, en lo que respecta al estrés eléctrico aplicado en la etapa de crecimiento del microorganismo, resulta interesante la similitud de la inhibición tanto del pigmento como de la actividad antimicrobiana en dicha etapa del crecimiento. Estos resultados apuntan a una importante inferencia del campo eléctrico sobre el metabolismo primario.

Una vez que se confirmó que *S. lividans* TK24 había presentado, e incluso mejorado, su actividad inhibitoria bajo las condiciones de estrés químico derivado de la presencia del sulfato de magnesio en el medio, y que el estrés eléctrico aplicado en la etapa de mantenimiento había permitido la presencia de dicha actividad antimicrobiana, era evidente el cuestionarse si la actividad pudiese adjudicarse a la misma proteína bioactiva reportada en el medio UP. Aunque los objetivos y el tiempo de investigación de este trabajo no permitían llevar a cabo un aislamiento y caracterización de la molécula bioactiva que estaba provocando dicha actividad inhibitoria, se planteó definir si la molécula era un metabolito o bien, una proteína bioactiva. De esta forma, se realizó un fraccionamiento por tamaño molecular de los sobrenadantes obtenidos a las 70 h provenientes de cada medio de cultivo libres de biomasa, mediante ultrafiltración en tubos Amicon® de 3 KDa. Con cada fracción obtenida se realizaron bioensayos por el método de difusión en pozos utilizando a *B. subtilis* como microorganismo testigo y a los sobrenadantes en medio UP como controles positivos. Los resultados mostrados en la figura 13 indicaron que la actividad antimicrobiana se encontraba mayoritariamente en las fracciones $>3KDa$, tanto para los cultivos en medio

UP_{MgSO₄} con y sin estímulo eléctrico, así como para los cultivos en medio UP, lo cual asocia a la actividad inhibitoria con la presencia de alguna proteína bioactiva y no con algún metabolito. Estos resultados podrían sugerir que se trata de la misma proteína bioactiva de reportada por Calderón de la Sancha (2017), sin embargo, como se ha mencionado, se requiere de un trabajo más profundo en el aislamiento y caracterización de dicha proteína bioactiva, lo cual abre la puerta a una nueva línea de investigación. Por último, cabe señalar que la presencia de ligeros halos de inhibición observados en las fracciones <3KDa, sugieren que podría estarse produciendo en menor medida un metabolito con actividad antimicrobiana, o bien, dicho metabolito podría presentar una débil fuerza de inhibición.

Al comprobar que la actividad inhibitoria en el medio de cultivo UP_{MgSO₄}, y en la etapa de electroestimulación CE_{48h} está asociada con una proteína bioactiva, el siguiente paso fue cuantificar la concentración de proteínas en medio extracelular (figura 14). Como se puede observar, el estrés químico tuvo un mayor impacto respecto al estrés eléctrico, mostrándose una disminución significativa en la concentración de proteínas en el medio UP_{MgSO₄} sin estímulo eléctrico (respecto al medio UP). Aunque el estrés eléctrico no parece tener una gran influencia en estos resultados, la aplicación del campo eléctrico parece disminuir la concentración de proteínas en cada una de las etapas en las cuales fue aplicado, sin embargo, los efectos de las electroestimulaciones aplicadas en la fase del metabolismo asociado al crecimiento no se prolongan hasta la fase del metabolismo asociado al mantenimiento, ya que dicha concentración logra emparejarse con las concentraciones de los cultivos en medio UP_{MgSO₄} después de las 48 h.

Por otro lado, al evaluar la actividad antimicrobiana específica de las proteínas extracelulares presentes en cada condición de cultivo, se observaron resultados interesantes. Para ello, se comparó para cada condición de cultivo la actividad antimicrobiana (longitud de halo de inhibición) con la concentración de proteínas extracelulares. En la figura 15 podemos observar como la actividad específica es mayor para los cultivos en medio UP_{MgSO₄} respecto a los cultivos en medio UP. Respecto a los cultivos a los cuales se les aplicó la electroestimulación en la etapa de mantenimiento, podemos observar que pasadas las 10 h del estímulo eléctrico (a las 58 h) dicha actividad específica es mayor que la de los cultivos en medio UP_{MgSO₄} sin estímulo eléctrico. De manera lógica, los cultivos a los cuales se les aplicó el estrés eléctrico en la fase de crecimiento no presentan actividad antimicrobiana específica, debido a que no presentaron actividad inhibitoria. Estos resultados nos indican que las proteínas y péptidos producidos y secretados al medio extracelular tienen un mayor rendimiento antimicrobiano en los cultivos a los cuales se les aplicó el estrés eléctrico en la etapa de mantenimiento, y no sólo ello, dicha actividad se mantiene constante hasta las 96 h, a diferencia de los cultivos a los cuales sólo se les sometió a al estrés químico, ya que la actividad específica decae pasadas las 48 h. Lo anterior sugiere que además de un mayor rendimiento, el campo eléctrico está brindando estabilidad a la actividad antimicrobiana presente en el medio UP_{MgSO₄}, o bien, estabiliza a dicha proteína bioactiva presente en el medio extracelular.

Todos los resultados en conjunto apuntan a que, tanto el Mg²⁺ como el campo eléctrico podrían estar infiriendo sobre *S. lividans* TK24 a nivel metabólico, estructural y/o superficial,

o bien, a nivel proteómico o genómico. La comprensión de los cambios ocurridos a nivel metabólico, proteómico y genómico queda fuera de los alcances de este trabajo, dejando lugar al establecimiento de hipótesis y a una atractiva línea de investigación por seguir. Sin embargo, el conocimiento de los cambios estructurales y superficiales derivados de las condiciones de estrés aplicadas al microorganismo pudieron ser estudiadas en mayor medida. Para ello se hizo uso de la espectroscopia infrarroja y de la medición del Potencial zeta.

El espectro de absorción infrarrojo (IR) de un microorganismo es considerado como una huella dactilar. Este es el resultado de la absorción de los modos vibracionales de las moléculas que componen la célula (proteínas, lípidos, hidratos de carbono, componentes de membrana y pared celular). De esta forma el espectro infrarrojo de un microorganismo depende de su estado fisiológico y estructural [36]. Los resultados de los espectros infrarrojos obtenidos de la biomasa libre de sobrenadante a las 58 h de cultivo (después de la última etapa de electroestimulación), para cada uno de los tratamientos se muestran en la figura 16. Estos espectros nos sugieren que el contenido de lípidos, carbohidratos, grupos fosfato y moléculas nitrogenadas (como aminas, amidas, péptidos y proteínas) constituyentes de la pared y membrana celular principalmente, está en función del estrés al cual es sometido *S. lividans* TK24, en donde las células a las cuales se les sometió al estímulo eléctrico en la fase de crecimiento, presentan un mayor contenido de dichos componentes, siguiendo después las células electroestimuladas en la fase de mantenimiento, y en menor medida las células en medio UP_{MgSO_4} sin estímulo eléctrico. En lo que respecta a la ventana referente a carbohidratos y grupos fosfato, no sólo se presenta el mismo comportamiento descrito en las líneas anteriores para cada condición de cultivo, además, para los cultivos CE_o se observan diferencias en la forma de las señales respecto a los otros espectros, al presentar un mayor número de hombros. Lo anterior podría sugerir cambios estructurales en la pared y membrana celular, posiblemente en el peptidoglucano constituyente de la pared celular y en los grupos fosfato.

Los resultados mostrados referentes a los espectros infrarrojos podrían explicarse como una respuesta metabólica del microorganismo, en donde se estaría propiciando, derivado del estrés eléctrico, una alta actividad anabólica y un metabolismo principalmente glucolítico, el cual estuviese enfocado en sintetizar gruesas capas de recubrimiento en la pared y en la membrana celular, conformando una barrera de protección en respuesta al estrés. Este metabolismo glucolítico inducido por las condiciones de estrés eléctricas es consistente con la nula actividad antimicrobiana presentada por *S. lividans* TK24 y con un alto contenido lipídico, en donde, a diferencia de los resultados presentados en la concentración de proteínas y péptidos extracelulares, la actividad antimicrobiana no pudo recuperarse en la fase estacionaria o de mantenimiento.

Derivado de los espectros infrarrojos obtenidos, se realizaron las deconvoluciones de los espectros infrarrojos en la región de la Amida I, en donde se observaron cambios en las estructuras secundarias de las proteínas presentes en *S. lividans* TK24 a las distintas condiciones de cultivo (figura 17 y tabla 1). Los cambios mostrados en la estructura secundaria de las proteínas ocasionados principalmente por el estrés químico podrían estarnos sugiriendo cambios involucrados con las estructuras de las proteínas

transmembrana, las cuales, a su vez, forman canales que regulan de manera selectiva la entrada y salida de componentes extra e intracelulares respectivamente, como pueden ser nutrientes, compuestos iónicos, productos metabólicos, desechos celulares entre otros. Sin embargo, dichas hipótesis requieren de un análisis de espectroscopia infrarroja específica a la membrana plasmática de la célula en conjunto con otros estudios de carácter proteómico que puedan confirmarlas.

Por su parte, con el fin de detectar cambios en la carga superficial celular se realizaron mediciones del potencial zeta de la biomasa obtenida libre de sobrenadante. Como se puede observar en la figura 18, la biomasa proveniente de todas las condiciones de cultivo presenta una carga eléctrica negativa a valores de pH fisiológicos, sin embargo, las células de los cultivos CE_{48h} presentan una superficie más negativa.

Por su parte, podemos observar que a valores de pH intermedios (≈ 4), la presencia de Mg^{2+} hace más positiva la carga superficial de la célula, al comparar la biomasa proveniente de los cultivos en UP_{MgSO_4} con la de los cultivos en medio UP. De igual forma, se observa como el estímulo eléctrico hace más negativa la carga superficial en dicho valor intermedio de pH. El punto isoelectrico de las células provenientes de todas las condiciones de cultivo se alcanza a valores de pH ácidos (0.7-2), en donde las células provenientes de los cultivos en medio UP presentan valores de pH más ácidos (0.7) del punto isoelectrico. Cabe señalar que, a condiciones de pH ácidas, las células electroestimuladas en la fase de mantenimiento presentan valores de carga superficial considerablemente más positivos, lo cual contrasta con los resultados observados a condiciones de pH intermedias y básicas.

Estos resultados pueden sugerir que el Mg^{2+} (en pH 's intermedios), y el campo eléctrico aplicado en la fase de mantenimiento (en todo el rango de pH) redistribuye el exceso de carga negativa neta de la pared celular (haciéndola más negativa, o positiva en valores ácidos). En bacterias Gram positivas, la pared celular de peptidoglicano influye en la electronegatividad de la superficie en virtud de los grupos fosforilo ubicados en los residuos de ácido teicoico y teicurónico sustituyentes, así como los grupos carboxilato no sustituidos [37]. Aunque no se conocen los mecanismos por los cuales tanto el estímulo químico como el eléctrico están influyendo en la carga superficial de las células, queda claro que se están presentando cambios importantes en la composición química de la superficie celular, los cuales, se pueden atribuir a una protonación y/o deprotonación de los grupos funcionales que la conforman.

Para concluir, los párrafos anteriores describen un compendio de grandes e importantes cambios fisiológicos presentados en *S. lividans* TK24 asociados a la producción de compuestos antimicrobianos. Estos cambios se presentaron en respuesta al estrés químico propiciado por la presencia de Mg^{2+} , así como en respuesta al estrés eléctrico aplicado tanto en la etapa de crecimiento como en la etapa de mantenimiento metabólico. Por su parte, la presencia del magnesio pareció tener una gran influencia en el metabolismo de *S. lividans* TK24, ya que, los resultados parecen indicar que el Mg^{2+} , promueve un metabolismo oxidativo en *S. lividans* TK24, impulsando la síntesis de una proteína con actividad antimicrobiana y posiblemente la síntesis de un policétido con actividad antimicrobiana. Aunado a lo anterior, también se detectaron posibles cambios en las estructuras secundarias

de las proteínas que forman parte de la pared celular del microorganismo. Estos últimos podrían estar jugando a favor de la secreción de moléculas bioactivas, con actividad antimicrobiana, y de igual forma, podrían derivarse a la misma reorientación metabólica señalada. De esta forma, resulta bastante atractivo el seguir ahondando sobre los efectos del magnesio en *S. lividans* TK24, en donde, para poder lograr una completa y satisfactoria comprensión, dichos efectos podrían ser tratados desde niveles de expresión de genes y/o proteínas que infieren en el metabolismo y la estructura del microorganismo, dejando una amplia ventana de investigación.

Por su parte, las respuestas fisiológicas sobre *S. lividans* TK24 derivadas del estrés eléctrico, forman parte de una línea de investigación que trata de encontrar y explicar los efectos que un campo eléctrico puede generar sobre un microorganismo, y sobre la producción de sus compuestos bioactivos. En este trabajo podría decirse que los cambios observados, no estuvieron involucrados con la presencia de reacciones ajenas a la electrólisis del agua, la cual genera como productos finales H_2 y O_2 , los cuales, al estar presentes en un sistema en agitación (como el presentado en este trabajo) vuelven a formar agua, de esta forma, el estímulo eléctrico no infirió con la composición del medio, quedando descartados resultados derivados de compuestos ajenos a los del medio de cultivo. Al establecer que las electroestimulaciones fueron aplicadas en un sistema en agitación, tampoco se puede hablar de cambios generados por la presencia de gradientes de temperatura, de concentración de nutrientes y pH, es decir, se operó bajo un régimen de control cinético. De igual forma, la producción de oxígeno propiciada por la electrólisis del agua estuvo presente bajo condiciones de saturación de oxígeno en las células, debido al sistema experimental empleado en este trabajo, por tal motivo, el oxígeno no representa un factor preponderante en los fenómenos observados en el presente estudio.

De esta forma, los efectos del campo eléctrico encontrados están relacionados con el cambio que este ejerce sobre el potencial eléctrico de las sustancias intra y extracelulares derivado del flujo de electrones. A su vez, dichos cambios pueden estar modificando procesos en la célula a nivel genómico, proteómico, metabólico, estructural y superficial. Se infirió que el estímulo eléctrico aplicado en la fase de crecimiento promueve la actividad anabólica y el metabolismo glucolítico de *S. lividans* TK24, lo cual, inhibe la producción de compuestos con actividad antimicrobiana y promueve la formación de gruesas capas de recubrimiento lipídico en la membrana celular, y un cambio en la composición de los fosfolípidos de esta y del peptidoglucano en la pared celular.

Por su parte, el campo eléctrico aplicado en la fase de mantenimiento jugó un papel sumamente diferente, al permitir y promover la actividad antimicrobiana del microorganismo presente en el medio UP_{MgSO_4} , y aún más, al estabilizarla. Por tanto, la estabilidad antimicrobiana conferida por el estrés eléctrico podría estar asociada a una estabilidad promovida hacia la proteína con actividad inhibitoria, esto le estaría confiriendo al estrés eléctrico no sólo respuestas a nivel fisiológico del microorganismo, si no también, el estrés eléctrico estaría infiriendo sobre sus productos metabólicos, dándoles un mayor valor agregado. De esta forma, el estrés eléctrico aplicado en las diferentes etapas del metabolismo

de *S. lividans* TK24, y en general, de cualquier microorganismo, es una nueva perspectiva de investigación que queda abierta con grandes desafíos y oportunidades.

7. CONCLUSIONES

- El medio de cultivo UP_{MgSO_4} resultó adecuado para la conducción de carga eléctrica, así como para el crecimiento de *S. lividans* TK24, mejorando su capacidad de producción de actividad antimicrobiana.
- La presencia del sulfato de magnesio disminuyó la producción de biomasa, al compararlo con el control positivo, el medio UP.
- *S. lividans* TK24 al crecer en medio UP_{MgSO_4} , cambió la pigmentación de su medio desde las 20 h, y dicho pigmento fue de color azul.
- El estímulo químico, derivado de la presencia de Mg^{2+} en el medio de cultivo UP_{MgSO_4} , disminuyó la concentración de proteínas extracelulares, mientras que el estrés eléctrico no provocó cambios significativos.
- El campo eléctrico implementado a *S. lividans* TK24 en el medio de cultivo UP_{MgSO_4} no afectó su crecimiento.
- La aplicación del campo eléctrico en la fase de crecimiento de *S. lividans* TK24 no permitió la producción de la actividad antimicrobiana, pero aumentó la síntesis de lípidos y carbohidratos y moléculas nitrogenadas en la biomasa.
- La aplicación del campo eléctrico a las 48 h de cultivo, al concluir la producción de biomasa, permitió mantener la actividad antimicrobiana producida.
- La presencia de Mg^{2+} modificó la proporción de estructuras secundarias de las proteínas de la biomasa de *S. lividans* TK24.
- Tanto el Mg^{2+} como el campo eléctrico provocaron cambios en el exceso de cargas superficiales de las células, ampliando el gradiente de potencial zeta con respecto al pH.

8. PERSPECTIVAS

El trabajo abordado en la presente tesis de maestría deja una amplia gama de investigación a futuro en diversas áreas y enfoques de estudio, quedando claro que, la búsqueda en la intensificación de procesos focalizados a la obtención de moléculas bioactivas, provenientes de microorganismos, mediante la implementación de campos eléctricos, es un trabajo que involucra varias disciplinas. Es evidente la necesidad de conocer los mecanismos y respuestas de producción a nivel celular, para poder abordar, describir y predecir con mayor precisión los mecanismos referentes a escala industrial. Algunos de las perspectivas de trabajo que quedan por atender son las siguientes:

- Aislamiento y caracterización funcional de la molécula bioactiva con actividad antimicrobiana presente en el medio UP_{MgSO_4} .
- Identificación y caracterización de los pigmentos mediante estudios metabolómicos.
- Estudios genómicos, proteómicos y metabolómicos de *S. lividans* TK24 bajo la influencia del Mg^{2+} y el campo eléctrico que ayuden a esclarecer los fenómenos implicados a escala celular, que permitan establecer las bases para un estudio enfocado a la ingeniería de reacciones.
- Determinar las modificaciones a nivel de la membrana plasmática, que permitan inferir sobre los mecanismos de transporte de nutrientes y exportación o secreción de productos metabólicos.
- Implementación del campo eléctrico en la etapa de readaptación del microorganismo, a fin de evaluar la correlación que pudiera tener un medio de cultivo diseñado para producción de biomasa y el campo eléctrico.
- Evaluación de nuevas condiciones de tiempo, voltaje, corriente y período de aplicación del campo eléctrico.
- Diseño de una nueva configuración del reactor en donde se lleve a cabo el bioproceso, en el cual, el campo eléctrico mejore la producción de las moléculas con actividad antimicrobiana de *S. lividans* TK24.

BIBLIOGRAFÍA

- [1] R.-L. Catalina, «Los bioprocesos en la biotecnología: uso de biorreactores para la producción y el escalamiento comercial,» *Tecnología en marcha*, vol. 32, pp. 41-46, 2019.
- [2] H. D. J. D. S. y P. W. B. Vignesh Sundaresan, «Electrochemical and spectroelectrochemical characterization of bacteria and bacterial systems,» *Royal Society of Chemistry*, nº 147, pp. 22-34, 2022.
- [3] H. W. Y. G. K. Z. D. V. X.-Q. F. Huanxin Zhang, «Mechanical-electrochemical coupling theory of bacterial cells,» *International Journal of Solids and Structures*, vol. 252, 2022.
- [4] «S. J. Pirt,» *J. Chem. Tech. Biotechnol*, vol. 33, pp. 137-138, 1983.
- [5] C. Rosales-López, «Los bioprocesos en la biotecnología: uso de biorreactores para la producción y el escalamiento comercial,» *Tecnología en marcha*, vol. 32, pp. 41-46, 2019.
- [6] N. V.-A. I. G. V. S.-V. Paulina Gómez-Flores, «Procesos biotecnológicos mejorados con un campo eléctrico: la importancia de la selección,» *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, vol. 19, nº 1, pp. 111-121, 2020.
- [7] A. F. M. L. P. S. S. E. S. Gabriele Beretta, «The effects of electric, magnetic and electromagnetic fields on microorganisms in the perspective of bioremediation,» *Rev Environ Sci Biotechnol*, pp. 29-75, 2019.
- [8] A. E. O. L. A. I. Zeyoudi M., «“Impact of continuous and intermittent supply of electric field on the function and microbial community of wastewater treatment electro-bioreactors”,» *Elsevier*, pp. 271-279, 2015.
- [9] K. S. I. G. M. G.-R. Victor Sánchez-Vázquez, «Fungal biocatalyst activated by an electric field: improved mass transfer and non-specificity for hydrocarbon,» *Hazardous materials*, 2017.
- [10] V. E. L. Y. Z. U. N. G. Podolska, «Effect of Low Intensity Pulsed Electric Fields on the Respiratory Activity and Electrosurface Properties of Bacteria,» *Food Biophysics*, pp. 281-290, 2009.
- [11] S. J. P. G. Zimmermann U, «Transcellular ion flow in Escherichia coli B and electrical sizing of bacterias,» *Biophys J*, pp. 1005-1013, 1973.
- [12] W. H. Z. X. Q. Y. Luo Q, «Effect of direct electric current on the cell surface properties of phenol-degrading bacteria,» *Sppl Environ Microbiol*, pp. 423-427, 2005.
- [13] H. T. Q. W. Y. Y. X. Y. b. L. Ruijuan Fan, «Mechanism of bio-electrokinetic remediation of pyrene contaminated soil: Effects of an electric field on the degradation pathway and microbial metabolic processes,» *Journal of Hazardous Materials*, pp. 1-14, 2022.

- [14] V. J. C. P. R. M. Mena E, «Effect of a direct electric current on the activity of a hydrocarbondegrading microorganism culture used as the flushing liquid in soil remediation processes.,» *Elsevier* , vol. 124, pp. 217-223, 2014.
- [15] S. B. X. X. V. L. M. L. Z. She P, «Electrolytic stimulation of bacteria *Enterobacter dissolvens* by a direct current,» *Biochemical Engineering Journal*, vol. 28, pp. 23-29, 2006.
- [16] H. W. X. Z. Y. Q. Qishi Luo, «Effect of Direct Electric Current on the Cell Surface Properties of Phenol-Degrading Bacteria,» *Applied and Environmental Microbiology*, pp. 423-427, 2005.
- [17] K.-S. G. D. U. Fabricio M. Locatelli, «Effects of trace metal ions on secondary metabolism and the morphological development of streptomycetes,» *Royal society of chemistry*, vol. 8, pp. 469-480, 2015.
- [18] G. M. Walker, «The Roles of Magnesium in Biotechnology,» *Critical Reviews in Biotechnology*, pp. 311-354, 1994.
- [19] J. K. A. H. Kazimierz Pasternak, «BIOCHEMISTRY OF MAGNESIUM,» *Chair and Department of Medical Chemistry*, pp. 601-616, 2010.
- [20] P. Y. Menéndez, *Caracterización mediante Biología de Sistemas de Ciclo de Desarrollo de Streptomyces y sus aplicaciones biotecnológicas.*, Oviedo, 2012.
- [21] J. A. S. K. a. A. E. Mohamed Belal Hamed, «Streptomyces protein secretion and its application in biotechnology,» *FEMS Microbiology Letters*, 2018.
- [22] P. K. K. K. D. Z. U. V. K. G. Khushboo, «Biotechnological and industrial applications of *Streptomyces* metabolites,» *Biofuels, Bioprod. Bioref.*, pp. 1-21, 2021.
- [23] J. e. a. Anné, « Recombinant protein production and streptomycetes.,» *Biotechnol*, pp. 159-167, 2012.
- [24] C. P. F. K. V. C. S. S. K. M. T.-W. L. v. M. T. S. J. A. A. E. Giorgos Sianidis, «Functional large-scale production of a novel *Jonesia* sp. xyloglucanase by heterologous secretion from *Streptomyces lividans*,» *National Center for Biotechnology Information*, pp. 498-507, 2006.
- [25] E. V. G. P. V. W. M. D. R. S. Laura Sevillano, «New approaches to achieve a high level of enzyme production in *Streptomyces lividans*,» *Part of springer Nature*, 2016.
- [26] G. Mangiameli, *Controlling growth and morphogenesis of the industrial enzyme producer*, Universiteit Leiden: Universiteit Leiden, 2014.
- [27] A. A. T. B. S. J. A. W. ., Ó. H. F. G. Ó. H. C. L. D. B. K. B. J. A. A. E. J. K. Christian Rückert, «Complete genome sequence of *Streptomyces lividans* TK24,» *Elsevier*, pp. 21-22, 2015.

- [28] J. P. Curiel, «Direccionamiento del metabolismo primario a metabolismo secundario para la evaluación de la producción de actinorrodina por medio de la modulación de citrato sintasa y aconitasa en *Streptomyces coelicolor*,» Tepetitlán, Tlaxcala , 2011.
- [29] C. H. M. B.-N. A. A. F. M. J. B. M.-J. V. Aaron Millan-Oropeza, «Quantitative proteomic analysis confirmed oxidative metabolism predominates in *Streptomyces coelicolor* versus glycolytic metabolism in *Streptomyces lividans*,» *Journal of proteome research*, pp. 59-69, 2017.
- [30] C. H. ., L. ., d. &.-J. V. Aarón Millán-Oropeza, «The Expression of genes of the Pho regulon is altered in *Streptomyces coelicolor*,» *Scientific Reports* , pp. 1-21, 2020.
- [31] C. d. I. S. F. Jocely, «Diseño y evaluación de un medio de cultivo tipo industrial para la producción heteróloga de un péptido con actividad antimicrobiana en *Streptomyces lividans*,» Universidad Autónoma Metropolitana, Ciudad de México, 2017.
- [32] C. H. M. B.-N. A. A.-F. F. M. J. B. a. M.-J. V. Aaron Millan-Oropeza, «Quantitative proteomic analysis confirmed oxidative metabolism predominates in *Streptomyces coelicolor* versus glycolytic metabolism in *Streptomyces lividans*,» *Journal of proteome research*, p. 2597–2613, 2017.
- [33] J. M. Murry, Química Orgánica, México: Cengage Learning, 2008.
- [34] A. S. M. M. Y. X. D. I. E. R. R. V. B. R. G. Howbeer Muhamadali, «Rapid, accurate, and comparative differentiation of clinically and industrially relevant microorganisms via multiple vibrational spectroscopic fingerprinting,» *Royal Society of chemistry*, p. 10, 2016.
- [35] D. M. C. E. P. Suren A. Tatulian, «Structural dynamics of the *Streptomyces lividans* K⁺ channel (SKC1): secondary structure characterization from FTIR spectroscopy,» *FEBS Letters*, pp. 205-212, 1998.
- [36] A. J. B. O. Y. Laura Nieto, «Empleo de espectroscopia infrarroja-transformada de Fourier para diferenciar bacterias de importancia clínica,» *ResearchGate*, pp. 289-295, 2004.
- [37] K. S. B. D. H. B. W. M. S. D. A. S. Michael T. Madigan, Brock Biology of microorganisms, Pearson, 2021.
- [38] E. A. L. Y. O. I. A. A. F. Y. S. W. H. Mozah Zeyoudi, «Impact of continuous and intermittent supply of electric field on the function and microbial community of wastewater treatment,» *Elsevier*, pp. 271-279, 2015.
- [39] E. A. L. Y. O. I. A. Mozah Zeyoudi, «Impact of continuous and intermittent supply of electric field on the function and microbial community of wastewater treatment,» *ELSEVIER*, pp. 271-279, 2015.
- [40] S. Comba, «Regulación del metabolismo lipídico en *Streptomyces coelicolor*,» Universidad Nacional de Rosario, Argentina, 2015.

- [41] M. S. Milton R.D., «“Nitrogenase Bioelectrochemistry for Synthesis Applications”,» *Accounts of Chemical Research*, pp. 3351-3360, 2019.
- [42] u. l.-s. p. o. a. n. J. s. x. b. h. s. f. S. Lividans, «Giorgos Sianidisa, Charalambos Pozidisa Fiona Beckerc, Kristof Vranckenb, CarstenSjoeholmc Spyridoula Karamanoua MonikaTakamiya-WikcLievevan MellaertbThomasSchaefercJozefAnnébAnastassiosEconomoc»,» *Elsevier*, pp. 498-507, 2006.
- [43] N. L. M. a. J. R. N. Gilles P. van Wezel, «Applying the Genetics of Secondary Metabolism in Model»,» *Elsevier*, pp. 118-134, 2009.
- [44] J. D. G. N. Š. A. E. a. S. K. Alexandra Tsirigotaki, «Protein export through the bacterial»,» *Nature Reviews*, 2016.
- [45] J. A. Mohamed Belal Hamed, «Streptomyces protein secretion and its application in biotechnology»,» *FEMS Microbiology Letters*, 2018.
- [46] M. E. J. O. V. Wei, «Influence of electric current on bacterial viability in wastewater treatment»,» *Elsevier*, pp. 5058-5062, 2011.
- [47] S. Trasatti, «Electrocatalysis: understanding the success of DSA»,» *Electrochimica Acta* , pp. 2377-2385, 2000.
- [48] Prácticas, «acasti.webs.ull.es»,» 5 6 2021. [En línea]. Available: <https://acasti.webs.ull.es/docencia/practicas/4.pdf>.
- [49] A. G. C. Emilio Fernández Reyes, «Métodos para la cuantificación de proteínas»,» Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Campus Universitario de Rabanales.
- [50] N. G. I. M. D. a. G.-R. M. Velasco-Alvarez, «Enhanced hexadecane degradation and low biomass production by *Aspergillus niger* exposed to an electric current in a model system.,»» *Bioresource Technology*, pp. 1509-1515, 2011.
- [51] Z. L. L. D. S. W. T. Y. Q. J. Zhan G, «Autotrophic nitrogen removal from ammonium at low applied voltage in a single-compartment microbial electrolysis cell»,» *Bioresour Technology*, pp. 271-277, 2012.
- [52] X. Q. C. J. L. X. Z. H. Huang D, «Electrokinetic remediation and its combined technologies for removal of organic pollutants from contaminated soils»,» *International Journal of Electrochemical Science* , p. 4528–4544, 2012.
- [53] P. A. M. M. L. M. Pazos M, «The Impact of electrokinetic treatment on a loamy-sand soil properties»,» *Chemical Engineering Journal*, pp. 231-237, 2012.

A.1. RUTAS CATABOLICAS

Las rutas catabólicas degradan las proteínas, polisacáridos y lípidos para producir principalmente ácidos grasos, glicerol, azúcares simples y aminoácidos. Estas moléculas más simples posteriormente se degradan en el citoplasma en la segunda etapa del catabolismo para producir grupos acetilo unidos por un enlace tioéster a la molécula transportadora coenzima A, lo cual da como resultado el compuesto Acetil coenzima A (acetil CoA), clave en diversas rutas biológicas. En la tercera etapa del catabolismo, *el ciclo del ácido cítrico* (CAC), los grupos acetilo se oxidan para producir CO₂, coenzimas reducidas (NADH y FADH₂) y energía en forma de GTP mediante la secuencia repetitiva y cerrada de ocho reacciones. Los reactivos se regeneran constantemente y fluyen de manera continua, a lo largo del ciclo, el cual funciona a medida que se encuentren disponibles las coenzimas oxidantes NAD⁺ y FAD. Las coenzimas reducidas obtenidas del CAC se oxidan mediante la cadena transportadora de electrones, y es aquí donde retornan al CAC. La cuarta etapa, *La cadena transportadora de electrones*, es un conjunto de proteínas transmembrana, en donde los electrones pasan de un miembro a otro de la cadena de transporte mediante una serie de reacciones redox. Mediante la quimiosmosis, la energía liberada en estas reacciones será capturada para transportar protones a través de la membrana plasmática, como consecuencia, se crea un potencial eléctrico y un gradiente de protones (ΔpH) a través de la membrana. El transporte de protones intermembrana se da únicamente a través de canales especiales, en donde se produce un flujo termodinámicamente favorable a través de un canal especial que contiene ATP sintasa, la cual da lugar a la síntesis de ATP. La producción y el uso de energía en los organismos vivos giran en torno a la interconversión de $ATP \leftrightarrow ADP$.

El ADP y el ATP son anhídridos de ácido fosfórico, que al igual que los anhídridos carboxílicos cuando reaccionan con alcoholes al romper un enlace C-O forman un éster carboxílico, los anhídridos fosfóricos reaccionan con alcoholes al romper un enlace P-O para formar un éster fosfato, ROPO₃²⁻. Las reacciones de fosforilación con ATP requieren por lo general la presencia de un catión metálico divalente en la enzima, el cual suele ser Mg²⁺, para así formar un complejo ácido/base de Lewis con los átomos de oxígeno del fosfato y neutralizar las cargas negativas (figura A1) [33].

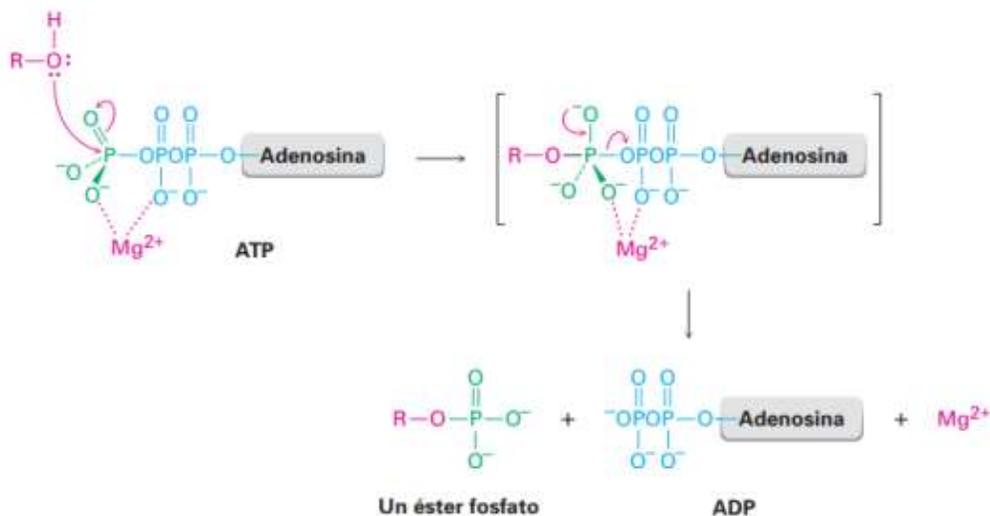


Figura A1. Dependencia del Mg^{2+} para la fosforilación con ATP.

A.2. Anabolismo: biosíntesis de ácidos grasos en bacterias

La síntesis de ácidos grasos (AG) es el primer paso en la formación de lípidos de membrana y triacilglicéridos, en donde las reacciones enzimáticas que llevan a la formación de ácidos grasos son básicamente las mismas para todos los sistemas biológicos. En bacterias, la síntesis de ácidos grasos es llevada a cabo por la sintasa de ácidos grasos tipo II (FAS II), la cual lleva las distintas actividades enzimáticas en polipéptidos individuales. La síntesis de ácidos grasos en *E. coli* ha sido ampliamente caracterizada y se utiliza como modelo de estudio del mecanismo FAS II en otras bacterias, por tal motivo, en este trabajo se utilizará como modelo la síntesis de ácidos grasos en *E. coli* (figura A2).

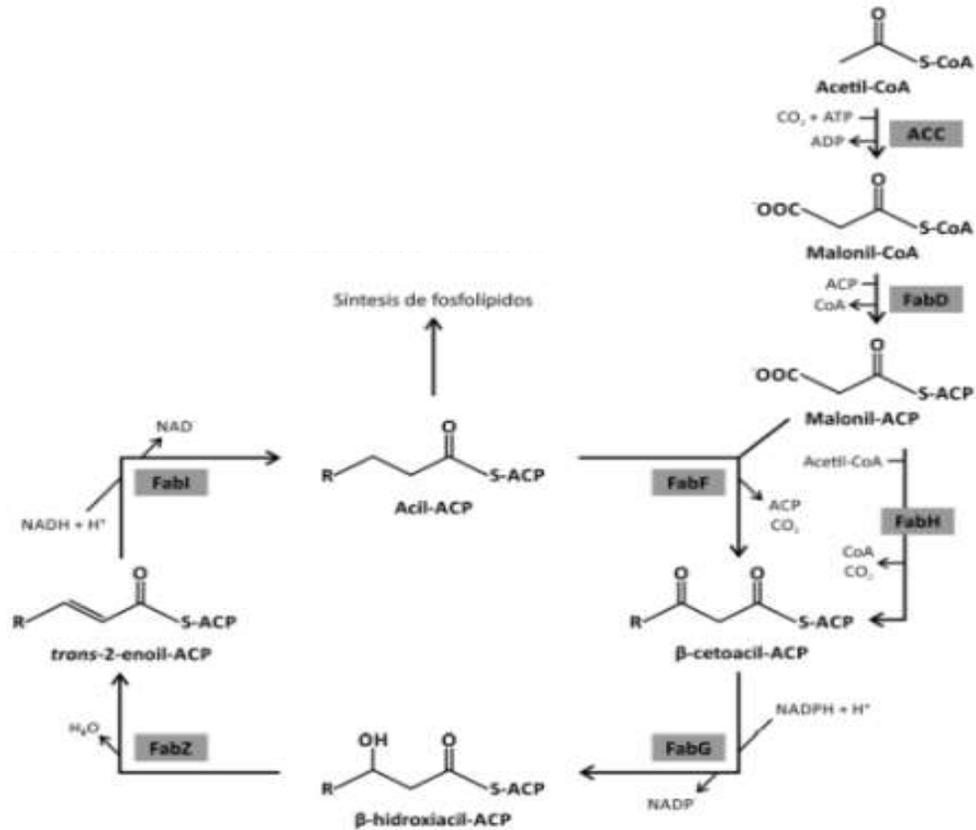


Figura A2. Síntesis de ácidos grasos en *E. coli*.

En la figura A2 podemos ver como el proceso de síntesis de AG comienza con la carboxilación dependiente de ATP del carbono 2 del acetil-CoA llevada a cabo por la enzima acetil-CoA carboxilasa (ACC), generando malonil-CoA. Posteriormente, el grupo malonilo del malonil-CoA es llevado a la proteína transportadora de acilos (ACP) por medio de una malonil-CoA:ACP transcilasa (FabD), en donde, el malonil-ACP generado será sustrato de las enzimas condensantes que irán enlongando las cadenas carbonatadas de los ácidos grasos de a dos unidades de carbono. La enzima β -cetoacyl-ACP sintasa III (FabH) promueve el inicio de la cadena carbonada, condensando el grupo acetilo de una molécula de acetil Co-A con el carbono 2 del malonil-ACP liberando CO₂ y generando β -cetobutiril-ACP. Este intermediario es reducido mediante la β -cetoacyl-ACP reductasa (FabG) dependiente de NADPH, y deshidratado por medio de β -hidroxiacyl-ACP deshidratasa (FabZ) gereando el trans-2-enoyl-ACP. Una reducción NADH a cargo de la trans-2-enoyl-ACP reductasa (FabI) genera un acil-ACP saturado de cuatro átomos de carbono. Este es el sustrato de la enzima β -cetoacyl-ACP sintasa II (FabF), que condensa al intermediario acil-ACP con otra molécula de malonil-ACP, enlongando en dos carbonos al intermediario acilado y nuevamente iniciando un ciclo de reducción, deshidratación y reducción de la cadena carbonatada.

El conjunto de reacciones descrito produce ácidos grasos saturados (AGS), en donde la longitud promedio está determinada por una competencia entre FabF, que elonga la cadena, y las enzimas acil-transferasas, que esterifican el ácido graso con glicerol-3-fostato o con acilglicerol-3-fostato y generan los intermediarios en la vía de síntesis de fosfolípidos de membrana. Los ácidos grasos terminan su elongación cuando son removidos de FAS II por las enzimas acil-transferasas [40].

A.3. Relación entre la síntesis de ácidos grasos y policétidos en *Streptomyces*

Los policétidos son moléculas con una amplia diversidad estructural, en donde muchos presentan actividad biológica como antibióticos, inmunosupresores, antifúngicos, antiparasitarios y anticancerígenos. Aunque presentan una amplia diversidad estructural, estos comparten la presencia de grupos ceto en su cadena carbonada, por ello el nombre de policétidos. De igual forma, estos grupos de moléculas tienen en común el mismo patrón de biosíntesis, en donde la policétido sintasa (PKS) es la enzima que cataliza el proceso, y genera los policétidos a través de condensaciones sucesivas de ácidos carboxílicos cortos activados como ésteres de CoA/ACP (como puede ser acetyl-malonil o metilmalonil-CoA), de forma similar a como se describió en la síntesis de ácidos grasos.

Se decidió mostrar las vías de síntesis de fosfolípidos, triacilglicerol (TAG) y la actinorrodina en *S. coelicolor*, las cuales están bien identificadas (figura A3), debido a que *S. coelicolor* y *S. lividans* están estrechamente relacionadas filogenéticamente, más del 93 % de las proteínas

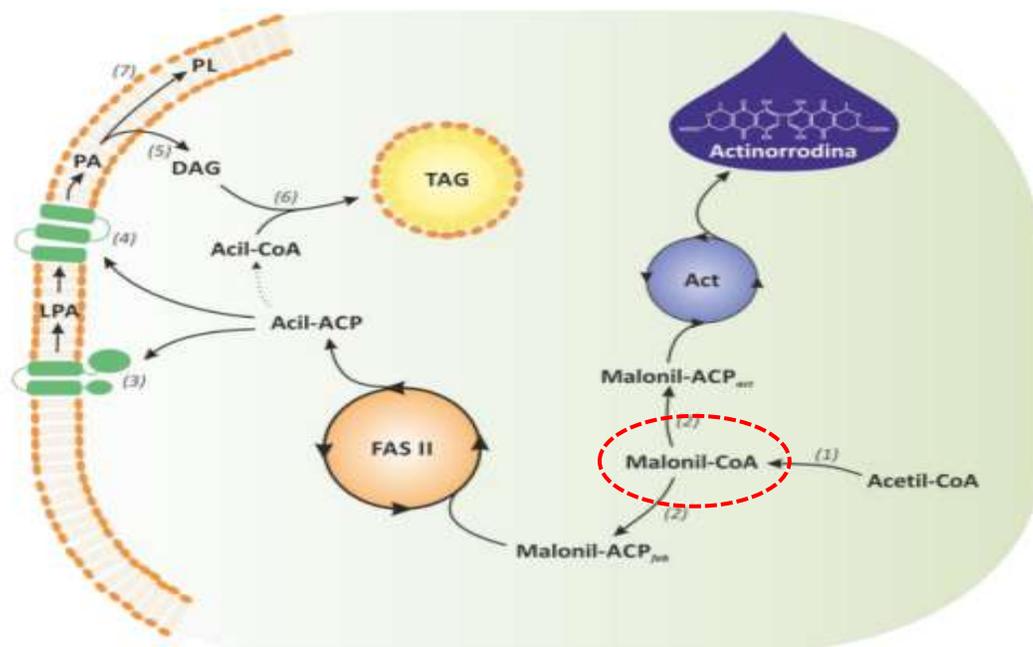


Figura A3. Relación entre la síntesis de ácidos grasos y policétidos en *Streptomyces*.

codificadas para una especie tienen ortólogos en la otra especie, poseen vías biosintéticas idénticas que dirigen la síntesis de lípidos y metabolitos secundarios, entre ellos, tres antibióticos bien caracterizados: antibiótico dependiente de calcio peptídico (CDA), antibiótico policétido rojo undecilprodigiosina (RED), y el antibiótico policétido azul actinorrodina (ACT). Aunque las vías biosintéticas son idénticas, *S. coelicolor* y *S. lividans* muestran capacidades diferentes para almacenar lípidos de almacenamiento de la familia de los TAG y para producir policétidos [30].

Particularmente la actinorrodina es un antibiótico policétido de color azul producido por *S. coelicolor*. El clúster *act* codifica para una PKS de tipo II responsable de la síntesis de este compuesto. La actinorrodina es un compuesto dimérico que requiere para cada monómero siete unidades de malonil-CoA y una de acetil-CoA. En *S. coelicolor* la síntesis de ácidos grasos y la de policétidos están estrechamente relacionados entre sí, ya que comparten el precursor clave: el malonil-CoA. El malonil-CoA puede ser dirigido hacia FAS mediante la transferencia del grupo malonilo a la proteína ACP_{fab} , perteneciente del sistema FASII, y codificada por el gen *acpP*; o bien, se puede dirigir hacia la síntesis de Actinorrodina, cuando este grupo es transferido a ACP_{act} , codificada dentro del clúster *act*. Pesé a que ambas proteínas tienen funciones muy diferentes (aunque presentan un alto grado de similitud), ambos ACP son cargados con un grupo malonilo por una única malonil-CoA:ACP transacilasa FabD. De esta forma, dependiendo del estado de crecimiento y las necesidades celulares, *S. coelicolor* es capaz de regular la producción de malonil-CoA por la ACC, y de guiar dicho precursor hacia FAS o PKS a través de su transferencia a ACP_{fab} o a ACP_{act} [40].



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

ACTA DE EXAMEN DE GRADO

No. 00152

Matrícula: 2202800175

RESPUESTAS FISIOLÓGICAS DE *Streptomyces lividans* TK24, ASOCIADAS A LA PRODUCCIÓN DE COMPUESTOS ANTIMICROBIANOS, EN PRESENCIA DE UN CAMPO ELÉCTRICO Y Mg²⁺.

En la Ciudad de México, se presentaron a las 12:00 horas del día 29 del mes de septiembre del año 2022 en la Unidad Iztapalapa de la Universidad Autónoma Metropolitana, los suscritos miembros del jurado:

DR. CARLOS OMAR CASTILLO ARAIZA
DRA. MARIA ISABEL REYES ARREOZOLA
DR. ARMANDO MEJIA ALVAREZ

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

MAESTRA EN CIENCIAS (INGENIERIA QUIMICA)

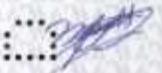
DE: AURORA MONTSERRAT HERNANDEZ OROZCO

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

APROBAR

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

2022

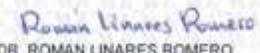
AURORA MONTSERRAT HERNANDEZ OROZCO
ALUMNA

REVISÓ



MTRA. ROSALIA SERRANO DE LA PAZ
DIRECTORA DE SISTEMAS ESCOLARES

DIRECTOR DE LA DIVISIÓN DE CBI



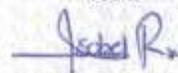
DR. ROMAN LINARES ROMERO

PRESIDENTE



DR. CARLOS OMAR CASTILLO ARAIZA

VOCAL



DRA. MARIA ISABEL REYES ARREOZOLA

SECRETARIO



DR. ARMANDO MEJIA ALVAREZ