

Empleo de la fusión de protoplastos en la obtención de cepas de *Streptomyces* más productoras de antibióticos

C. VALLÍN¹, A. RAMOS¹, R. RODRÍGUEZ², D. PÉREZ-VELAZCO¹, A. VIZOSO¹ y E. ALONSO¹

¹ Grupo de Antibióticos, Instituto de Química y Biología Experimental, Academia de Ciencias de Cuba

² Laboratorio "Mario Muñoz", Industria Farmacéutica, Ministerio de Salud Pública de Cuba.

Dentro del género *Streptomyces* se encuentran agrupados los productores de más de 60% de los antibióticos conocidos. Por tal razón, en los últimos años se han intensificado notablemente los estudios relacionados con el comportamiento bioquímico y genético de estos microorganismos, con el fin de impulsar la búsqueda de cepas hiperproductoras y lograr la biosíntesis de nuevos antibióticos por entidades biológicas modificadas.

En el presente trabajo se reportan algunos de los resultados en el empleo de la técnica de fusión de protoplastos para la obtención de cepas más productoras de oxitetraciclinas (OTC) a partir de la cepa salvaje *Streptomyces rimosus* QBS3.

Para realizar la fusión se utilizaron mutantes auxotróficas de *S. rimosus* QBS 3, productora de OTC. La producción del antibiótico se llevó a cabo según el procedimiento descrito previamente para el *S. rimosus* QBS 3 (Pérez-Velazco *et al.*, 1984) empleándose como cepa-patrón para la determinación de la actividad antibiótica el *Bacillus subtilis* ATCC 6633 (Grove y Randall, 1958).

Preparación de los protoplastos

Las cepas se cultivaron a 30°C y con agitación durante 24 horas en medio triptona soya, al cual se le añadió 25% de sacarosa y 3% de glicina. El micelio se recolectó mediante centrifugación y se trató con lisozima a una concentración de 2,5 mg/ml en solución P (Okanishi *et al.*, 1974). Transcurridas dos horas de incubación a 37°C se pudo observar la transformación del micelio en protoplastos.

Fusión y regeneración

Se mezclaron dos suspensiones de protoplastos ($1 - 5 \cdot 10^8$ ml) de las mutantes auxotróficas en proporción 1:1 y se centrifugaron a 2 500 rpm durante 15 minutos. El precipitado de protoplastos se resuspendió en 2 ml de solución P conteniendo polietilenglicol (PEG) de peso molecular 1 500, 4 000 y 6 000 a las concentraciones de 20, 30, 40 y 50%. Después de 5, 15 y 30 minutos de tratamiento a temperatura de 20°C, los protoplastos fusionados se diluyeron en 3 ml de solución P y se inocularon en placas de Petri con medio mínimo y medio completo; paralelamente se realizaron controles sin PEG.

Las mejores frecuencias de fusión se obtuvieron al emplear 50% de PEG 6 000 durante 30 minutos a temperatura de 28°C, lográndose valores de $3,8 \cdot 10^{-2}$ contra valores menores de $5 \cdot 10^{-5}$ cuando no se utilizó PEG. Es de señalar que cuando se fusionaron protoplastos

con diferentes requerimientos nutricionales, no se encontraron diferencias significativas en las frecuencias de fusión (figura 1).



FIG. 1. Agregaciones de protoplastos con PEG (magnificación 400x).

Anteriormente Hopwood y Chater, 1978; Ochi *et al.*, 1979; Baltz y Matsushina, 1981 y Ochi, 1982, habían reportado la obtención de altas frecuencias de colonias prototróficas después de la fusión en *Streptomyces*.

En la tabla 1 se muestra una comparación de los valores de OTC obtenidos en las cepas salvaje, parentales y las resultantes después de la fusión, pudiendo observarse un incremento entre 5 - 6 veces al comparar las cepas fusionadas con la salvaje y un incremento considerable en relación con las parentales, las cuales presentaban producciones muy bajas.

Tabla 1
PRODUCCION DE OTC DE LAS CEPAS PARENTALES, SALVAJE
Y DE LOS PRODUCTOS DE LA FUSION

Cepa	$\mu\text{g/ml}$ de OTC
<i>S. rimosus</i> QBS 3	215
<i>S. rimosus</i> UV 13 ade^-	6
<i>S. rimosus</i> UV 7 arg^-	4
<i>S. rimosus</i> NTG 1 arg^-	2
F-1011	1 073
F-1012	1 073
F-1013	1 073
F-1014	810
F-1021	1 114
F-1022	1 113
F-1023	590
F-1024	780
F-1025	1 073

F-1011 a F-1014: Productos de la fusión obtenidos entre UV 13 ade^- NTG 1 arg^-

F-1021 a F-1025: Productos de la fusión obtenidos entre UV 13 ade^- UV 7 arg^-

Contrariamente a los resultados obtenidos previamente con la cepa salvaje *S. rimosus* QBS 3, en la cual la biosíntesis de OTC se reprime al utilizar concentraciones de glucosa superiores a 0,5%, esta represión no se observó en el caso de las cepas fusionadas, lográndose valores superiores al antibiótico a mayores concentraciones de glucosa en el medio de producción (tabla 2).

Tabla 2
INFLUENCIA DE LA CONCENTRACION DE ALMIDON Y GLUCOSA
EN LA BIOSINTESIS DE OTC EN LA CEPA F-1022

Fuentes de carbohidratos		Cantidad de OTC ($\mu\text{g/ml}$)
Almidón (%)	Glucosa (%)	
1	1	3 374
3	1	4 393
3	3	6 931

Consideramos que el desarrollo de las técnicas de fusión de protoplastos, así como el análisis del DNA cromosomal de las cepas fusionadas, permitan determinar la posibilidad de que el aumento de la producción de la OTC en los productos de la fusión se deba a una amplificación *in vivo* de los genes involucrados en la biosíntesis del antibiótico.

REFERENCIAS

- BALTZ, R. H. y P. MATSUSHIMA (1981). *Protoplast fusion in Streptomyces: conditions for efficient genetic recombination and cell regeneration*. Journal of General Microbiology 127: 137-146.
- GROVE, D. y W. RANDALL (1958). *Assay methods of antibiotics. A laboratory Manual*. Ed. Inst. Médico, Moscú.
- HOPWOOD D. y K. F. CHATER (1980). *New approaches to antibiotic production*. Philosophical transactions of the Royal Society of London (Series B) 290: 313-328.
- OCHI, K. (1982). *Protoplast fusion permits high-frequency transfer of a Streptomyces determinant which mediates actinomycin synthesis*. Journal of Bacteriology 150: 592-597.
- OCHI, K., M. J. HITCHCOCK y B. KATZ (1979). *High frequency fusion of Streptomyces parvulus or Streptomyces antibioticus protoplast induced by polyethylene glycol*. Journal of Bacteriology 139: 984-992.
- OKANISHI, M., M. SUZUKI y H. UMEZAWA (1974). *Formation and reversion of Streptomyces protoplast; cultural condition and morphological study*. Journal of General Microbiology 80: 389-400.
- PEREZ-VELASCO, D.; A. VIZOSO; M. SANTANA y J. SANTOS (1984). *Utilización de recursos naturales en la inducción de OTC por la mutante Streptomyces rimosus AF-16*. Primera Jornada Científico-Técnica de la Industria Médico Farmacéutica. La Habana, Cuba.