



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

INSTITUTO DE CIENCIAS (ICUAP).

MAESTRÍA EN CIENCIAS (MICROBIOLOGÍA)

**“EFECTO DE LAS VARIABLES DE CULTIVO EN LA PRODUCCIÓN
DE METABOLITOS ANTAGÓNICOS DE *Pseudomonas protegens*
EMM-1”.**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

**MAESTRO EN CIENCIAS (MICROBIOLOGÍA)
CON OPCIÓN EN: BIOQUÍMICA Y GENÉTICA MICROBIANA**

PRESENTA:

IBQ. ISMAEL MARTÍNEZ RAMOS

DIRECTOR DE TESIS:

DR. ANTONINO BAEZ ROGELIO



Puebla, Pue. a 31 de octubre 2023.

**A LA ACADEMIA DEL POSGRADO
EN MICROBIOLOGÍA
CICM-ICUAP
PRESENTE.**


Por este conducto los abajo firmantes, integrantes del Comité revisor de Tesis de Maestría del alumno **Ismael Martínez Ramos**, les informamos que hemos revisado el escrito titulado:

“Efecto de las variables de cultivo en la producción de metabolitos antagonicos de *Pseudomonas protegens* EMM-1”


A nuestro juicio, el alumno **Ismael Martínez Ramos** puede proceder a la digitalización de la tesis y a la presentación del examen de grado correspondiente.

Sin más que agregar, nos despedimos afectuosamente de ustedes.

Atentamente.
“Pensar Bien Para Vivir Mejor”


D.C. Verónica Quintero Hernández


D.C. Jesús Muñoz Rojas


D.C. Leobardo Serrano Carrón


D.C. Miguel Castañeda Lucio

Este trabajo de Tesis fue realizado en el Laboratorio de Ecología Molecular
Microbiana del Centro de Investigaciones en Ciencias Microbiológicas-
ICUAP-BUAP, contando los apoyos CONACYT No. 797805, VIEP PV 2022
ID 00183 Y VIEP PV 2023 ID 00281.

No. CVU 1098025

DEDICATORIA

Dedico esta tesis a mi padre, por apoyarme incondicionalmente en cada uno de los momentos difíciles de mi vida, por su amor y comprensión y por sus buenos consejos que me han ayudado a ser una mejor persona.

A Mich, por haber estado en todo momento y por regalarme su paciencia y su cariño.

A mi madre y hermana por escucharme cuando tengo algún problema y darme palabras de ánimo.

A mis tíos y abuelita, que siempre se preocuparon por mí.

A mis amigos Ricardo y Aldahir, por demostrarme su verdadera amistad aún en momentos de dificultad.

Gracias infinitas.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco infinitamente al doctor Antonino Báez Rogelio, primeramente, por ser mi asesor de tesis, pero también por brindarme su apoyo en todo momento, por sus consejos y por compartirme sus conocimientos.

A mis compañeros de laboratorio Kevin y Alexis por siempre mantener un ambiente agradable y hacer cada jornada muy divertida.

A mi gran amigo Ricardo porque, a pesar de la distancia, encontrábamos la forma de conversar y convivir, por su apoyo en todo momento.

A mi amigo Aldahír, por ser un amigo incondicional.

A mis compañeras, a mis maestros del Posgrado en Microbiología por su valiosa enseñanza.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el apoyo financiero otorgado y a la Vicerrectoría de Investigación y Estudios de Posgrado de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla (VIEP-BUAP) por los proyectos PV 2022 ID 00183 y PV 2023 ID 00281.

ÍNDICE

1. RESUMEN.....	8
2. INTRODUCCIÓN.....	9
3. ANTECEDENTES	11
3.1 Producción de compuestos antimicrobianos en condiciones de baja agitación	12
3.2 Efecto de la fuente de carbono y temperatura en la producción de pioluteorina y 2,4-diacetilfloroglucinol (DAPG).....	12
3.3 Extracción de sustancias inhibitorias a partir de cultivos en placa de Petri de <i>P. protegens</i> EMM-1	13
3.4 <i>Pseudomonas</i> como bacterias de biocontrol.....	14
4. JUSTIFICACIÓN	15
5. HIPÓTESIS	15
6. OBJETIVOS.....	15
OBJETIVO GENERAL	15
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	16
7. METODOLOGÍA	17
7.1 Esquema de trabajo	17
7.2 Ensayos de agar en doble capa.....	18
7.3 Monitoreo del crecimiento.....	18
7.4 Diseño factorial 3 ²	19
7.5 Monitoreo de la actividad inhibitoria mediante el método de difusión en pozo.....	20
7.6 Cultivos de <i>Pseudomonas protegens</i> EMM-1 en biorreactor	21
7.7 Identificación de los compuestos presentes en los extractos obtenidos en biorreactor mediante cromatografía de líquidos-masa.....	23
7.7.1 Extracción con solventes de las sustancias inhibitorias	23
8. RESULTADOS.....	24
8.1 Ensayos de agar en doble capa usando <i>P. protegen</i> EMM-1 como cepa productora	24
8.2 Monitoreo del crecimiento.....	25
8.3 Monitoreo de la actividad inhibitoria por el método de difusión en pozo.....	27
8.4 Diseño factorial 3 ²	31
8.5 Cultivos de <i>Pseudomonas protegens</i> EMM-1 en biorreactor	34
8.5.1 OTR de los cultivos	34
8.5.2 Determinación de k _{LA} en biorreactor	37

8.5.3	OTR máximas a distintas velocidades de agitación en biorreactor	39
8.5.4	Ensayos en biorreactor	40
8.6	Identificación de los compuestos presentes en los extractos obtenidos en biorreactor mediante cromatografía de líquidos-masa	42
8.6.1	Extracción con solventes de las sustancias inhibitorias	42
8.6.2	Cromatografía de líquidos-masa.....	43
9.	DISCUSIÓN.....	48
10.	CONCLUSIÓN.....	52
11.	PERSPECTIVAS DE ESTE TRABAJO.....	52
	ANEXO	53
	REFERENCIAS	55

1. RESUMEN

El uso inadecuado y desmedido de antibióticos, aunado al lento descubrimiento de antibióticos efectivos, ha provocado la propagación de microorganismos multidrogo-resistentes (MDR) detonando un problema importante de salud pública a nivel mundial. Se estima que para el 2050 las infecciones por microorganismos MDR serán las causantes de 10 millones de muertes por año por lo que se requiere con urgencia alternativas efectivas contra estos agentes infecciosos.

Pseudomonas protegens EMM-1 es una bacteria Gramnegativa aislada de la rizosfera del maíz “rojo criollo” capaz de inhibir el crecimiento de bacterias de importancia clínica como *Streptococcus*, *Klebsiella*, *Burkholderia* y la cepa tipo *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. En este trabajo se evaluó, mediante un diseño factorial 3^2 , el efecto de la temperatura, fuente de carbono y aireación sobre la producción de sustancias antimicrobianas producidas por *Pseudomonas protegens* EMM-1 contra el aislado clínico *Streptococcus* sp. SP6 en medio líquido SYP y SYP modificado sustituyendo la sacarosa por manitol y glicerol. En los experimentos realizados en medio con sacarosa no se observó actividad inhibitoria en ninguno de los experimentos; con ninguna de las variables en ningún nivel, solamente en los medios con glicerol y manitol hubo actividad antimicrobiana. Las condiciones de cultivo en matraz que maximizaron la producción de compuestos antimicrobianos sintetizados por *Pseudomonas protegens* EMM-1 se implementaron en biorreactor.

Del extracto crudo obtenido del biorreactor se realizaron extracciones con acetonitrilo y cloroformo obteniendo una fase acuosa de color amarillento que producía halos difusos y una fase orgánica incolora que producía halos de inhibición claros, estas fases se analizaron mediante LC-MS y, en la fase acuosa, se identificaron cuatro compuestos que, trabajos anteriores, reportaron su relación con la actividad antimicrobiana en *Pseudomonas*, sin embargo, en la fase orgánica estos compuestos no fueron identificados, lo que sugiere que *Pseudomonas protegens* EMM-1 posee otros compuestos aún desconocidos que podrían tener una mayor actividad antimicrobiana.

2. INTRODUCCIÓN

El uso desmedido e inadecuado de antibióticos en el área médica, veterinaria y agrícola ha provocado la propagación de microorganismos resistentes a múltiples fármacos (MDR), lo cual, aunado al lento descubrimiento de antibióticos efectivos, ha detonado un problema importante de salud pública a nivel mundial (Van Boeckel *et al.*, 2015; Rodríguez-Mozaz *et al.*, 2015). Magiorakos *et al.*, en 2012 definieron tres tipos de microorganismos resistentes; los resistentes a múltiples fármacos (MDR) que son microorganismos que resisten a al menos un agente en tres o más categorías de antimicrobianos, extremadamente resistentes a fármacos (XDR) que son los microorganismos que resisten a al menos un agente en todas las categorías de antimicrobianos y panresistentes a los fármacos (PDR) los cuales resisten a todos los agentes en todas las categorías de antimicrobianos.

O'Neill (2016) estima que para el 2050 habrá 10 millones de muertes al año a causa de las infecciones por microorganismo MDR. Según la Global Antibiotic Research & Development Partnership (GARDP) cada año mueren 700 mil personas por infecciones causadas por microorganismos resistentes a los medicamentos, por lo tanto, se requieren con urgencia alternativas contra los agentes MDR que, además de ser eficaces, no dañen la microbiota intestinal como lo hacen los antibióticos de amplio espectro (Cotter *et al.*, 2012).

Los microorganismos cuentan con un amplio arsenal de compuestos metabólicos que los ayudan a sobrevivir en ambientes de competencia, entre los que se encuentran los péptidos ribosómicos y no ribosómicos, policétidos, lipopéptidos y compuestos volátiles (Lazzaro *et al.*, 2020; Simons, Alhanout y Duval, 2020; Caulier *et al.*, 2019; Lei *et al.*, 2019).

Pseudomonas protegens es una bacteria Gramnegativa que vive en el suelo o en el sistema radicular de algunas plantas y produce metabolitos secundarios y enzimas extracelulares que son tóxicos para bacterias y hongos patógenos (Yan *et al.*, 2017; Wang *et al.*, 2020; Takeuchi *et al.*, 2023). Entre los metabolitos reportados con actividad antimicrobiana producidos por *P. protegens* destacan el policétido aromático 2-4-diacetilfloroglucinol (DAPG), la pioluteorina (PLT), pirrolnitrina (PRN) y el cianuro de hidrógeno (HCN) (Gross y Loper, 2009). Estos metabolitos convierten a *Pseudomonas protegens* en un efectivo agente de biocontrol contra el desarrollo de enfermedades en los

cultivos agrícolas. En nuestro laboratorio se reportó que una cepa de *P. protegens* inhibió el crecimiento de bacterias de importancia clínica como *Streptococcus*, *Klebsiella*, *Burkholderia* y la cepa tipo *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (Cesa-Luna, 2020).

En el presente proyecto se propone un diseño experimental para evaluar el efecto de la temperatura, fuente de carbono y aireación sobre la producción de sustancias antimicrobianas producidas por *Pseudomonas protegens* EMM-1, con la finalidad de, en un futuro, purificar e identificar los compuestos que presenten mayor potencial biotecnológico.

3. ANTECEDENTES

Pseudomonas protegens EMM-1 (antes erróneamente identificada en nuestro grupo como *Sphingomonas* sp. DS-204), es una cepa bacteriana perteneciente al grupo de las bacterias Gramnegativas que fue aislada de la rizosfera de maíz “rojo criollo”, tiene un amplio espectro de inhibición, por lo que es capaz de antagonizar hongos fitopatógenos de los géneros *Aspergillus*, *Rhizopus* y *Fusarium*; así como bacterias pertenecientes al género *Acinetobacter*, *Azospirillum*, *Paraburkholderia*, *Pseudomonas*, *Rhizobium* y *Sphingomonas* (Molina-Romero *et al.*, 2017; De La Cruz-Enríquez, 2019; Cesa-Luna *et al.*, 2020). *P. protegens* EMM-1 fue también capaz de antagonizar algunas especies de importancia clínica, por su resistencia a antibióticos, de los géneros *Klebsiella*, *Burkholderia* y *Streptococcus* (Aguayo-Acosta, 2015; Cesa-Luna *et al.*, 2020). En los trabajos mencionados, la actividad antagónica de *P. protegens* EMM-1, se demostró creciendo la bacteria en medios sólidos en ensayos de inhibición simultánea y agar de doble capa. Aguayo-Acosta, 2015 concluyó que *P. protegens* EMM-1 crecida en medio LB líquido en matraces no era capaz de producir adecuadamente sustancias antagónicas, sólo en medio LB-agar semisólido (8 g/L de agar). Además, encontró que en el medio mineral MM9-agar con glucosa, manitol o fructosa como fuente de carbono, *P. protegens* EMM-1 producía cantidades similares de compuestos antagónicos (1706 unidades arbitrarias/ml) que en los medios sólidos LB o Mac Conkey.

En un experimento en matraces se observó que *P. protegens* EMM-1 tiene capacidad de producir sustancias inhibitorias en medio líquido incubando a baja agitación (50 rpm), pero en alta agitación (180 rpm) esta capacidad no es observada (Cesa-Luna, 2020). En otro estudio, Jabłońska *et al.*, 2022 demostraron que *P. aeruginosa* producía mayores cantidades del pigmento pioverdina cuando la aireación (el área de interfase entre el medio de cultivo y el aire) era mayor, por lo que se sugiere que la oxigenación podría tener un papel importante en la producción de estos metabolitos.

Cesa-Luna *et al.*, 2020 lograron amplificar a partir del DNA genómico de *P. protegens* EMM-1 genes involucrados en la producción de compuestos antimicrobianos como el 2,4-diacetilfloroglucinol (DAPG) y pioluteorina, sin embargo, no se identificó los compuestos en los extractos de cultivo, por lo que se requieren más estudios para determinar

si estas sustancias podrían ser las causantes de la actividad antimicrobiana observada en la cepa EMM-1 como sucede en las cepas Pf-5, SN15-2, H78 y MP12 de *P. protegens* (Yan *et al.*, 2018; Shi *et al.*, 2019; Andreolli *et al.*, 2019; Cesa-Luna *et al.*, 2020; Wang *et al.*, 2020).

3.1 Producción de compuestos antimicrobianos en condiciones de baja agitación

López *et al.* (2012) realizaron un estudio en matraces de 250 ml con 50 ml de medio de cultivo donde se observó que la velocidad de agitación no presentaba un efecto importante en la producción de biomasa de un cultivo de *Pseudoalteromonas* sp., ya que, de las 0, 150, 250 y 450 rpm utilizadas, la producción de biomasa fue similar en la fase estacionaria (6-5.5 mg/mL). Sin embargo, en la actividad antimicrobiana sí tuvo un efecto significativo. En cultivos estáticos (0 rpm) o bajas revoluciones (150 rpm), los sobrenadantes de los cultivos sí presentaron actividad antimicrobiana contra aislados clínicos, pero a velocidades de agitación mayores a 150 rpm, esta fue suprimida, lo que sugiere que la transferencia de oxígeno “afecta directamente la regulación de la actividad antimicrobiana” (López *et al.*, 2012). Un estudio similar en matraces fue llevado a cabo por Yang *et al.* (2007), reportaron mayor producción de violaceína por *Pseudoalteromonas luteoviolacea* a bajas velocidades de agitación, mientras que con el aumento de la agitación la producción de este antimicrobiano disminuyó y, como en el estudio anterior, la producción de biomasa no fue afectada por la velocidad de agitación.

3.2 Efecto de la fuente de carbono y temperatura en la producción de pioluteorina y 2,4-diacetilfloroglucinol (DAPG)

Aguayo-Acosta (2015) utilizó el medio mineral MM9-agar con diferentes fuentes de carbono como xilosa, manitol, glucosa, fructosa y mio inositol para la producción de sustancias inhibitorias por la cepa EMM-1. Sólo los medios con manitol, glucosa o fructosa produjeron cantidades notorias de sustancias inhibitorias a diferencia de las otras fuentes de carbono utilizadas. Sin embargo, no se logró identificar estas sustancias inhibitorias producidas.

En otro estudio, se cultivaron cepas de *P. fluorescens* Pf-5 en medio Difco Nutrient Broth (DNB), se observó que al suplementar este medio con 1% (v/v) de glicerol se promovía la producción de pioluteorina y, al ser suplementado con 2% (p/v) de glucosa, se promovía la producción de 2,4-diacetilfloroglucinol (Kidarsa *et al.*, 2011).

Shanahan *et al.* (1992) describieron el efecto de la temperatura en la producción de 2,4-diacetilfloroglucinol por la cepa de *Pseudomonas* sp. F113, se probaron temperaturas entre 4 y 37°C y la mayor cantidad de DAPG se produjo a los 8 días incubando a 12°C, además, observaron que la fuente de carbono jugaba un papel importante en la producción de dicha sustancia, obteniendo mayores rendimientos cuando se utilizó fructosa, sacarosa o manitol como fuente de carbono. Se menciona también que cuando la cepa se cultivó en volúmenes pequeños (profundidad de líquido de 1 cm en matraz Erlenmeyer de 1L) aumentó considerablemente la producción de DAPG, en contraste con volúmenes de cultivo mayor donde se produjeron cantidades insignificantes. Otra observación fue que al cultivar la cepa en agar semisólido también produjo cantidades similares de DAPG a las producidas en volúmenes pequeños, lo que motiva a “investigar sobre el papel de la disponibilidad de oxígeno en la producción de DAPG” (Shanahan *et al.*, 1992).

3.3 Extracción de sustancias inhibitorias a partir de cultivos en placa de Petri de *P. protegens* EMM-1

En nuestro grupo de trabajo se desarrolló un método de extracción de las sustancias inhibitorias por lixiviación en frío, el cual resultaba efectivo para extraer del agar los metabolitos. El método consistía en colocar 100 µL de cultivo en fase estacionaria de *P. protegens* en membranas de nitrocelulosa estériles de tamaño de poro de 0.22 µm, estas se colocaban sobre cajas de Petri con 10 mL de medio LB sólido, pasadas 48 horas de incubación se retiraban las membranas dejando únicamente el sitio donde se presentaba la sustancia inhibitoria, posteriormente, se cortaba el pedazo de agar y se colocaba en tubos Falcon de 50 ml con etanol absoluto frío y cloroformo como disolventes, y se incubaba por 24 h a 4 °C (Aguayo-Acosta, 2015; Cesa-Luna, 2016).

Aunque esta metodología ha sido útil a nivel de laboratorio, no sería práctica para el escalamiento de la producción y purificación de los compuestos producidos por *P. protegens* EMM-1. Por esta razón se ha decidido estudiar condiciones de cultivo en medio líquido que nos permitan desarrollar tecnologías de purificación escalables.

3.4 *Pseudomonas* como bacterias de biocontrol

Pseudomonas pueden producir una amplia gama de metabolitos secundarios, muchos de ellos con capacidad de biocontrol, como las fenazinas, que son pigmentos tricíclicos que muestran actividad de amplio espectro contra hongos y bacterias patógenas, los genes responsables de la producción de fenazinas son *phzABCDEFG* y está regulada por quorum sensing y por la vía de transducción de señales Gac-Rsm (Biessy y Fillion, 2018). Otro antimicrobiano producido por *Pseudomonas*, utilizado en raíces y plántulas como biocontrol de enfermedades, es el 2,4-diacetilfloroglucinol, un policétido cuyos genes involucrados en su producción son *phlACB*, *phlD*, *phlEI*, *phlG*, *phlH* y *phlF* (Almario *et al.*, 2017). Pioluteorina es un antibiótico usado contra enfermedades causadas por *Pythium ultimum* en plantas de algodón, los genes biosintéticos son *pltABCDEFGLM*, *pltIJKNOP*, *pltZ* y *pltR*. Pirrolnitrina es un antifúngico de amplio espectro producido por *Pseudomonas*, sus genes biosintéticos son *prnABCD* (Ligon *et al.*, 2000). Otros metabolitos de importancia para el biocontrol producidos por *Pseudomonas* son el cianuro de hidrógeno (HCN), los biosurfactantes y sideróforos (Höfte, 2021). El sistema de doble componente GacS/GacA tiene un rol importante en la regulación de los metabolitos secundarios producidos por *Pseudomonas* ya que, la mayoría de éstos, son sintetizados solamente cuando GacS/GacA se encuentra activo. GacS es una cinasa sensora que se encuentra en la membrana de las células y se activa fosforilándose mediante una señal específica ambiental que desencadena la cascada (Dolores-Ferreiro y Trinidad-Gallegos, 2021; Monteagudo-Cascales *et al.*, 2022).

4. JUSTIFICACIÓN

Pseudomonas protegens EMM-1 produce sustancias que son capaces de inhibir el crecimiento de hongos fitopatógenos y bacterias multidrogo-resistentes, algunas de ellas pertenecientes a los géneros *Burkholderia*, *Klebsiella* y *Streptococcus*, estas dos últimas de importancia clínica (Cesa-Luna, 2016; De la Cruz-Enríquez, 2019), por lo que el tener tecnología de producción escalable podría ayudar en el desarrollo de nuevos antibióticos efectivos.

En trabajos anteriores a éste, las sustancias producidas por *Pseudomonas protegens* EMM-1 en medio líquido no tuvieron los efectos inhibitorios como las producidas en medio sólido (Aguayo-Acosta, 2015), el poderlas producir en medio líquido facilitaría la producción, purificación y escalamiento.

5. HIPÓTESIS

La temperatura, la fuente de carbono y la aireación afectarán la producción de metabolitos inhibitorios sintetizados por *P. protegens* EMM-1 contra *Streptococcus* sp. SP6.

6. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

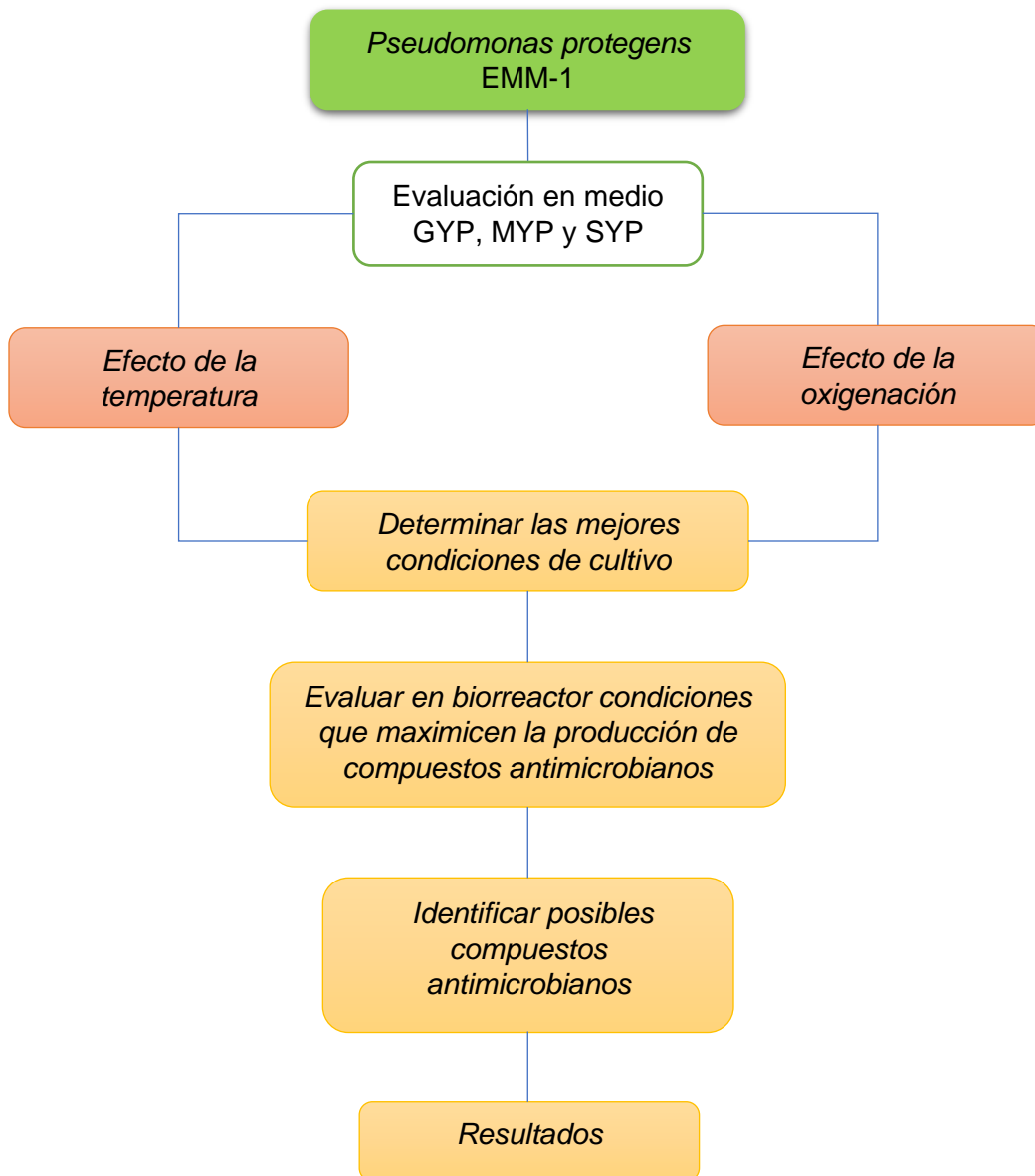
Determinar el efecto de la temperatura, fuente de carbono y condiciones de oxigenación en la producción de compuestos antimicrobianos sintetizados por *Pseudomonas protegens* EMM-1 en medio líquido.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar el efecto de la temperatura, y condiciones de oxigenación en distintos medios de cultivo sobre la producción de compuestos antimicrobianos sintetizados por *Pseudomonas protegens* EMM-1 en matraces mediante un diseño de experimentos. Oxigenación (matraz de 250 ml, con 15, 50 y 85 mL de volumen de llenado); Temperatura (15, 23 y 28°C); medio SYP y medio SYP modificado sustituyendo la sacarosa por manitol y glicerol.
- Analizar los resultados del diseño de experimentos y seleccionar las condiciones de cultivo en matraz que maximicen la producción de compuestos antimicrobianos por *Pseudomonas protegens* EMM-1.
- Evaluar en biorreactor las condiciones de cultivo seleccionadas en el objetivo anterior.
- Identificar mediante cromatografía de líquidos-masa los compuestos presentes en los extractos obtenidos en biorreactor.

7. METODOLOGÍA

7.1 Esquema de trabajo



SYP: Sacarosa, extracto de levadura, fosfatos

GYP: Glicerol, extracto de levadura, fosfatos

MYP: Manitol, extracto de levadura, fosfatos

7.2 Ensayos de agar en doble capa

Con la finalidad de corroborar la capacidad antagónica reportada en estudios anteriores de la cepa EMM-1 de *P. protegens*, se realizaron ensayos de agar en doble capa como los descritos por Muñoz-Rojas *et al.*, 2005 y Cesa-Luna *et al.*, 2019. El ensayo se realizó con 4 cepas que se habían reportado anteriormente como cepas sensibles a los metabolitos de *P. protegens* EMM-1; *Streptococcus* sp. SP10, *Streptococcus* sp. SP6, 4MePi8 (batería con actividad metilotrófica) y *K. pneumoniae* (ATCC 13883) (Aguayo-Acosta, 2015; Cesa-Luna, 2016). Se sembró en el centro de placas de LB agar, a partir de un cultivo “overnight” (16-18 horas), 20 μ L de la cepa productora y se incubó durante 72 h, posteriormente, la colonia se removió con un portaobjetos estéril y los residuos con un isopo, las placas se sometieron a vapores de cloroformo durante 60 min con la finalidad de eliminar las células que pudieron haber quedado. Después, se dejaron reposar las placas 10 min en una campana de flujo laminar para evaporar por completo los residuos de cloroformo. Posterior a esto, se vertió sobre las placas una capa de 10 mL de LB-agar suave (8 g/L agar) previamente inoculado con alguna de las cuatro cepas sensibles mencionadas anteriormente y se incubó durante 24 h. La aparición de halos de inhibición fue un indicativo de la actividad antagónica positiva de *P. protegens* EMM-1.

7.3 Monitoreo del crecimiento

La bacteria productora *Pseudomonas protegens* EMM-1 se cultivó en medio líquido SYP suplementado con molibdeno y zinc el cual tiene la siguiente composición por litro de agua destilada: Extracto de levadura 3 g, sacarosa 10 g, K_2HPO_4 1 g, KH_2PO_4 3 g, $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ 100 mg, $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$ 120 mg. Cuando se utilizó manitol o glicerol como sustituyente de la sacarosa fue a una concentración de 10 g/L. El crecimiento se siguió mediante el conteo de unidades formadoras de colonia en placas de LB agar.

Para los ensayos se utilizó un preinóculo de la cepa EMM-1 inoculando 10 mL de medio con una colonia de *P. protegens* EMM-1 en un tubo Falcon de 50 mL y se incubó

durante 16-18 h a 30°C en condiciones estáticas alcanzando una densidad celular de entre 1 y 5 x 10⁸ UFC/mL.

7.4 Diseño factorial 3²

Se realizó un diseño factorial de dos factores con tres niveles para determinar el efecto de la temperatura y oxigenación en la producción de compuestos inhibitorios sintetizados por *P. protegens* EMM-1 en matraces cónicos agitados, además se utilizaron dos variaciones del medio SYP. La variable oxigenación se manipuló utilizando 15, 50 y 85 mL de volumen de llenado en matraces cónicos de 250 mL. También se evaluó el efecto de tres diferentes temperaturas, 28, 23 y 18°C. Todos los experimentos se realizaron en medio SYP y medio SYP modificado con dos sustituyentes de la sacarosa; manitol (MYP) y glicerol (GYP), los datos se muestran en la Tabla 1. Cada matraz se inoculó con el 1% (v/v) del preinóculo.

Las variables y sus magnitudes fueron establecidas a partir de la revisión de la literatura para la producción de DAPG y pioluteorina, así como las referencias de nuestro grupo (Shanahan *et al.*, 1992; Duffy y Défago, 1999; Humair *et al.*, 2009; Takeuchi *et al.*, 2009; Kidarsa *et al.*, 2011; Aguayo-Acosta, 2015).

Para el análisis estadístico se utilizó el programa Minitab Statistical Software versión 20. Se empleó análisis de varianza ANOVA. Los valores de $p < 0.05$ se consideraron significativos.

Tabla 1. Datos del diseño factorial 3² para los tres medios utilizados.

Temperatura (°C)	Vol. de llenado (mL)
18	15
23	15
28	15
18	50
23	50
28	50
18	85
23	85
28	85

7.5 Monitoreo de la actividad inhibitoria mediante el método de difusión en pozo

24 horas antes de la prueba de antagonismo se creció la cepa multidrogo-resistente *Streptococcus* sp. SP10 y SP6 incubando a 30 °C y hasta la fase estacionaria en medio líquido LB. El medio LB está constituido por los siguientes componentes por litro de agua destilada: Peptona de caseína 10 g, extracto de levadura 5 g, cloruro de sodio 10 g. *Streptococcus* sp. SP10 y SP6 se usaron como cepa “sensible” en el ensayo de antagonismo de difusión en pozo.

La actividad antagónica de los metabolitos producidos por *P. protegens* EMM-1 se evaluaron a partir del sobrenadante filtrado de los cultivos mediante la metodología de difusión en pozos. Para ello se tomaron muestras de los cultivos líquidos, se centrifugaron a 12225 x g durante 15 min y se filtraron con membranas de nitrocelulosa de 0.22 µm. Después, se vertieron 20 mL de LB agar suave (8g/L) previamente inoculado con 100 µL del cultivo de las cepas MDR SP10 o SP6 (Cesa-Luna, 2020) en placas de Petri, cuando gelificó el agar, se realizaron pozos con ayuda de la base de una punta estéril para micropipeta de 1 mL y se colocaron volúmenes de 150 µL del extracto crudo filtrado y un extracto sin previo crecimiento de células como control negativo en ellos. Las placas se dejaron en campana de flujo laminar durante 20 min hasta la absorción del extracto y se incubaron a 30°C durante 24 h. La presencia de un halo alrededor del pozo indicó actividad inhibitoria del extracto crudo de la cepa EMM-1. Los resultados de inhibición se expresaron en unidades arbitrarias (UA·mm/mL) calculadas con la siguiente ecuación:

$$\frac{UA \cdot mm}{mL} = \frac{dilución}{volumen de muestra (mL)} * radio del halo (mm)$$

También se ensayaron diluciones seriadas de estos sobrenadantes filtrados para determinar cuál condición de cultivo produce los sobrenadantes con mayor concentración de metabolitos inhibitorios.

7.6 Cultivos de *Pseudomonas protegens* EMM-1 en biorreactor

Una vez determinadas las condiciones en matraz que maximizaron la producción de compuestos antimicrobianos sintetizados por *Pseudomonas protegens* EMM-1 se procedió a implementarlas en un biorreactor Applikon ezControl de 1L. Se controló la temperatura, velocidad de agitación y flujo de aire de entrada al reactor para emular las condiciones obtenidas del objetivo 2. Sin embargo, para poder emular la oxigenación de los experimentos en matraces (objetivo 2), fue necesario primero determinar la velocidad de transferencia de oxígeno (OTR por sus siglas en inglés) en los matraces con distintos volúmenes de llenado (15, 50 y 85 ml de medio). Para ello se utilizó un equipo llamado sistema de monitoreo de actividad respiratoria (RAMOS, por sus siglas en inglés) que mide la OTR, la tasa de transferencias de dióxido de carbono (CTR) y el cociente respiratorio (RQ) en matraces agitados en condiciones estériles mediante un sensor de oxígeno, CO₂ y un sensor de presión diferencial (Anderlei *et al.*, 2004).

Para determinar la máxima OTR alcanzada en el biorreactor a 300, 400 y 600 rpm primero se estimó el coeficiente volumétrico de transferencia de masa (k_{La}) operando el biorreactor con un volumen de trabajo de 0.5 L, a 23°C y un flujo de aire de 0.5 L/min. Se utilizó un tanque de fondo cóncavo de 1 L, con la siguiente geometría; 95 mm de diámetro interno, altura interna máxima de 200 mm, relación total altura-diámetro (H/D) de 2.0, dos deflectores y dos turbinas tipo Rushton de 6 palas de 45 mm.

Uno de los criterios de escalamiento más utilizado es el coeficiente volumétrico de transferencia de masa (k_{La}) ya que permite caracterizar la capacidad de transferencia de oxígeno de los biorreactores. Para poder usar las condiciones de aireación prevalentes en los matraces como criterio de escalamiento, fue necesario determinar el k_{La} del biorreactor empleando el método dinámico simple descrito por Doran, 2013. En un biorreactor, en cuanto el cultivo se encuentra oxigenado, en un determinado t_0 el suministro de oxígeno se detiene, en ese momento la concentración de oxígeno disuelto C_{AL} disminuirá, posteriormente el suministro de aire se reanuda y C_{AL} aumentará en función del tiempo. El nivel de oxígeno disuelto alcanzará pronto un valor en estado estacionario \bar{C}_{AL} . C_{AL1} y C_{AL2} corresponden a dos concentraciones de oxígeno medidas durante tiempos t_1 y t_2 de reoxigenación, respectivamente (Figura 1).

Haciendo una serie de cálculos obtenemos una ecuación para calcular $k_{L}a$ utilizando dos puntos como se muestra en la Figura 1.

$$k_L a = \frac{\ln \left(\frac{\bar{C}_{AL} - C_{AL1}}{\bar{C}_{AL} - C_{AL2}} \right)}{t_2 - t_1}$$

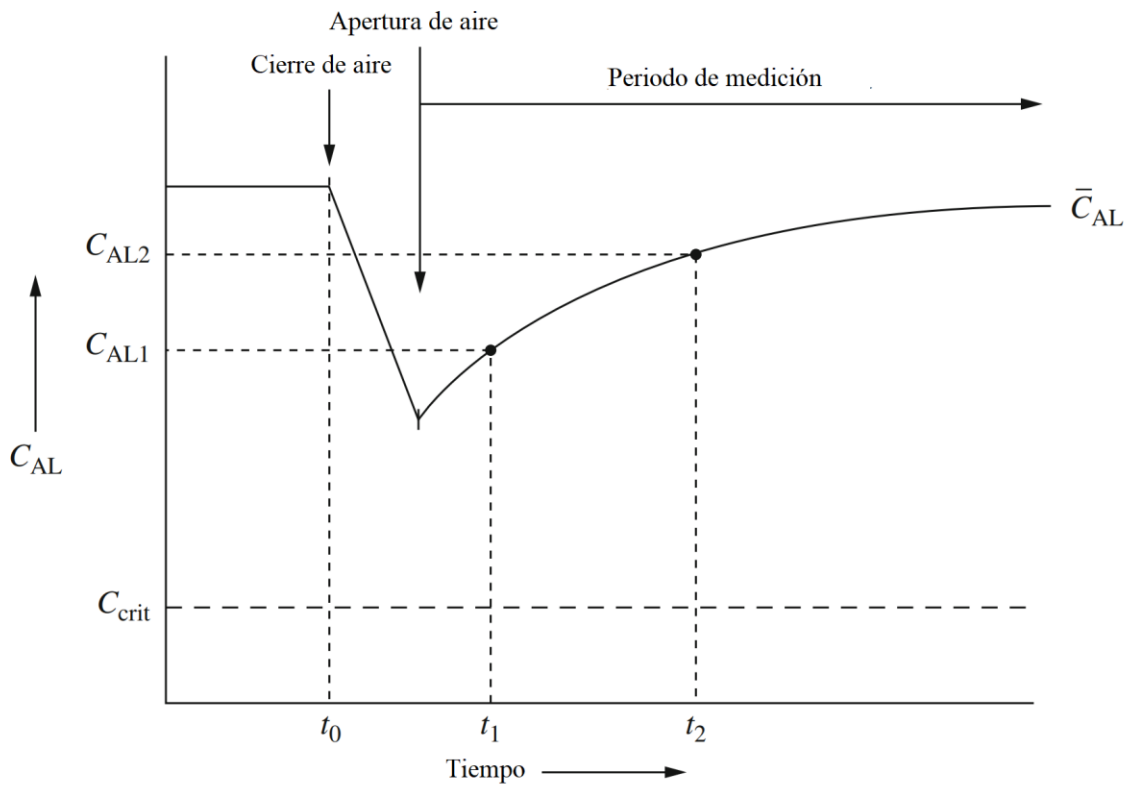


Fig. 1 Esquema del método dinámico simple para determinar $k_{L}a$. (Doran, 2013)

7.7 Identificación de los compuestos presentes en los extractos obtenidos en biorreactor mediante cromatografía de líquidos-masa

7.7.1 Extracción con solventes de las sustancias inhibitorias

Se centrifugaron a 11061 x g durante 15 min 25 mL de medio de cultivo, se retiró el sobrenadante y filtró a través de un filtro de 0.22 μm . Al extracto crudo filtrado se le agregó un volumen igual de acetonitrilo, se mezcló con vórtex durante 5 min y se centrifugó a 4800 x g durante 15 min. El sobrenadante se transfirió a un nuevo tubo cuidadosamente para evitar transferir el precipitado. Posteriormente, al sobrenadante se agregó cloroformo en una relación 1:1 volumen: volumen, se mezcló con vórtex durante 5 min, destapando cada minuto el tubo, y se centrifugó durante 15 min a 4800 x g. Se recuperó la fase acuosa (fase superior) para el análisis de cromatografía de líquidos-masa. La fase orgánica se evaporó en horno a 50°C por 3 días. Los sólidos remanentes en el tubo, se resuspendieron en etanol al 96% para su análisis cromatográfico.

Tanto la muestra de la fase acuosa como la de la fase orgánica se pasaron a través de filtros para jeringa de PTFE de 0.2 μm , se disolvieron en 250 μL de una solución compuesta de acetonitrilo con 0.2% de ácido acético. Se inyectaron 50 μL de muestra en una columna Synergi Fusion-RP 80 A, 4 μm , 150 x 4.6 mm, phenomenex a una temperatura de 35°C con una fase móvil A: H₂O con 0.2% ácido acético; B: acetonitrilo con 0.2% ácido acético a un flujo de 1 mL/min. El gradiente de elución fue de 0-5 min 10% B, 5-25 min 10-90% B, 25-30 min 90% B, 30-35 min 10% B. Se utilizó un equipo HPLC Agilent con detector de arreglo de diodos DAD y detector de masas Agilent, mediante la técnica cromatografía de líquidos HPLC QToF-MS.

8. RESULTADOS

8.1 Ensayos de agar en doble capa usando *P. protegens* EMM-1 como cepa productora

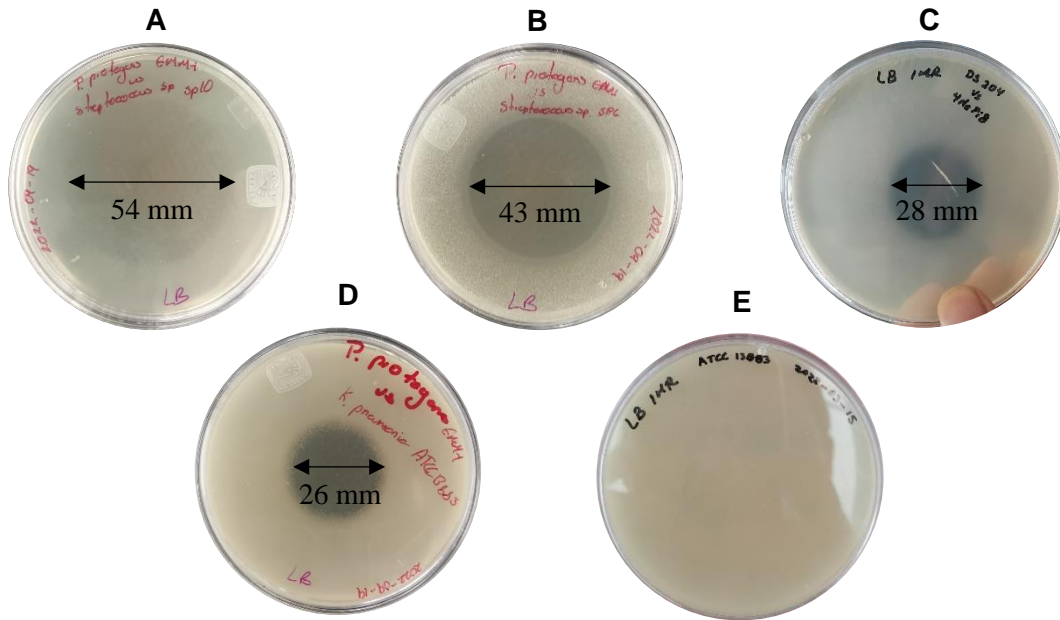


Fig. 2 Antagonismo por método de agar en doble capa. Usando como cepa sensible: A. *Streptococcus* sp. SP10. B. *Streptococcus* sp. SP6. C. Cepa metilotrófica 4mePi8. D. *K. pneumoniae* ATCC13883. E. Control negativo.

Para estar seguros de que la cepa *P. protegens* EMM-1 que recibimos era la correcta, se decidió corroborar su capacidad antagónica (Figura 2). Las cuatro cepas evaluadas fueron sensibles ante los metabolitos producidos por *P. protegens* EMM-1, siendo el aislado clínico *Streptococcus* sp. SP10 (Figura 2A) la que mayor sensibilidad mostró, con un halo inhibición de 54 mm, sin embargo, la cepa SP6 mostró mayor densidad celular a las 24 h en comparación con SP10 haciendo más perceptible el halo de inhibición (Figura 2B), por lo que se decidió realizar los ensayos posteriores con la cepa SP6. *K. pneumoniae* ATCC 13883 tuvo la menor sensibilidad con un halo de 26 mm (Figura 2D), lo que concuerda con los resultados reportados por (Cesa-Luna, 2016). Los resultados de nuestros ensayos fueron obtenidos a las 72 horas de incubación de la cepa productora. Una vez confirmada la capacidad antagónica de *P. protegens* EMM-1, se evaluó si la aireación (manipulando el volumen de llenado), temperatura o la fuente de carbono afectaban la densidad celular.

8.2 Monitoreo del crecimiento

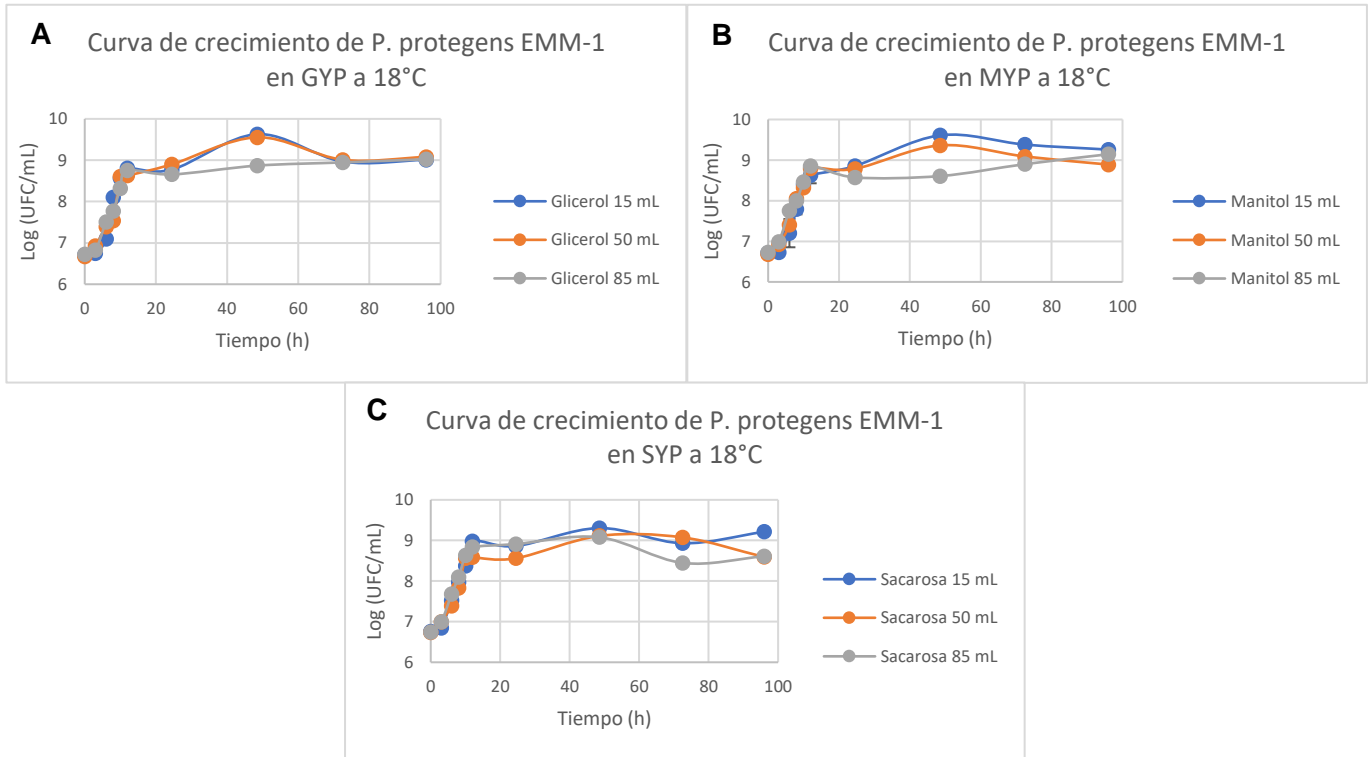


Fig. 3 Curvas de crecimiento de *P. protegens* EMM-1 a 18°C. Crecimiento de la cepa EMM-1 en medio con A. glicerol, B. manitol y C. sacarosa.

En la Figura 3 se muestran las curvas de crecimiento de la cepa EMM-1 expresado en logaritmos de las UFC/mL de un experimento único con tres replicas técnicas para cada tiempo en cada medio de cultivo (GYP, MYP y SYP) durante 96 horas. El máximo punto del crecimiento exponencial se observó a las 12 horas en todos los medios de cultivo a 18°C alcanzando un promedio de 6.2×10^8 UFC/mL para todos los casos. Ni el crecimiento exponencial, ni la densidad celular final se vio afectada por el medio de cultivo o el volumen de llenado (aireación). En el caso de las bacterias crecidas a 28°C, su crecimiento exponencial comienza a cesar entre las 6 y 8 horas de incubación con una densidad celular promedio de 3.8×10^8 UFC/mL (Figura 4). Ni el crecimiento exponencial, ni la densidad celular final se vio afectada por el medio de cultivo o el volumen de llenado (aireación).

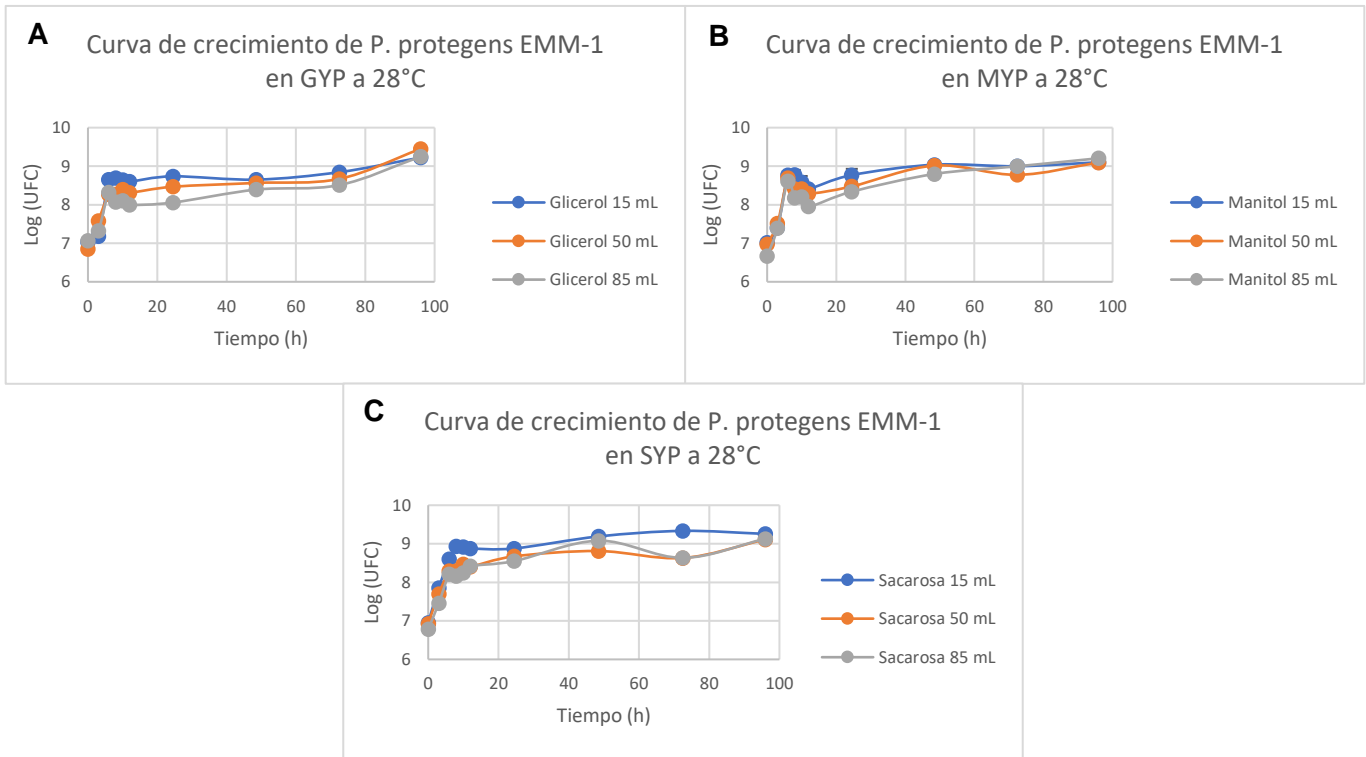


Fig. 4 Curvas de crecimiento de *P. protegens* EMM-1 a 28°C. Crecimiento de la cepa EMM-1 en medio con A. glicerol, B. manitol y C. sacarosa.

El crecimiento de la cepa EMM-1 en los tres medios de cultivo utilizados, a 23°C y con 50 mL de volumen de llenado no mostró diferencia significativa, a excepción del cultivo en medio con sacarosa, el cual, a las 72 y 96 horas presentó una disminución en la concentración celular en comparación con el cultivo realizado con glicerol. Las velocidades específicas de crecimiento fueron de $0.590 \pm 0.013 \text{ h}^{-1}$, $0.635 \pm 0.053 \text{ h}^{-1}$ y $0.585 \pm 0.042 \text{ h}^{-1}$ para glicerol, manitol y sacarosa, respectivamente. Los datos se obtuvieron con tres réplicas experimentales y tres replicas técnicas cada una (Figura 5).

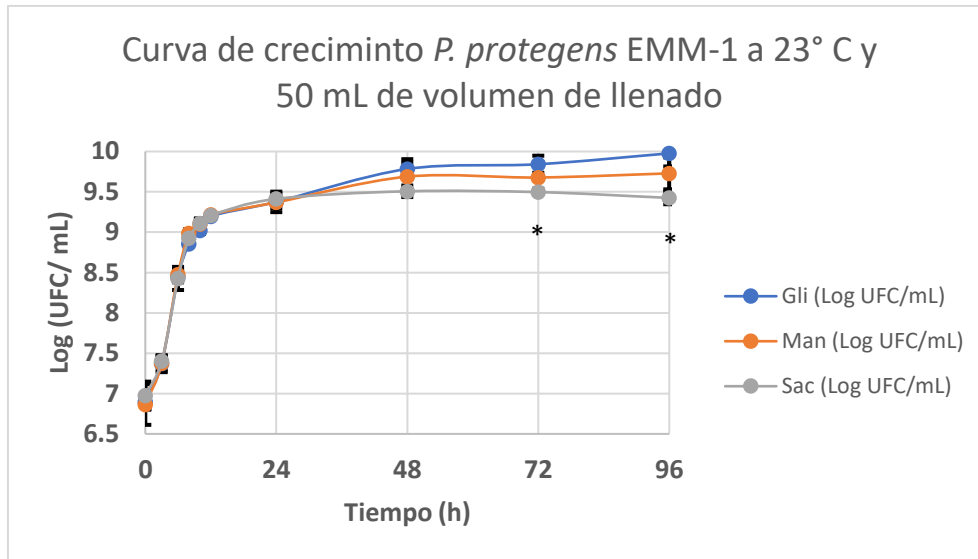


Fig. 5 Curva de crecimiento a 23°C y 50 mL de volumen de llenado. Los ensayos se realizaron por triplicado. (*, $P < 0.05$ Para medio con glicerol y sacarosa en 72 y 96 h).

8.3 Monitoreo de la actividad inhibitoria por el método de difusión en pozo

Durante los ensayos de difusión en pozo se obtuvieron dos tipos de halos de inhibición, unos difusos donde aún se podía observar crecimiento de la cepa sensible en la zona del halo (Figura 6B) y otros fueron halos claros, totalmente transparentes (Figura 7), sólo estos últimos se consideraron como resultados positivos y fueron los que se utilizaron para el cálculo de unidades de actividad inhibitoria.

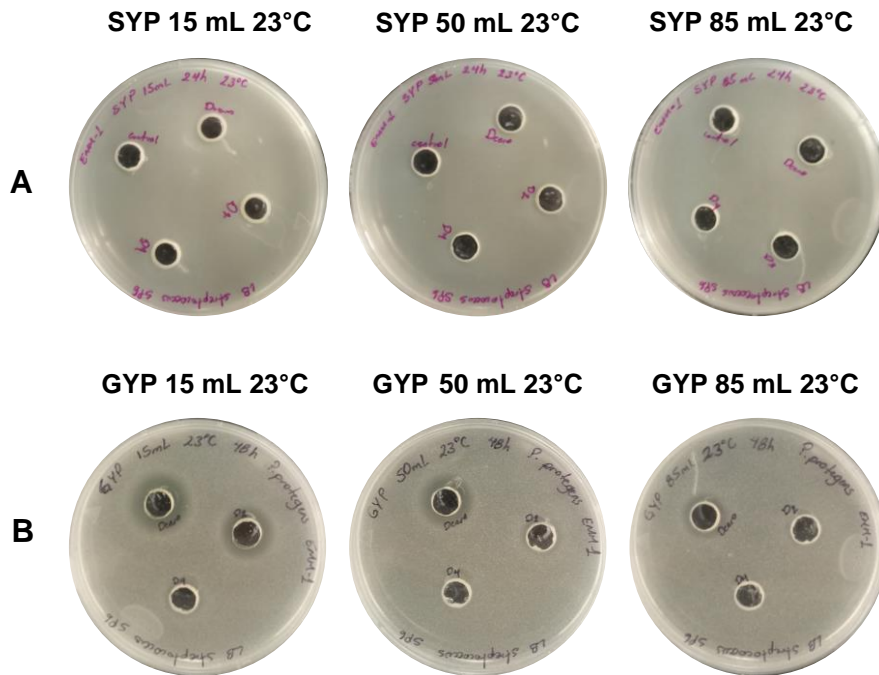


Fig. 6 Resultados negativos en ensayo de difusión en pozo. A) Ensayos realizados en medio SYP a 23°C con distintos volúmenes de llenado, no se observa halo de inhibición. B) Ensayos realizados en medio GYP a 23°C con distintos volúmenes de llenado, se observan halos difusos que se reportan como actividad inhibitoria negativa.

Los radios de los halos de inhibición se midieron a partir de la pared del pozo hasta la última zona trasparente del halo claro para obtener las UA·mm/mL siguiendo la formula:

$$\frac{UA \cdot mm}{mL} = \frac{dilución}{volumen de muestra (mL)} * radio del halo (mm)$$

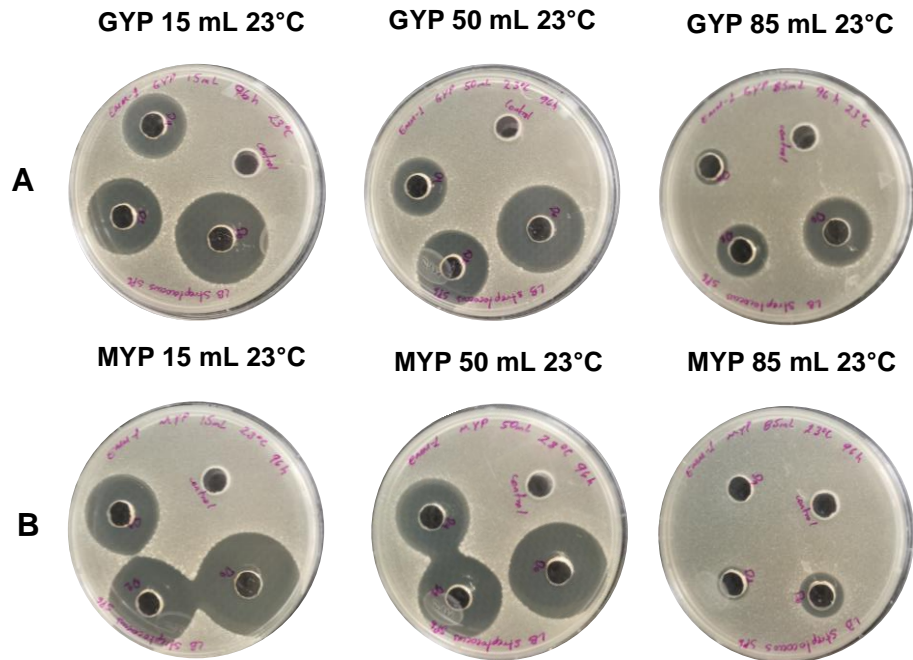


Fig. 7 Resultados positivos en ensayo de difusión en pozo. A) Ensayos realizados en medio GYP a 23°C en distintos volúmenes de llenado, se observan halos claros que se reportan como actividad inhibitoria positiva. B) Ensayos realizados en medio MYP a 23°C en distintos volúmenes de llenado, se observan halos claros que se reportan como actividad inhibitoria positiva.

Los resultados de los ensayos de difusión en pozo se expresaron en unidades arbitrarias (UA·mm/mL). En los ensayos realizados en medio SYP no hubo presencia de halos observables, ni difusos, por lo que se decidió no hacer figuras de estos resultados.

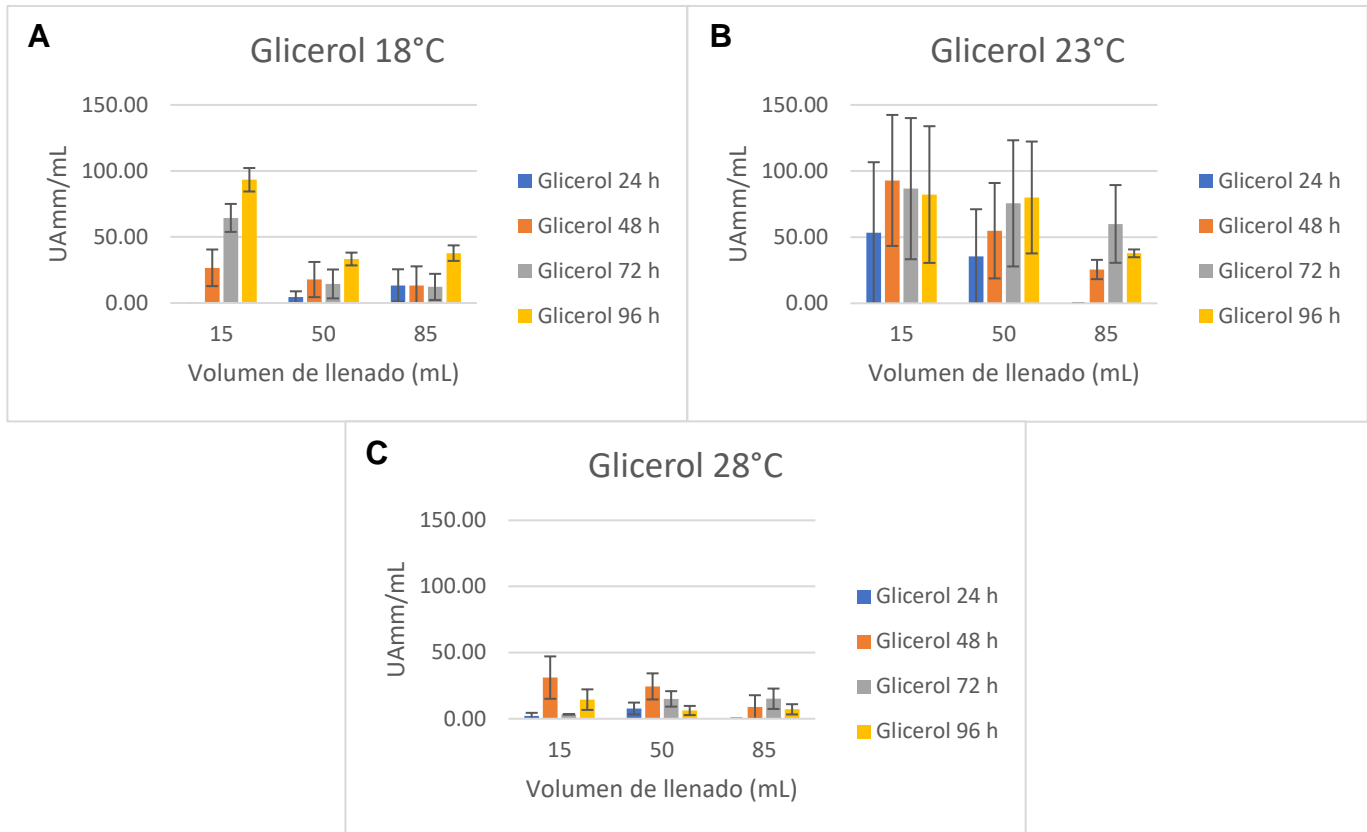


Fig. 8 Unidades arbitrarias de los ensayos en medio GYP a distintas temperaturas y volúmenes de llenado. A) Ensayos en medio GYP a 18 °C, B) 23°C y C) 28°C. Los ensayos se realizaron por triplicado, las barras de error muestran el error estándar de la media.

Los mismos ensayos de actividad antimicrobiana fueron realizados en medio MYP (Figura 9), se observó que el volumen de llenado 15 mL, en temperaturas de 18 y 23°C presentaba mayores halos de inhibición en comparación con sus respectivos volúmenes de llenado en medio GYP, sin embargo, a 28°C los valores fueron similares en todos los volúmenes de llenado.

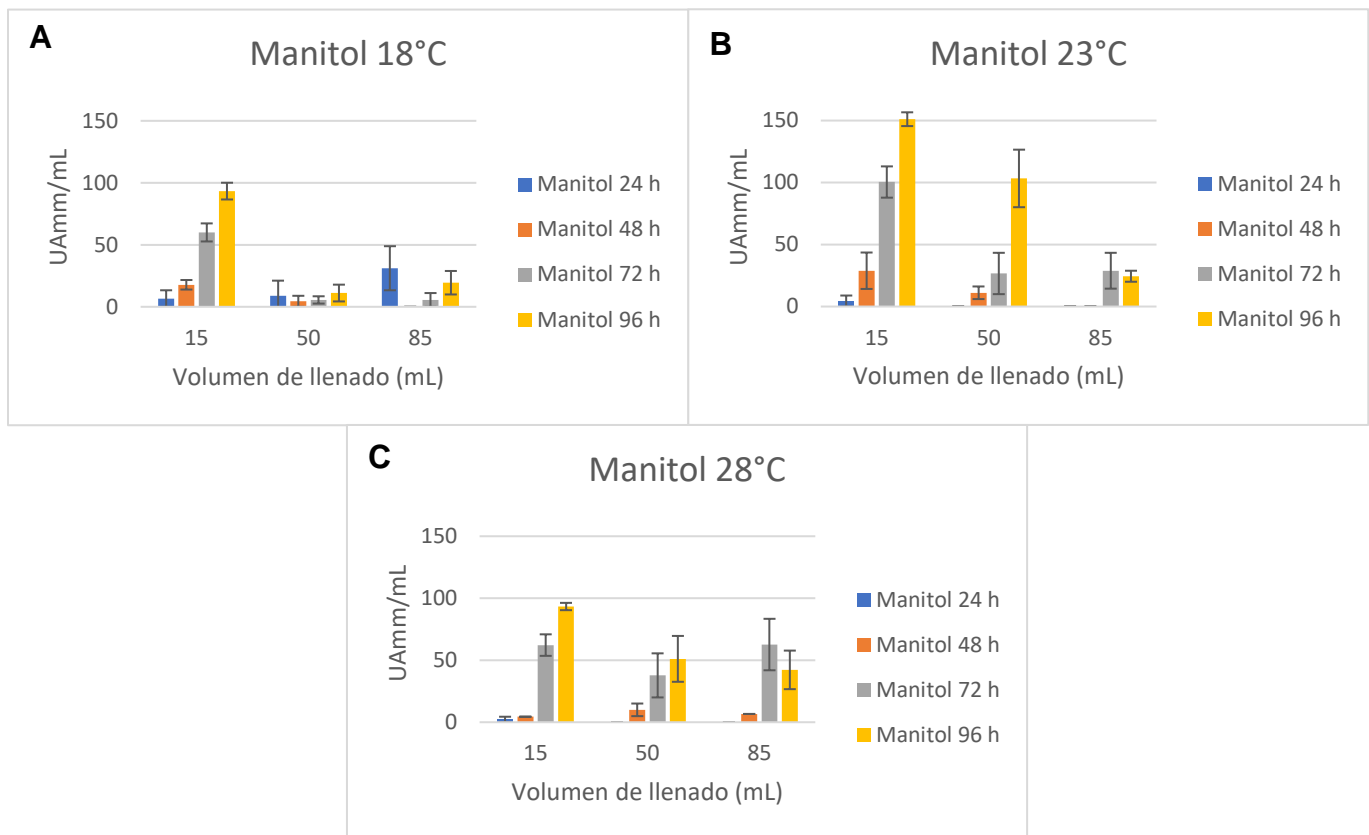


Fig. 9 Unidades arbitrarias de los ensayos en medio MYP a distintas temperaturas y volúmenes de llenado. A) Ensayos en medio MYP a 18 °C, B) 23°C y C) 28°C. Los ensayos se realizaron por triplicado, las barras de error indican el error estándar de la muestra.

8.4 Diseño factorial 3²

En los resultados del diseño de experimentos para MYP (Anexo Figuras A1, A2, A3 Y A4), se observó que solo fue significativo el factor volumen de llenado en la producción de metabolitos inhibitorios expresados en UA·mm/mL ($P \leq 0.05$) a las 48 y 96 horas de cultivo.

El diseño factorial 3² tiene 2 factores (temperatura y volumen de llenado), cada factor con tres niveles (alto, medio y bajo), obteniendo un total de 9 experimentos diferentes. Al utilizar el medio de cultivo con glicerol, a las 24 horas de cultivo, ninguno de los factores en ningún nivel fue significativo ($P < 0.05$) (Figura 10A), aunque la gráfica de interacción mostró

que los volúmenes de llenado de 15 y 50 mL a 23°C presentaban los valores más altos de la actividad inhibitoria contra la cepa SP6 expresada en UA·mm/mL (Figura 10B).

A

Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Modelo	8	8578	1072.2	0.74	0.654
Lineal	4	4790	1197.6	0.83	0.523
Temperatura	2	3780	1890.2	1.31	0.294
Vol de llenado	2	1010	504.9	0.35	0.709
Interacciones de 2 términos	4	3788	946.9	0.66	0.630
Temperatura*Vol de llenado	4	3788	946.9	0.66	0.630
Error	18	25963	1442.4		
Total	26	34541			

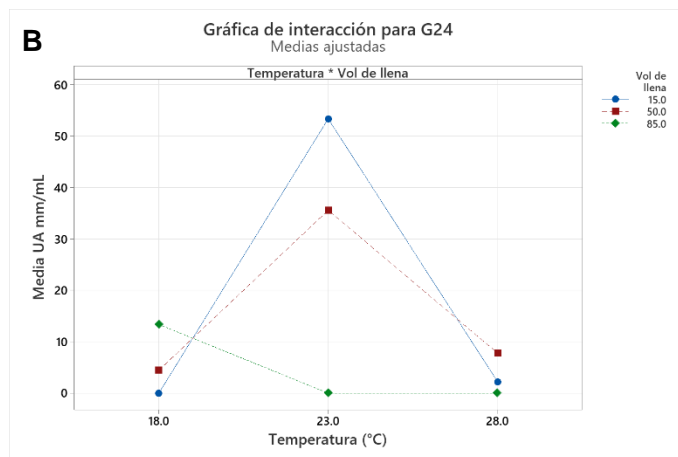


Fig. 10 Estadística para los ensayos en medio con glicerol a las 24 h de cultivo. A) Análisis de varianza de los factores temperatura y volumen de llenado. El valor de $P < 0.05$ es significativo. B) Grafica de interacción entre la temperatura y el volumen de llenado, el resultado se muestra en UA·mm/mL.

El resultado de los ensayos a las 48 horas de cultivo fue similar al de las 24 h. Aunque el factor temperatura tuvo el menor valor de P , no fue estadísticamente significativo. La gráfica de interacción mostró que el volumen de 15 mL y a una temperatura de 23°C se alcanzaba una actividad inhibitoria de 92.89 UA·mm/mL (Figura 11B).

A

Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Modelo	8	16313	2039.2	1.23	0.336
Lineal	4	13714	3428.6	2.07	0.127
Temperatura	2	8419	4209.3	2.55	0.106
Vol de llenado	2	5296	2647.9	1.60	0.229
Interacciones de 2 términos	4	2599	649.8	0.39	0.811
Temperatura*Vol de llenado	4	2599	649.8	0.39	0.811
Error	18	29769	1653.8		
Total	26	46082			

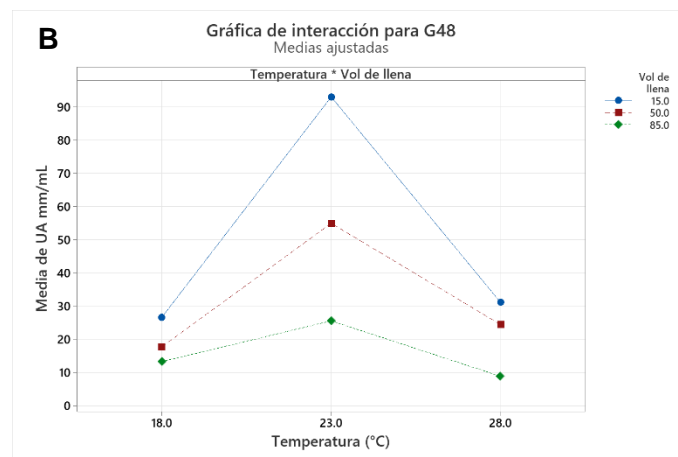


Fig. 11 Estadística para los ensayos en medio con glicerol a las 48 h de cultivo. A) Análisis de varianza de los factores temperatura y volumen de llenado. El valor de $P < 0.05$ es significativo. B) Grafica de interacción entre la temperatura y el volumen de llenado, el resultado se muestra en UA·mm/mL.

A las 72 horas de cultivo con glicerol, el análisis de varianza mostró que el factor temperatura es significativo para la producción de sustancias inhibitorias (Figura 12A) y la gráfica de interacción (Figura 12B) indicó que a 23°C y 15 mL son las condiciones en las que más UA·mm/mL se producen.

A Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Modelo	8	25301	3163	1.36	0.278
Lineal	4	21138	5285	2.27	0.101
Temperatura	2	18718	9359	4.02	0.036
Vol de llenado	2	2420	1210	0.52	0.603
Interacciones de 2 términos	4	4163	1041	0.45	0.773
Temperatura*Vol de llenado	4	4163	1041	0.45	0.773
Error	18	41859	2325		
Total	26	67159			

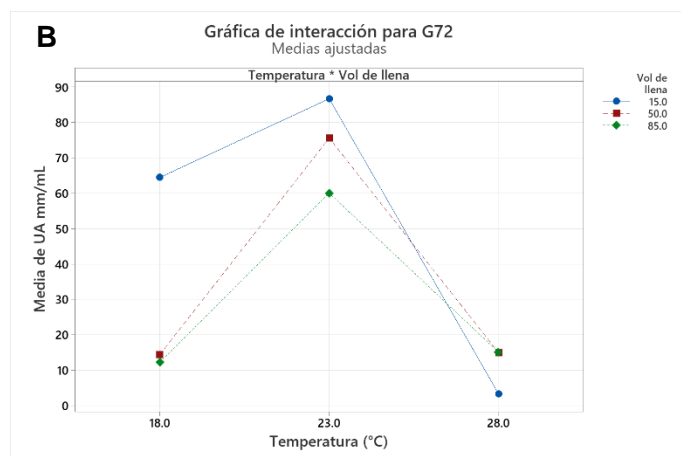


Fig. 12 Estadística para los ensayos en medio con glicerol a las 72 h de cultivo. A) Análisis de varianza de los factores temperatura y volumen de llenado. El valor de $P < 0.05$ es significativo. B) Gráfica de interacción entre la temperatura y el volumen de llenado, el resultado se muestra en UA·mm/mL.

En la hora 96 de tiempo de cultivo se observó que la temperatura también fue un factor significativo en la producción de sustancias inhibitorias y con la gráfica de interacción la temperatura de 18°C y 15 mL de volumen de llenado fueron las mejores condiciones de cultivo obteniendo 93.33 UA·mm/mL (Figura 13).

A Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Modelo	8	27126	3391	1.63	0.184
Lineal	4	22482	5621	2.71	0.063
Temperatura	2	16535	8267	3.98	0.037
Vol de llenado	2	5948	2974	1.43	0.265
Interacciones de 2 términos	4	4643	1161	0.56	0.695
Temperatura*Vol de llenado	4	4643	1161	0.56	0.695
Error	18	37369	2076		
Total	26	64495			

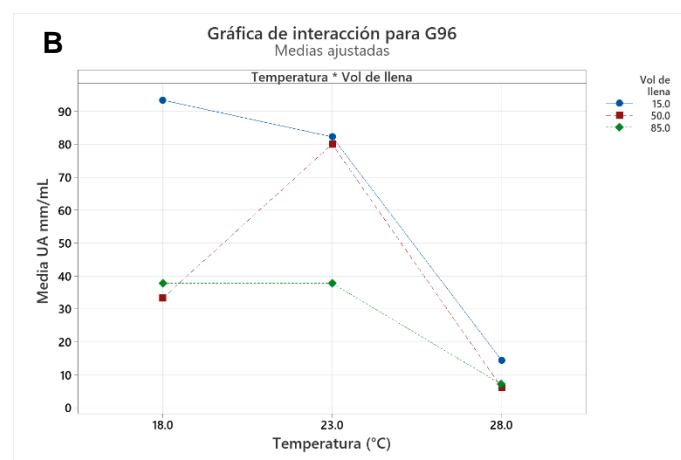


Fig. 13 Estadística para los ensayos en medio con glicerol a las 96 h de cultivo. A) Análisis de varianza de los factores temperatura y volumen de llenado. El valor de $P < 0.05$ es significativo. B) Gráfica de interacción entre la temperatura y el volumen de llenado, el resultado se muestra en UA·mm/mL.

En las primeras 48 horas de cultivo en medio GYP estadísticamente ningún factor fue determinante para la producción de sustancias inhibitorias. A las 72 y 96 horas de cultivo la temperatura sí tuvo un efecto significativo en la producción de las sustancias inhibitorias, siendo la temperatura de 23°C la que más actividad presentó en la mayoría de los volúmenes de llenado.

8.5 Cultivos de *Pseudomonas protegens* EMM-1 en biorreactor

8.5.1 OTR de los cultivos

Con el objetivo de escalar la producción de los compuestos inhibitorios para su futura identificación y purificación se procedió al cultivo en biorreactor, para esto fue necesario conocer distintos parámetros requeridos como la temperatura óptima de crecimiento y producción de metabolitos inhibitorios, así como la oxigenación que requiere el cultivo. Para el caso del medio de cultivo con glicerol (GYP), la temperatura óptima fue 23°C. Y aunque la oxigenación (volumen de llenado) no tuvo efecto significativo en la actividad antimicrobiana en las condiciones evaluadas, se decidió escalar la producción de matraz a biorreactor considerando la oxigenación prevalente en los volúmenes de llenado de 15 y 50 mL. Para lograr esto último la velocidad de transferencia de oxígeno (OTR) en matraces fue indispensable conocerla.



Fig. 14 Equipo RAMOS. Ensayos realizados con *P. protegens* EMM-1 a 23°C y 100 rpm.

Los resultados de experimentos realizados en el equipo RAMOS (Figura 14) llevados a cabo a 100 rpm y 23°C en medio GYP y MYP indicaron que con volúmenes de llenado pequeños se alcanza una mayor OTR, en los matraces llenados con 15 mL de medio de cultivo se obtuvo una OTR máxima de 7.6 mmol/L/h en GYP (Figura 15A) y 8.25 mmol/L/h en MYP (Figura 16A), mientras que en los matraces llenados con 85 mL solamente se obtuvo una OTR máxima de 2.06 mmol/L/h en GYP (Figura 15C) y 3.04 mmol/L/h en MYP (Figura 16C), lo que tiene sentido ya que, por la naturaleza cónica de los matraces, la distancia entre la fase gaseosa y el seno del líquido es menor y el área de contacto entre la superficie del líquido y el aire es mayor con volúmenes de llenado pequeños propiciando una mayor oxigenación al medio. Considerando los resultados de la Figura 12B y 15A-B, se decidió operar el reactor con una velocidad de transferencia de oxígeno (OTR) cerca a los 8 mmol/L/h.

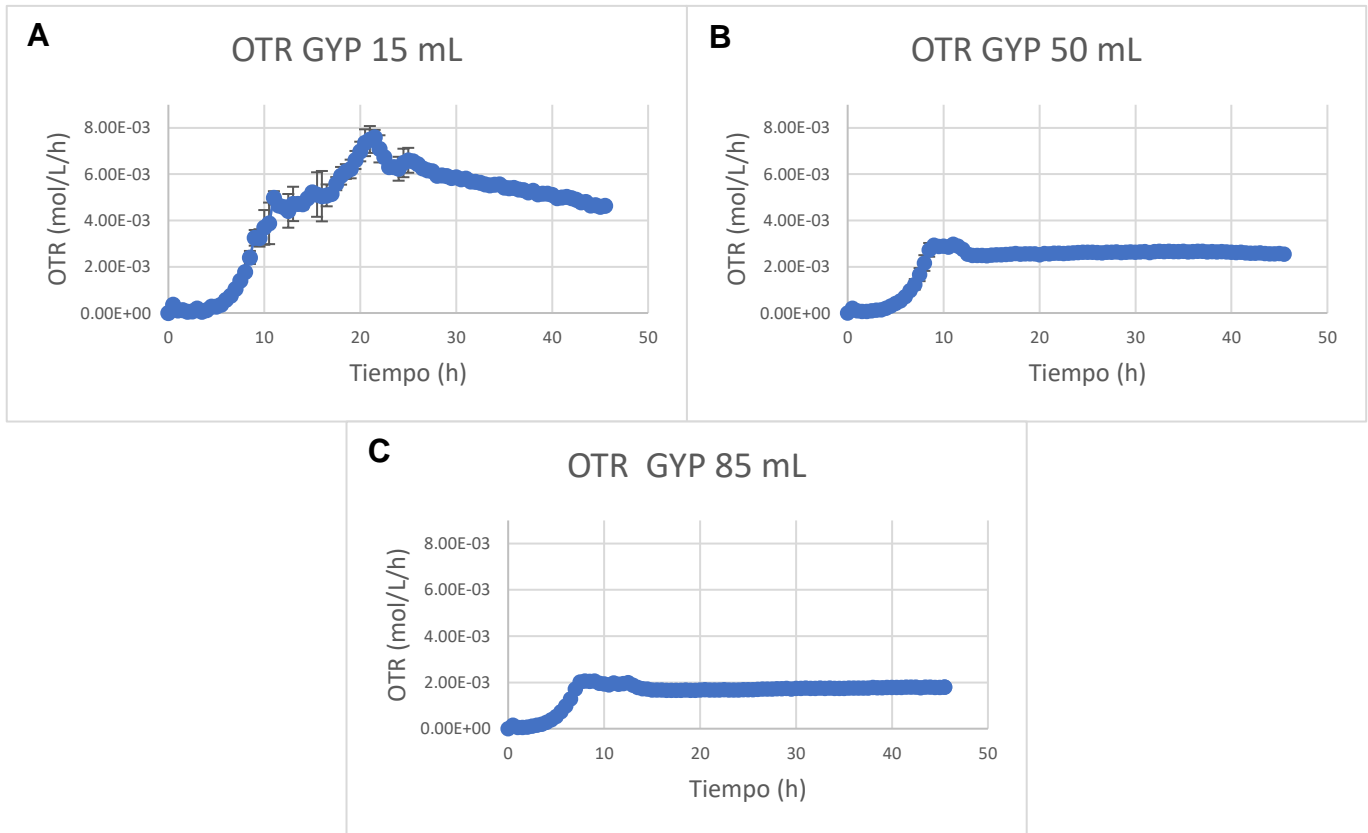


Fig. 15 OTR en medio GYP a 23°C y 100 rpm. Los ensayos indicaron una mayor OTR en matraces con menor volumen de llenado. Los ensayos se realizaron por duplicado. Las barras de error indican la desviación estándar de las muestras.

Teniendo los datos de la OTR y temperatura donde se obtuvo mayor UA·mm/mL en matraces, se procedió a determinar las condiciones de agitación en el biorreactor que provean OTR similares a las obtenidas en los matraces con volúmenes de llenado de 15 mL. Se decidió evaluar los valores de k_{La} obtenidos con 300, 400 y 600 rpm, como un primer acercamiento, con un flujo constante de 0.5 L/min de aire suministrado al biorreactor para posteriormente con el k_{La} calcular la OTR esperada en el biorreactor. Todos los ensayos en biorreactor se evaluaron en medio GYP a 23°C.

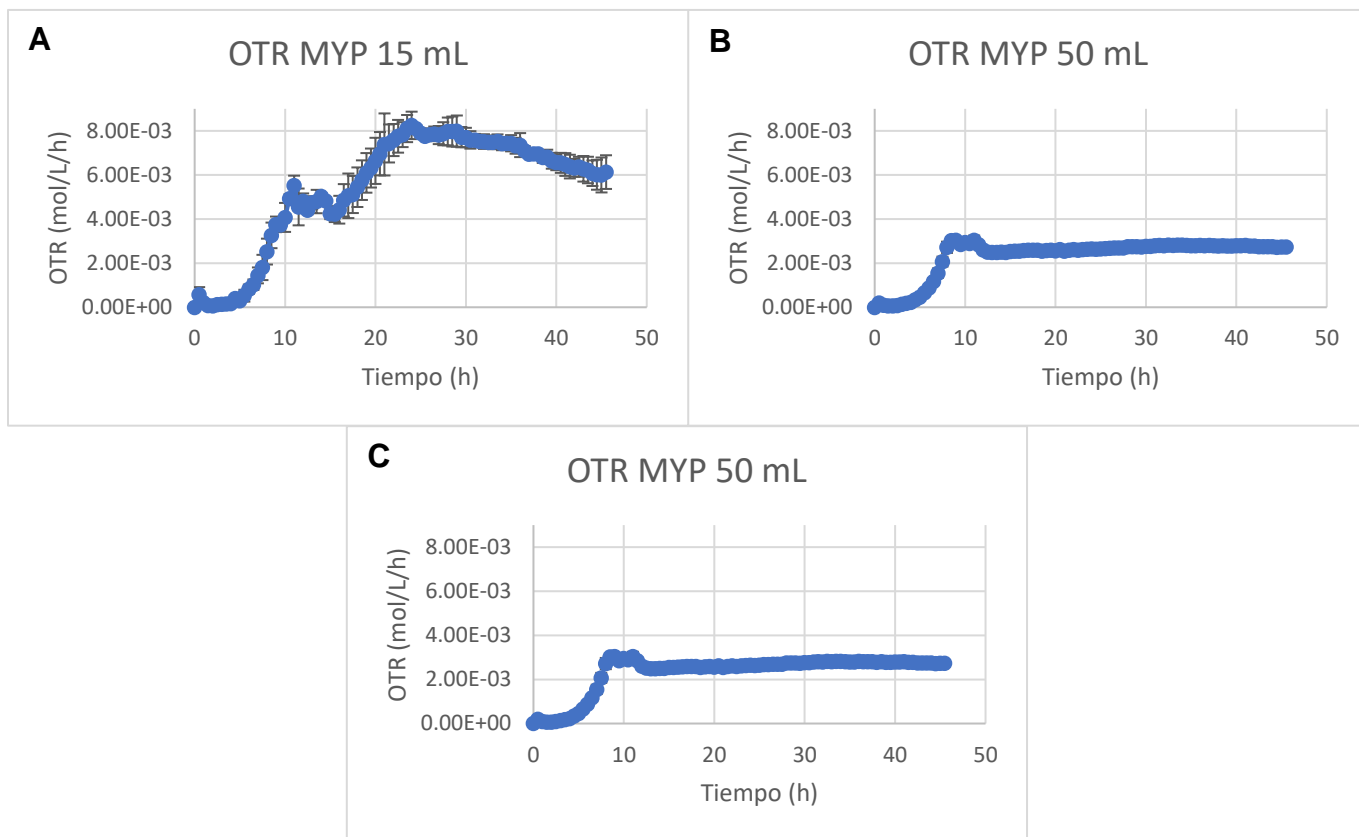


Fig. 16 OTR en medio MYP a 23°C y 100 rpm. Los ensayos indicaron una mayor OTR en matraces con menor volumen de llenado. Los ensayos se realizaron por duplicado. Las barras de error indican la desviación estándar de las muestras.

8.5.2 Determinación de $k_L a$ en biorreactor

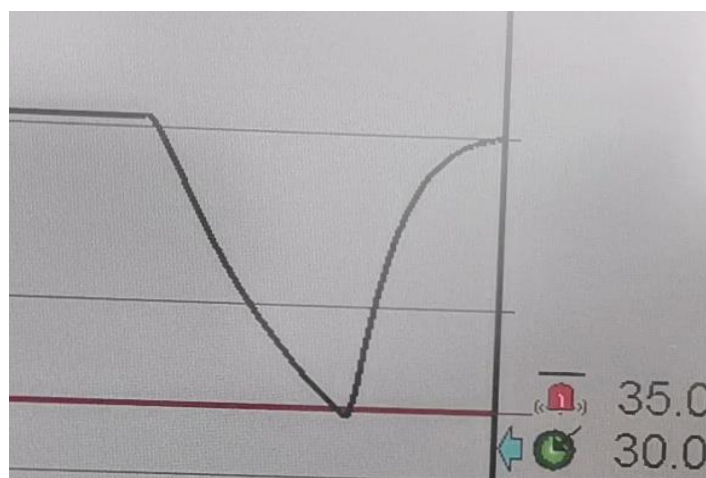


Fig. 17 Gráfico tomado del biorreactor obtenido al detener el suministro de aire y reconectándolo posteriormente.

Con los datos obtenidos del biorreactor al detener el suministro de aire y posteriormente reconectarlo (Figura 17) se realizaron unos gráficos para determinar $k_L a$ (Figura 18) utilizando la siguiente fórmula:

$$k_L a = \frac{\ln\left(\frac{\bar{C}_{AL} - C_{AL1}}{\bar{C}_{AL} - C_{AL2}}\right)}{t_2 - t_1}$$

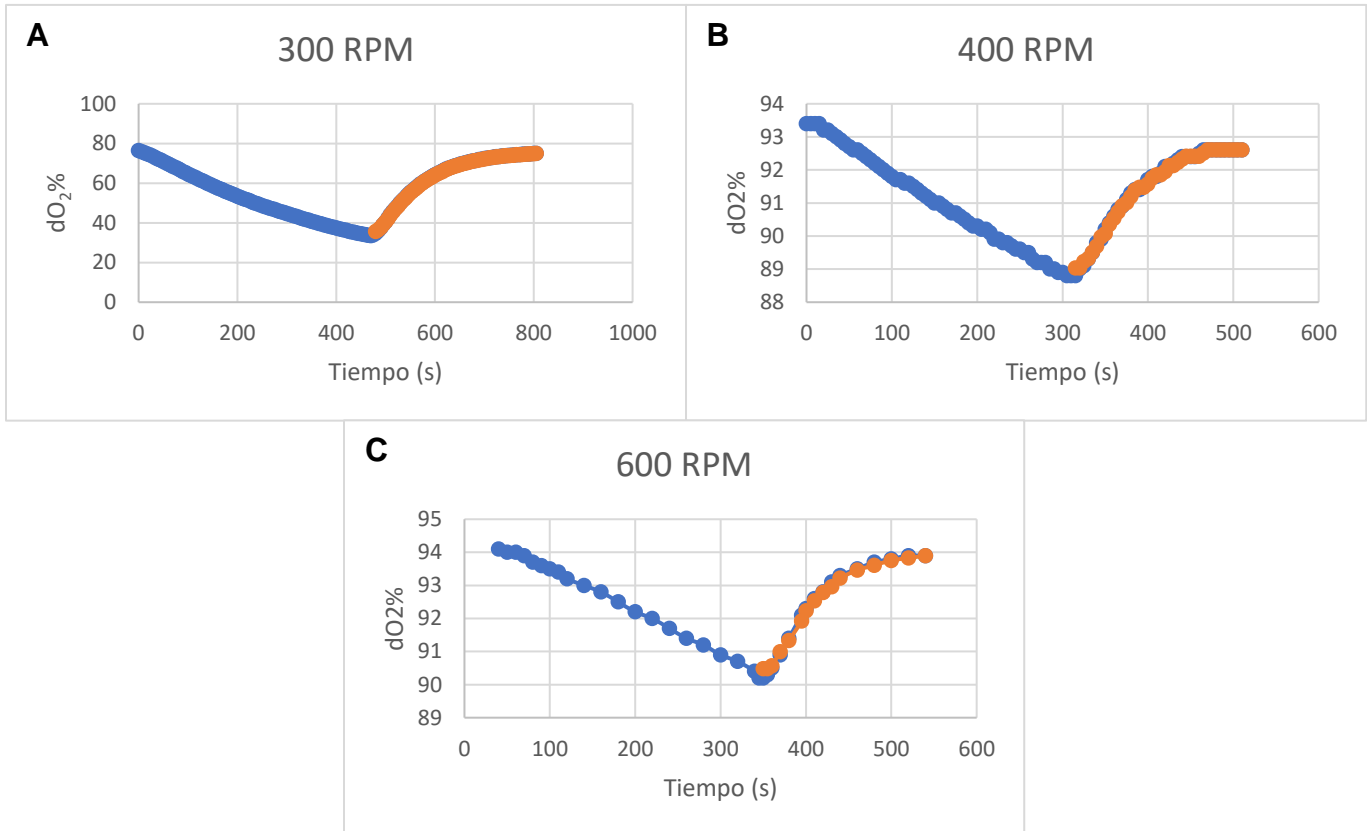


Fig. 18 Gráficos obtenidos a partir de los datos del biorreactor con agitaciones de: A) 300 rpm, B) 400 rpm y C) 600 rpm.

Los valores de $k_L a$ para el cultivo en medio GYP obtenidos fueron los siguientes: 32.11 h⁻¹ para agitación de 300 rpm, 46.12 h⁻¹ para agitación de 400 rpm y 56.20 h⁻¹ para agitación de 600 rpm. Con estos valores de $k_L a$ se procedió a calcular las OTR máximas que se podrían obtener en el biorreactor a dichas velocidades de agitación.

8.5.3 OTR máximas a distintas velocidades de agitación en biorreactor

Para poder conocer la velocidad de transferencia de oxígeno en un biorreactor se utiliza la siguiente ecuación:

$$OTR = k_L a (C_{AL}^* - C_{AL})$$

Donde $(C_{AL}^* - C_{AL})$ es la fuerza impulsora de la transferencia de oxígeno. C_{AL}^* es la solubilidad del oxígeno en el medio de cultivo, C_{AL} es la concentración de oxígeno disuelto en el medio y $k_L a$ es el coeficiente volumétrico de transferencia de masa. La OTR máxima en un biorreactor se alcanza cuando C_{AL} es igual a 0, por lo que la ecuación de OTR máxima sería la siguiente:

$$OTR_{max} = k_L a * C_{AL}^*$$

Para conocer OTR_{max} es necesario determinar el valor de C_{AL}^* . En este estudio se utilizó la solubilidad del oxígeno en agua a una temperatura de 23°C que fue la temperatura de trabajo de los experimentos en biorreactor.

Mediante la Ley de Henry se puede calcular la solubilidad del oxígeno en un líquido a través de la siguiente fórmula:

$$p_{AG} = p_T y_{AG} = H C_{AL}^*$$

Donde p_{AG} es la presión parcial del oxígeno en el aire, p_T es la presión total del aire; en la ciudad de Puebla la presión del aire es de 0.79 atm, y_{AG} es la fracción molar del oxígeno en el aire; según las “*International Critical Tables*” es de 0.2099, H es la constante de Henry; teniendo un valor de $0.746 \text{ m}^3 \cdot \text{atm} \cdot \text{gmol}^{-1}$ a 23°C y C_{AL}^* es la solubilidad del oxígeno en el medio.

Despejando C_{AL}^* obtenemos:

$$C_{AL}^* = \frac{p_T y_{AG}}{H}$$

Sustituyendo los valores tenemos:

$$C_{AL}^* = \frac{(0.79 \text{ atm})(0.2099)}{0.746 \frac{\text{m}^3 \text{ atm}}{\text{gmol}}} = 0.2222 \frac{\text{gmol}}{\text{m}^3} = 0.2222 \frac{\text{mmol}}{\text{L}}$$

Ahora ya podemos utilizar la fórmula de OTR_{max} planteada anteriormente con los valores de k_{LA} obtenidos a diferentes velocidades de agitación y el valor de C_{AL}^* .

Para 300 rpm:

$$OTR_{max} = \frac{32.1117}{h} \left(0.2222 \frac{\text{mmol}}{\text{L}} \right) = 7.1 \frac{\text{mmol}}{\text{L} * h}$$

Para 400 rpm:

$$OTR_{max} = \frac{46.1294}{h} \left(0.2222 \frac{\text{mmol}}{\text{L}} \right) = 10.2 \frac{\text{mmol}}{\text{L} * h}$$

Para 600 rpm:

$$OTR_{max} = \frac{56.2091}{h} \left(0.2222 \frac{\text{mmol}}{\text{L}} \right) = 12.5 \frac{\text{mmol}}{\text{L} * h}$$

8.5.4 Ensayos en biorreactor

Con la velocidad de agitación de 300 rpm en el biorreactor se obtuvo una OTR máxima de 7.1 mmol/L/h, lo cual es muy cercano a la OTR máxima de los matraces llenados con 15 mL de medio (7.6 mmol/L/h). A las 48 y 72 horas de cultivo en biorreactor operado con 300 rpm, se obtuvieron 54 y 67 UA·mm/mL (Figura 19). Dichos valores de actividad

fueron similares a los obtenidos en matraz a las 48 y 72 horas, los cuales fueron 55 y 75 UA·mm/mL para el volumen de 15 mL.

En la Figura 19 se observan los valores de actividad inhibitoria obtenidos por triplicado probando las tres velocidades de agitación propuestas, a las 24 y 48 horas de cultivo los valores de actividad fueron más grandes a 400 rpm, es decir, con una OTR_{max} de 10.2 mmol/L·h se obtiene mayor actividad antimicrobiana en el biorreactor que cuando se opera a una OTR máxima de 7.1 mmol/L/h. Lo que indica que, posiblemente, una mejor oxigenación promueve la producción de mayor actividad antimicrobiana, sin embargo, observamos que también un exceso en la oxigenación es perjudicial para esta producción ya que a 600 rpm (OTR_{max} de 12.5 mmol/L·h) se produjeron valores de actividad más pequeños durante los 3 días ensayados en biorreactor.

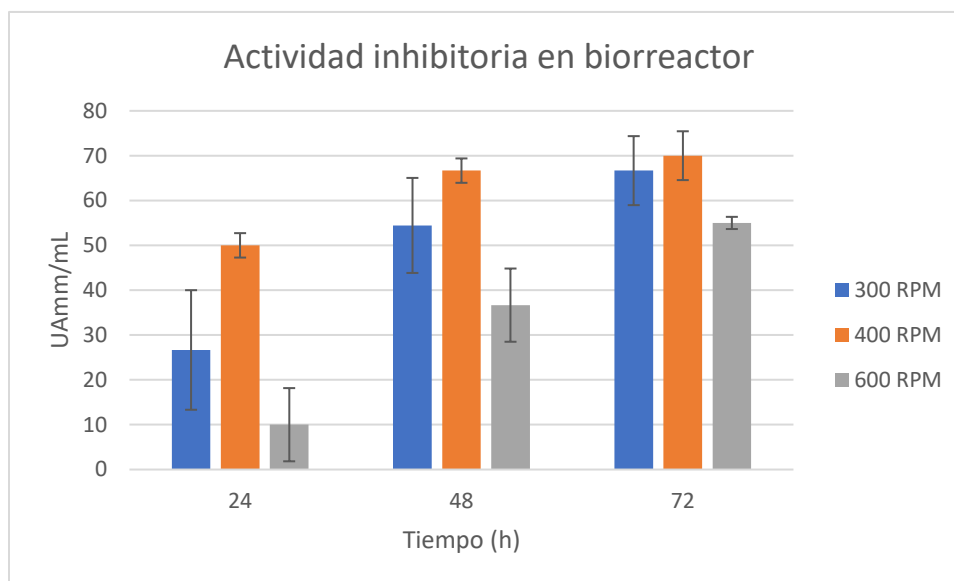


Fig. 19 Actividad inhibitoria reportada en biorreactor a 23°C en medio GYP a 300, 400 y 600 rpm. Los ensayos se realizaron por triplicado. Las barras de error indican el error estándar de la muestra.

8.6 Identificación de los compuestos presentes en los extractos obtenidos en biorreactor mediante cromatografía de líquidos-masa

8.6.1 Extracción con solventes de las sustancias inhibitorias

La extracción se realizó a partir del cultivo en biorreactor en medio GYP a 23°C, 400 rpm y con 72 horas de cultivo, el caldo obtenido poseía un color amarillento que bajo luz ultravioleta se observaba fluorescente, característico en varias especies de *Pseudomonas* (Figura 20).

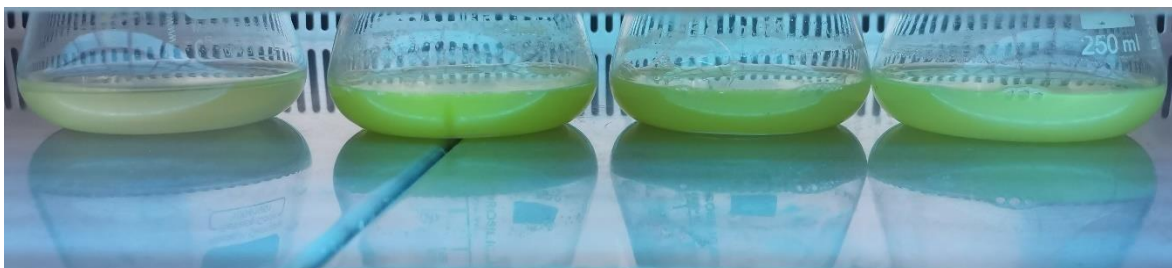


Fig. 20 Fluorescencia de cultivos de *P. protegens* EMM-1 bajo luz ultravioleta. A la izquierda se observa el medio de cultivo sin inocular, seguido de 3 matraces inoculados con la cepa EMM-1 e incubados durante 72 horas.

Dos fases fueron obtenidas de la extracción con cloroformo y acetonitrilo, una fase acuosa de color amarillento (Figura 21A) y otra orgánica de color transparente (Figura 21B), inicialmente, por la característica de color amarillento y fluorescente de los compuestos fenazínicos reportados en la literatura que tienen capacidad antimicrobiana y antifúngica y que son producidos por el género *Pseudomonas* se decidió iniciar con el análisis cromatográfico de la fase acuosa ya que, posiblemente, estos compuestos estarían siendo producidos por la cepa EMM-1.

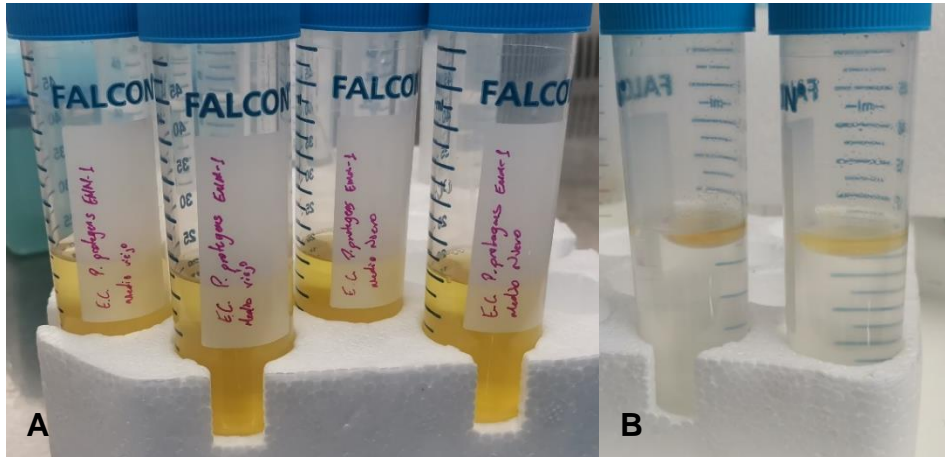


Fig. 21 Fases obtenidas de las extracciones con solventes. A) Fase acuosa, B) fase orgánica.

8.6.2 Cromatografía de líquidos-masa

El análisis del cromatograma en polaridad negativa muestra un ion con masa de 209.04 g/mol que, presuntivamente, corresponde al compuesto 2,4-Diacetilfloroglucinol (DAPG) con una respuesta de 1×10^7 (Figura 22). Cesa-Luna, 2020 reportó que la cepa EMM-1 posee un fragmento del grupo de genes biosintéticos que codifican para DAPG.

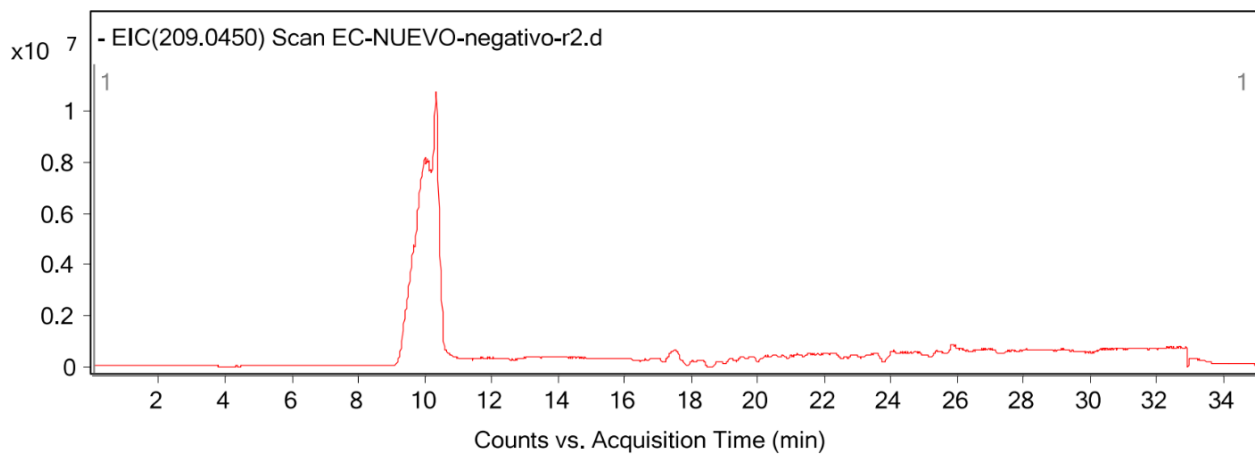


Fig. 22 Cromatograma de ion extraído en polaridad negativa. Masa correspondiente a 2,4-diacetilfloroglucinol.

También se encontró un compuesto cuya masa corresponde a ácido 2-oxo-10H-fenazina-1-carboxílico, se pudo observar un pico para este compuesto tanto en polaridad negativa como positiva (Figura 23).

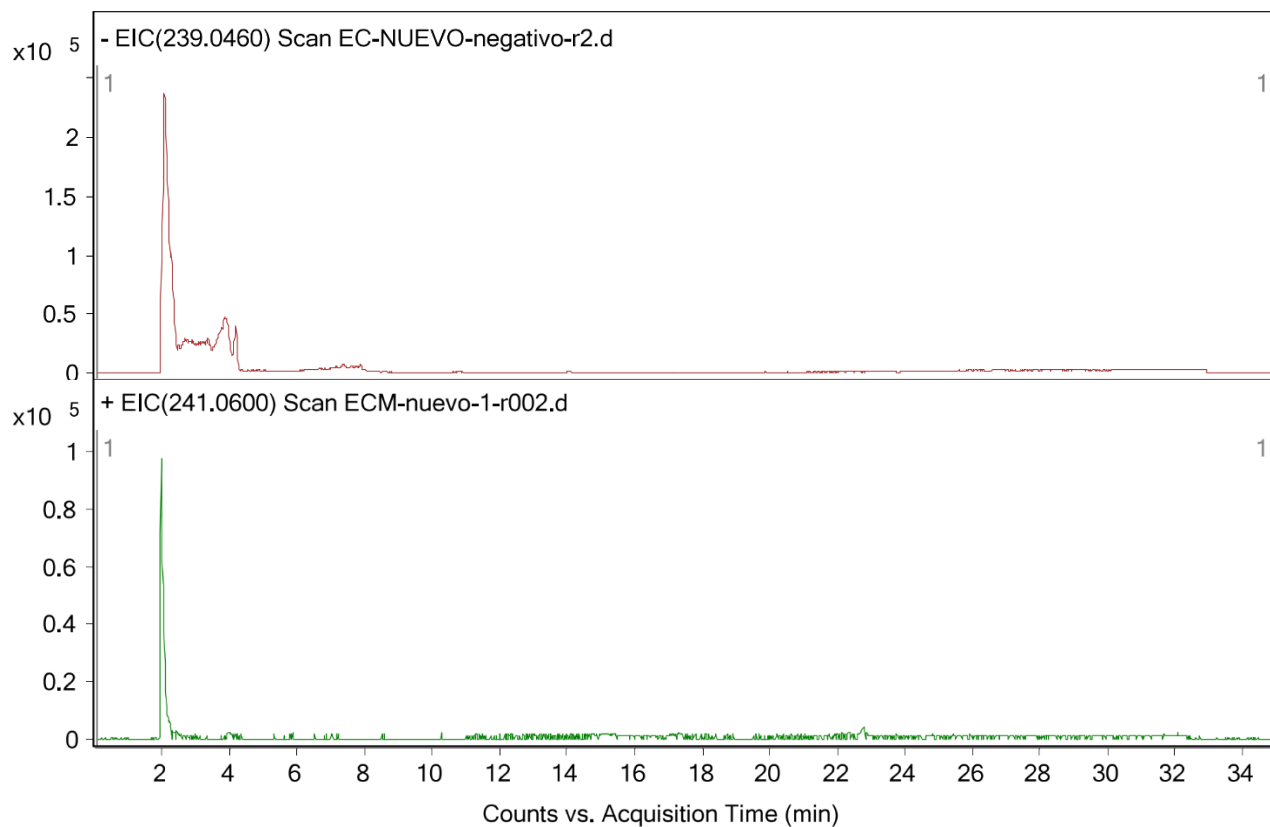


Fig. 23 Cromatograma de ion extraído en polaridad negativa y positiva. Masa correspondiente a ácido 2-oxo-10H-fenazina-1-carboxílico.

Según la masa de 325.06 g/mol, en polaridad positiva, correspondería al compuesto piochelina (Figura 24), el cual es un sideróforo producido por algunas especies de *Pseudomonas* como *P. aeruginosa* que utiliza para cubrir sus necesidades en hierro (Brendel *et al.*, 2012).

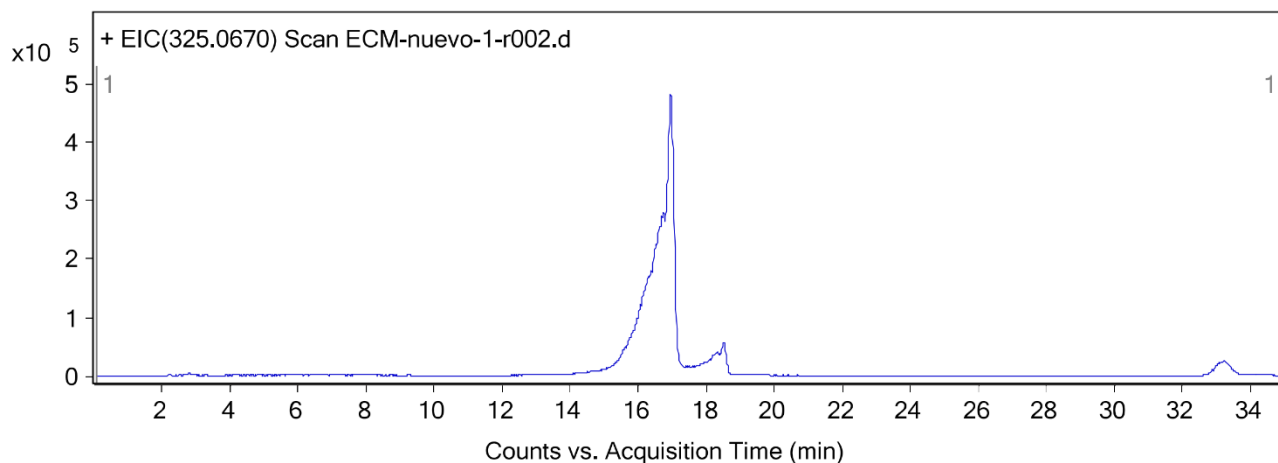


Fig. 24 Cromatograma de ion extraído en polaridad positiva. Masa correspondiente a piochelina.

En la Figura 25 se observa un pico con una masa en polaridad negativa de 1293.83 g/mol que correspondería al compuesto orfamida A, que es un lipopéptido producido por *Pseudomonas* y que tiene un uso potencial como insecticida y como control biológico de un amplio espectro de hongos fitopatógenos (Jang *et al.*, 2013; Zongwang *et al.*, 2016).

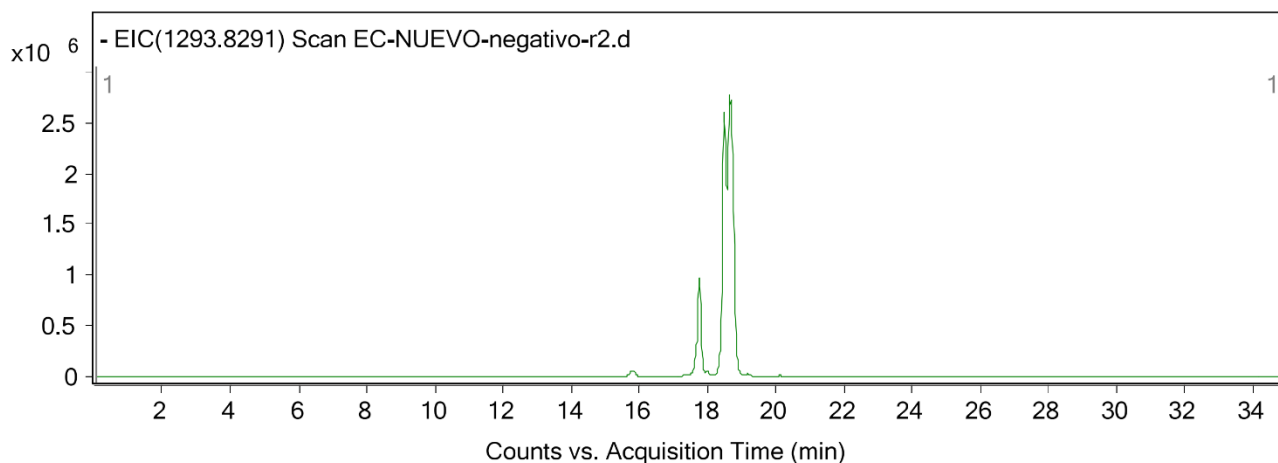


Fig. 25 Cromatograma de ion extraído en polaridad negativa. Masa correspondiente a orfamida A.

En un segundo experimento de extracción de metabolitos se determinó la actividad antimicrobiana de ambas fases. Se observó que la fase acuosa sin diluir, indicado con flecha roja en la figura 26, presentó un halo muy pequeño y difuso. El control positivo (extracto crudo filtrado del cual se hizo la extracción) sí presentó un halo transparente de 10 mm de radio lo que corresponde a 66.67 UA·mm/mL.

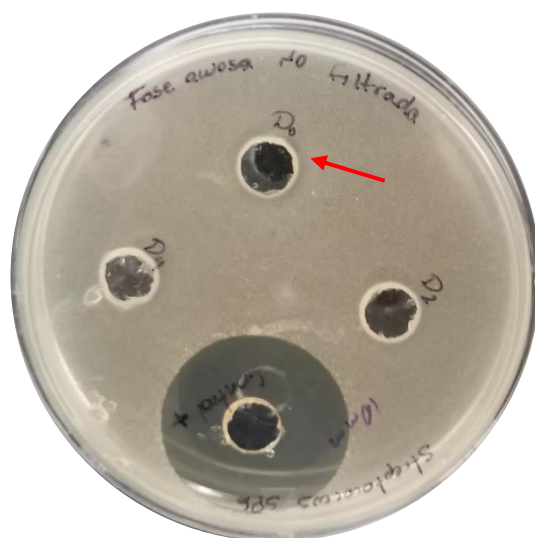


Fig. 26 Ensayo de difusión en pozo de la fase acuosa.
Se observan pequeños halos difusos (flecha roja).

Al evaporar y resuspender la fase orgánica en etanol y evaluarla mediante el método de difusión en pozo, la actividad antimicrobiana persistió y fue similar a la del extracto crudo fresco (centrifugado y filtrado) tomado como control positivo (Figura 27), por lo que también se sometió a un análisis cromatográfico para identificar los compuestos presentes que podrían estar ocasionando esta actividad.

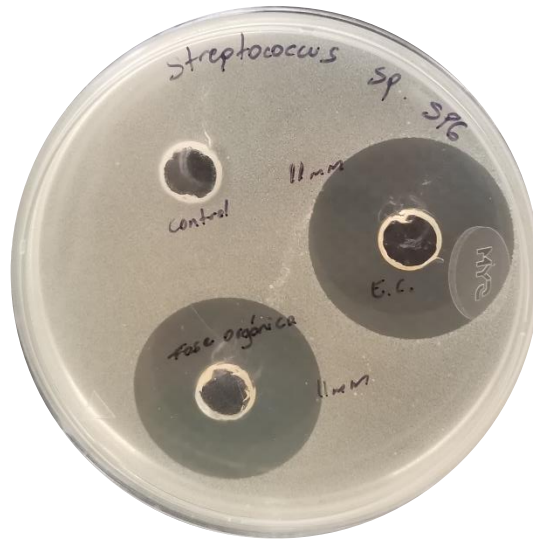


Fig. 27 Ensayo de difusión en pozo de la fase orgánica y extracto crudo.

Se identificó un probable compuesto, el ácido 2,4-diaminobutírico (DAB), isómero de la neurotoxina β -N-metilamino-L-alanina (BMAA) que es producida por algunas cianobacterias (Downing *et al.*, 2008) sin embargo, en la fase orgánica hay muchas sustancias que posiblemente están relacionadas a la mayor actividad observada en esta fase que no pudieron ser identificadas.

9. DISCUSIÓN

En la naturaleza, los microorganismos se encuentran en un ambiente constante de lucha por recursos para su supervivencia y una de las maneras más eficaces para lograr esto es produciendo sustancias tóxicas contra sus competidores.

La bacteria rizosférica *Pseudomonas protegens* EMM-1, aislada del maíz rojo criollo, ha sido capaz de antagonizar bacterias de suelo, hongos fitopatógenos y bacterias de importancia clínica, en estudios previos solo en medio sólido se había logrado que la cepa EMM-1 produjera sustancias inhibitorias (Aguayo-Acosta, 2015; Cesa-Luna, 2015), sin embargo, en literatura se encontró que las condiciones de cultivo como oxigenación, temperatura y fuente de carbono tenía una importante repercusión en la producción de metabolitos inhibitorios en los géneros *Pseudomonas* y *Pseudoalteromonas* (Shanahan *et al.*, 1992; Yang *et al.*, 2007; Kidarsa *et al.*, 2011; López *et al.*, 2012), por lo que se requirieron de varios experimentos para encontrar las condiciones óptimas de producción.

El diseño de experimentos es una herramienta estadística que permite acelerar la optimización de los experimentos pues da paso a la manipulación de distintas variables o factores simultáneamente. El diseño factorial consta de dos o más factores y cada uno de ellos con distintos niveles, en cada ensayo completo se estudian todas las combinaciones posibles de cada uno de los factores en sus distintos niveles (Montgomery, 2005). Para este estudio se utilizó un diseño factorial 3^2 , es decir, dos factores (temperatura y volumen de llenado) con tres niveles (alto, medio y bajo) realizado en 3 medios de cultivo distintos.

Comparado con 18 °C y 28 °C, la producción de metabolitos inhibitorios fue mayor a 23°C en la mayoría de los volúmenes de llenado en medio GYP (Figuras 6, 7, 8 y 9). En la cepa CHA0 de *P. protegens* la temperatura regula la producción de cianuro de hidrógeno y 2,4-diacetilfloroglucinol mediante la vía de transducción de señales Gac/Rsm y el sistema de doble componente GacS/GacA. A altas temperaturas, un cinasa de detección denominado RetS inhibe la actividad de la vía Gac/Rsm y, por lo tanto, la síntesis de dichos metabolitos se ve inhibida (Humair *et al.*, 2009). Posiblemente esta sea una de las razones por la que la cepa EMM-1 produce bajas concentraciones de metabolitos inhibitorios a temperaturas de

28°C, ya que, en la naturaleza en la que suele encontrarse esta bacteria, a altas temperaturas muchos microorganismos con los que compite no son capaces de sobrevivir.

Otra variable explorada en este trabajo fue la oxigenación. Para manipular esta variable en matraces, se utilizaron tres volúmenes de llenado diferentes (bajo, medio y alto). La oxigenación no tuvo un efecto estadístico significativo en la producción de sustancias inhibitorias cuando *P. protegens* EMM-1 creció en medio con glicerol (Figuras 6, 7, 8 y 9), las OTR máximas correspondientes a cada volumen de llenado fueron 7.6 mmol/L/h para 15 mL (Figura 15A), 2.98 mmol/L/h para 50 mL (Figura 15B) y 2.06 mmol/L/h para 85 mL (Figura 15C), sin embargo, en los ensayos en biorreactor cuando se operó con alta oxigenación, a una OTR máxima de 12.5 mmol/L/h (600 rpm), la actividad inhibitoria disminuyó (Figura 19). Esto nos hace pensar que un exceso en la oxigenación también es perjudicial para la actividad inhibitoria, se requieren más estudios para determinar cómo el exceso de oxigenación afecta negativamente la producción de sustancias inhibitorias cuando se utiliza glicerol como fuente de carbono.

Los ensayos realizados en medio con sacarosa no presentaron actividad inhibitoria observable en ninguno de los experimentos; con ninguna de las variables en ningún nivel, sólo en presencia de glicerol y manitol se observó actividad inhibitoria. En *Pseudomonas putida* KT2440 el consumo de glicerol puede activar rutas glucolíticas y gluconeogénicas, pues al ingresar a la célula se fosforila a glicerol-3-fosfato y posteriormente genera dihidroxiacetona fosfato el cual, se puede utilizar en cualquiera de las dos rutas. Cuando se utiliza glicerol también se previene la pérdida de carbono en forma de CO₂ o subproductos mientras que se estimula la expresión de la vía glucolítica completa Entner-Doudoroff (Poblete-Castro *et al.*, 2019; Dolan *et al.*, 2020). Al tener activas glucólisis y gluconeogénesis, *Pseudomonas protegens* puede tener energía y precursores como el malonil-CoA para la síntesis de DAPG. En concreto, el glicerol como fuente de carbono puede estar regulando positivamente la expresión de genes relacionados con la actividad antimicrobiana de *Pseudomonas* propiciando así la producción de metabolitos antimicrobianos (Yao *et al.*, 2018; Matuszewska *et al.*, 2021).

La sacarosa en *P. putida* no se puede transportar eficientemente a través de la membrana, es necesario que se exprese una porina adecuada, además, se sabe que la sacarosa

se hidroliza fuera de la célula por acción de la sacarasa ya que se ha observado que se acumula glucosa y fructosa en el sobrenadante (Löwe *et al.*, 2017; Löwe *et al.*, 2020), esto podría sugerir que cuando *P. protegens* EMM-1 crece en medio con sacarosa, sin presencia de sacarasa, no es capaz de metabolizarla adecuadamente y, por lo tanto, la bacteria se ve limitada a utilizarla solo para el metabolismo primario dejando de lado la producción de sustancias inhibitorias.

Otra posible explicación es que, cuando *P. protegens* EMM-1 se encuentra en ambientes donde hay sacarosa, no necesita producir surfactantes (e.g. lipopéptidos) para adquirir su fuente de carbono a diferencia de cuando crece en medios con glicerol y manitol (Mavrodi *et al.*, 2021).

En general, la fuente de carbono tiene una estrecha relación con la producción de metabolitos inhibitorios y esto se podría atribuir al mecanismo de represión de catabolismo del carbono (CCR) el cual es un mecanismo bacteriano que consta de tres partes: el sistema de doble componente CbrA/CbrB, los ARNs CrcZ/Y y un represor traduccional Crc, este represor afecta la utilización de sustratos no preferidos en presencia de fuente de carbono preferidas, sin embargo, en presencia de fuentes no preferidas como único sustrato, como manitol, se activa el sistema CbrA/CbrB y mediante la CrcZ, la proteína Crc es secuestrada, lo que permite a la bacteria crecer en esta fuente de carbono y también, indirectamente, crear condiciones metabólicas que estimulen la generación de precursores de sustancias inhibitorias como la pioluteorina en *Pseudomonas* PA1201. (Sonnleitner *et al.*, 2009; Valentini y Lapouge, 2012; Cui *et al.*, 2023). Es posible que una fuente de carbono no preferida haga menos competitiva a *Pseudomonas protegens*, en términos de crecimiento, que sea necesario producir sustancias tóxicas contra posibles competidores.

En el extremo derecho de la Figura 28 se encuentran gotas de 20 μ L de sobrenadante de un cultivo con sacarosa cuyo contenido de surfactantes es mínimo ya que su tamaño es similar al de las gotas de agua utilizadas como control. Cuando se utilizó glicerol o manitol como fuente de carbono y volúmenes de llenado de 15 y 85 mL en matraz, estas gotas de 20 μ L, mostraban una mayor expansión debido al contenido de los posibles surfactantes (Figura 28).

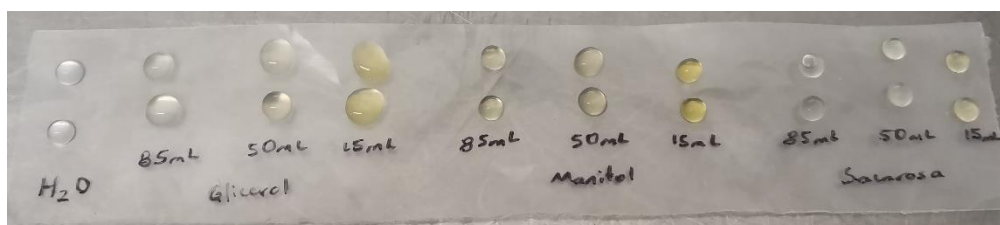


Fig. 28 Prueba para biosurfactantes producidos por *P. protegens* EMM-1 en GYP, MYP Y SYP.

Sabiendo que la temperatura de 23°C y que las fuentes de carbono de glicerol y manitol resultaron adecuadas para producir sustancias antimicrobianas en matraces, se decidió escalar el proceso de producción a un reactor de 1 L de volumen utilizando glicerol como fuente de carbono. Cuando se operó el reactor con OTR máximas de 7.1 y 10.2 mmol/L/h se logró escalar de forma exitosa la producción de sustancias inhibitorias ya que los valores de actividad antagonica fueron similares a los obtenidos en los experimentos en matraces con volumens de llenado de 15 mL cuya OTR máxima fue de 7.6 mmol/L/h.

El proceso de extracción de metabolios inhibitorios a partir del sobrenadante filtrado de cultivo en biorreactor (400 rpm), generó dos fases, la acuosa y la orgánica. Los halos de inhibición observados cuando se utilizó la fase acuosa son difusos en comparación con los obtenidos con la fase orgánica (Figura 26 y 27), los cuales son grandes y totalmente transparentes. En la fase acuosa se identificaron por LC-MS metabolitos como el 2,4-diacetilfloroglucinol, ácido 2-oxo-10H-fenazina-1-carboxílico, piochelina y orfamida A, los cuales podrían ser los causantes de los halos de inhibición difusos. Mientras que en la fase orgánica, ninguno de estos compuestos se identificaron, lo cual sugiere que ninguno de ellos estaría relacionado con la actividad inhibitoria de *P. protegens* EMM-1 observada en los halos transparentes (Figura 29), por lo tanto, se requieren más análisis para identificar cuáles otras sustancias estarían provocando la actividad inhibitoria que se observó con los metabolitos de la fase orgánica.

10. CONCLUSIÓN

La temperatura de 23°C, fuente de carbono manitol o glicerol y OTR máximas de 3-10 mmol/L/h favorecen que *P. protegens* EMM-1 pueda producir sustancias inhibitorias en medio líquido.

Una fuente de carbono glucolítica como la sacarosa no favorece que *P. protegens* EMM-1 produzca sustancias inhibitorias como lo hace una fuente gluconeogénica como el glicerol.

Los compuestos antimicrobianos producidos por *P. protegens* EMM-1, responsables de los halos de inhibición transparentes, tienen mayor afinidad a los solventes orgánicos como el cloroformo y acetonitrilo sugiriendo una naturaleza hidrofóbica.

P. protegens EMM-1 crecida en las condiciones evaluadas en este trabajo produce compuestos antimicrobianos ya reportados como 2,4-diacetilfloroglucinol, ácido 2-oxo-10H-fenazina-1-carboxílico, piochelina y orfamida A, pero además otros cuya acción antimicrobiana es mayor, al menos contra el aislado clínico *Streptococcus* sp. SP6

11. PERSPECTIVAS DE ESTE TRABAJO

Identificar los compuestos antimicrobianos presentes en la fase orgánica ya que, al parecer, son compuestos no reportados y que causan una mayor actividad antimicrobiana que los ya conocidos reportados en la literatura.

Una vez identificados los compuestos de la fase orgánica causantes de los halos transparentes sería importante evaluar sus características citotóxicas y hemolíticas con la perspectiva de desarrollar nuevos antimicrobianos comerciales.

ANEXO

A

Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Modelo	8	2399.8	300.0	0.81	0.606
Lineal	4	1530.8	382.7	1.03	0.419
Temperatura	2	1254.3	627.2	1.69	0.213
Vol de llenado	2	276.5	138.2	0.37	0.695
Interacciones de 2 términos	4	869.0	217.3	0.58	0.678
Temperatura*Vol de llenado	4	869.0	217.3	0.58	0.678
Error	18	6696.0	372.0		
Total	26	9095.8			

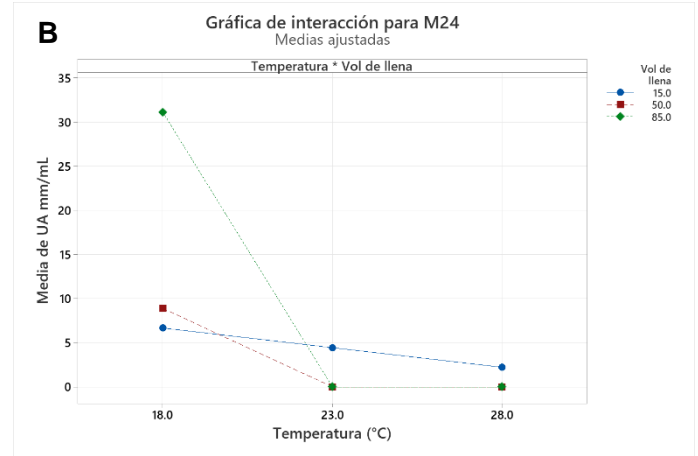


Fig. A1 Estadística para los ensayos en medio con manitol a las 24 h de cultivo. A) Análisis de varianza de los factores temperatura y volumen de llenado. El valor de $P < 0.05$ es significativo. B) Gráfica de interacción entre la temperatura y el volumen de llenado, el resultado se muestra en UA·mm/mL.

A

Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Modelo	8	2059.0	257.4	1.99	0.107
Lineal	4	1219.5	304.9	2.36	0.092
Temperatura	2	224.6	112.3	0.87	0.436
Vol de llenado	2	994.9	497.4	3.85	0.041
Interacciones de 2 términos	4	839.5	209.9	1.62	0.211
Temperatura*Vol de llenado	4	839.5	209.9	1.62	0.211
Error	18	2325.8	129.2		
Total	26	4384.8			

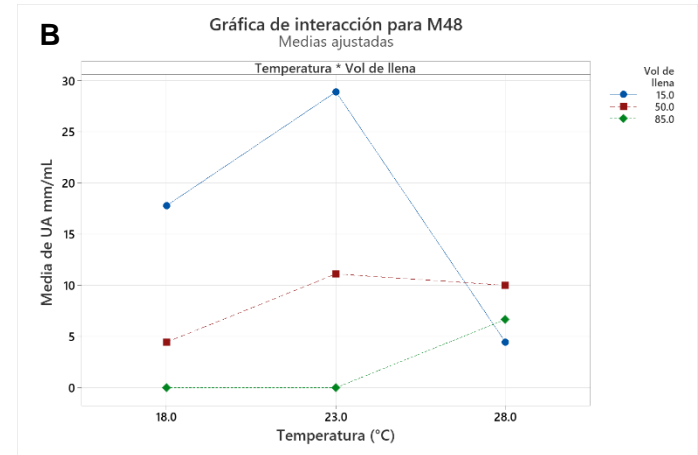


Fig. A2 Estadística para los ensayos en medio con manitol a las 48 h de cultivo. A) Análisis de varianza de los factores temperatura y volumen de llenado. El valor de $P < 0.05$ es significativo. B) Gráfica de interacción entre la temperatura y el volumen de llenado, el resultado se muestra en UA·mm/mL.

A

Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Modelo	8	22924	2865	0.90	0.537
Lineal	4	18479	4620	1.45	0.259
Temperatura	2	5211	2605	0.82	0.457
Vol de llenado	2	13268	6634	2.08	0.154
Interacciones de 2 términos	4	4445	1111	0.35	0.841
Temperatura*Vol de llenado	4	4445	1111	0.35	0.841
Error	18	57360	3187		
Total	26	80284			

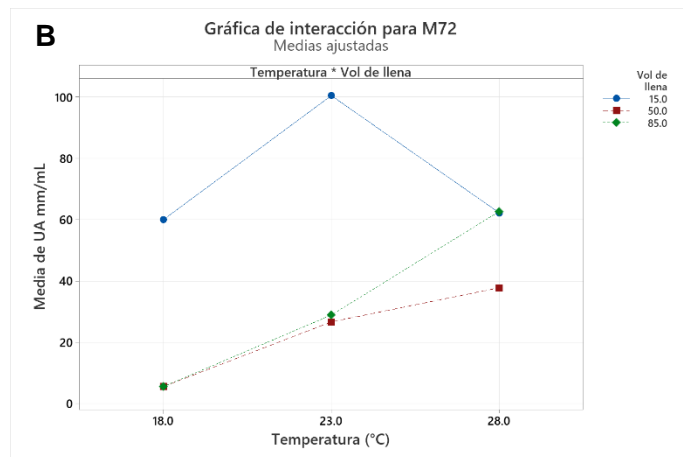


Fig. A3 Estadística para los ensayos en medio con manitol a las 72 h de cultivo. A) Análisis de varianza de los factores temperatura y volumen de llenado. El valor de $P < 0.05$ es significativo. B) Gráfica de interacción entre la temperatura y el volumen de llenado, el resultado se muestra en UA·mm/mL.

A

Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Modelo	8	53472	6684	1.87	0.130
Lineal	4	45260	11315	3.16	0.039
Temperatura	2	12158	6079	1.70	0.211
Vol de llenado	2	33103	16551	4.62	0.024
Interacciones de 2 términos	4	8212	2053	0.57	0.686
Temperatura*Vol de llenado	4	8212	2053	0.57	0.686
Error	18	64506	3584		
Total	26	117978			

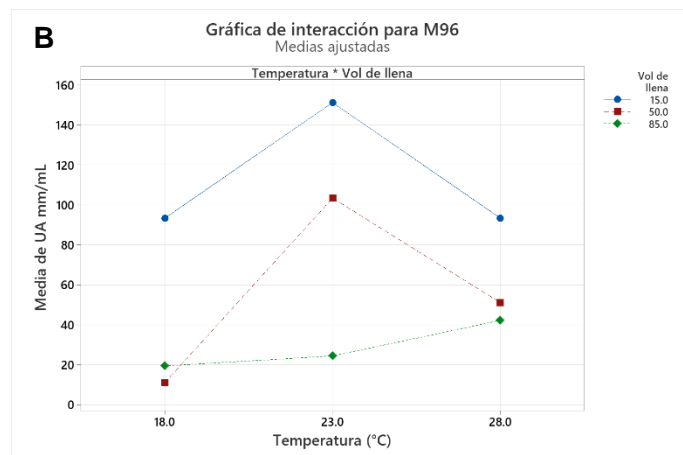


Fig. A429 Estadística para los ensayos en medio con manitol a las 96 h de cultivo. A) Análisis de varianza de los factores temperatura y volumen de llenado. El valor de $P < 0.05$ es significativo. B) Gráfica de interacción entre la temperatura y el volumen de llenado, el resultado se muestra en UA·mm/mL.

REFERENCIAS

- Almario, J., Bruto, M., Vacheron, J., Prigent-Combaret, C., Moënne-Loccoz, Y., & Muller, D. (2017). “Distribution of 2,4-Diacetylphloroglucinol Biosynthetic Genes among the *Pseudomonas* spp. Reveals Unexpected Polyphyletism”, *Frontiers in Microbiology*, 8. doi:10.3389/fmicb.2017.01218
- Anderlei, T., Zang, W., Papaspyrou, M., & Büchs, J. (2004). “Online respiration activity measurement (OTR, CTR, RQ) in shake flasks”, *Biochemical Engineering Journal*, 17(3), 187–194. doi:10.1016/s1369-703x(03)00181-5
- Andreolli, M., Zapparoli, G., Angelini, E., Lucchetta, G., Lampis, S. y Vallini, G. (2019) “*Pseudomonas protegens* MP12: a plant growth-promoting endophytic bacterium with broad-spectrum antifungal activity against grapevine phytopathogens”, *Microbiological Research*, 219, pp. 123-131, doi: 10.1016/j.micres.2018.11.003
- Biessy, A., & Fillion, M. (2018). “Phenazines in plant-beneficial *Pseudomonas* spp.: Biosynthesis, regulation, function and genomics”, *Environmental Microbiology*. doi:10.1111/1462-2920.14395
- Brandel, J., Humbert, N., Elhabiri, M., Schalk, I. J., Mislin, G. L. A., & Albrecht-Gary, A.-M. (2012). “Pyochelin, a siderophore of *Pseudomonas aeruginosa*: Physicochemical characterization of the iron(iii), copper(ii) and zinc(ii) complexes”, *Dalton Transactions*, 41(9), 2820. doi:10.1039/c1dt11804h
- Caulier, S., Nannan, C., Gillis, A., Licciardi, F., Bragard, C., y Mahillon, J. (2019). “Overview of the Antimicrobial Compounds Produced by Members of the *Bacillus subtilis* Group”, *Frontiers in Microbiology*, 10. doi:10.3389/fmicb.2019.00302
- Cesa-Luna, C., Baez, A., Aguayo-Acosta, A., Llano-Villarreal, R. C., Juárez-González, V. R., Gaytán, P., Bustillos-Cristales, M. R., Rivera-Urbalejo, A., Muñoz-Rojas, J. y Quintero-Hernández, V. (2020) “Growth inhibition of pathogenic microorganisms by *Pseudomonas protegens* EMM-1 and partial characterization of inhibitory substances”, *PLoS ONE* 15(10): e0240545. doi: 10.1371/journal.pone.0240545
- Cesa-Luna, C., Alatorre-Cruz, J. M., Carreño-López, R., Quintero-Hernández, V., & Baez, A. (2021). “Emerging Applications of Bacteriocins as Antimicrobials, Anticancer Drugs, and Modulators of The Gastrointestinal Microbiota”, *Polish journal of microbiology*, 70(2), pp. 143–159. doi: 10.33073/pjm-2021-020
- Chikindas, M. L., Weeks, R., Drider, D., Chistyakov, V. A., & Dicks, L. M. (2018). “Functions and emerging applications of bacteriocins”, *Current opinion in biotechnology*, 49, pp. 23–28. doi: 10.1016/j.copbio.2017.07.011

- Cotter, P. D. Hill, C. y Ross, R. P. (2005) “Bacteriocins: developing innate immunity for food” *Nature Reviews Microbiology*, ;3(10), pp. 777-88. doi: 10.1038/nrmicro1273
- Cotter, P. D., Ross, R. P., y Hill, C. (2012). “Bacteriocins — a viable alternative to antibiotics?”, *Nature Reviews Microbiology*, 11(2), pp. 95–105. doi:10.1038/nrmicro2937
- Cui, Y., Song, K., Jin, Z., Lee, L., Thawai, C. y He, Y. (2023). “Fructose promotes pyoluteorin biosynthesis via the CbrAB-CrcZ-Hfq/Crc pathway in the biocontrol strain *Pseudomonas* PA1201”, *Synthetic and Systems Biotechnology*, 8(4), 618-628. doi:10.1016/j.synbio.2023.09.004
- De La Cruz-Enríquez, J. (2019) *Sphingomonas* sp. Ds204 como alternativa para antagonizar a hongos patógenos en cultivos de maíz. Tesis de maestría. Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.
- Dolan, S. K., Kohlstedt, M., Trigg, S., Vallejo Ramirez, P., Kaminski, C. F., Wittmann, C., & Welch, M. (2020). “Contextual Flexibility in *Pseudomonas aeruginosa* Central Carbon Metabolism during Growth in Single Carbon Sources”, *mBio*, 11(2). doi:10.1128/mbio.02684-19
- Doran, Pauline M. Principios de ingeniería de los bioprocesos. Zaragoza: Acribia, 2013. Impreso.
- Downing, S., Banack, S. A., Metcalf, J. S., Cox, P. A., y Downing, T. G. (2011). “Nitrogen starvation of cyanobacteria results in the production of β -N-methylamino-L-alanine”, *Toxicon*, 58(2), 187–194. doi:10.1016/j.toxicon.2011.05.017
- Duffy, B. K. y Défago, G. (1999) “Environmental Factors Modulating Antibiotic and Siderophore Biosynthesis by *Pseudomonas fluorescens* Biocontrol Strains”, *Applied and Environmental Microbiology*, 65(6), pp. 2429–2438. Doi: 10.1128/AEM.65.6.2429-2438.1999
- Ferreira, M., & Gallegos, M. (2021). “Distinctive features of the Gac-Rsm pathway in plant-associated *Pseudomonas*”, *Environmental Microbiology*. doi:10.1111/1462-2920.15558
- Global Antibiotic Research & Development Partnership (2021) Global Antibiotic Research & Development Partnership. Disponible en: <https://gardp.org/> [Consultado 10 de octubre de 2021].
- Gross, H., & Loper, J. E. (2009). “Genomics of secondary metabolite production by *Pseudomonas* spp”, *Natural Product Reports*, 26(11), 1408. doi:10.1039/b817075b

- Höfte, M. (2021). *The use of Pseudomonas spp. as bacterial biocontrol agents to control plant diseases*.
- Humair, B., González, N., Mossialos, D., Reimann, C. y Haas, D. (2009) “Temperature-responsive sensing regulates biocontrol factor expression in *Pseudomonas fluorescens* CHA0”, *International Society for Microbial Ecology*, 3(8), pp. 955-65. doi: 10.1038/ismej.2009.42
- Jabłońska, J., Dubrowska, K., Augustyniak, A. Wróbel, R., Pizm M., Cedrowsky, K y Rakoczy, R. “The influence of nanomaterials on pyocyanin production by *Pseudomonas aeruginosa*”, *Applied Nanoscience* 12, 1929-1940 (2022). <https://doi.org/10.1007/s13204-022-02461-2>
- Jang, J. Y., Yang, S. Y., Kim, Y. C., Lee, C. W., Park, M. S., Kim, J. C., & Kim, I. S. (2013). “Identification of Orfamide A as an Insecticidal Metabolite Produced by *Pseudomonas protegens* F6”, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(28), 6786–6791. doi:10.1021/jf401218w
- Kidarsa, T. A., Goebel, N. C., Zabriskie T. M. y Loper, J. E. (2011) “Phloroglucinol mediates cross-talk between the pyoluteorin and 2,4-diacetylphloroglucinol biosynthetic pathways in *Pseudomonas fluorescens* Pf-5”, *Molecular Microbiology*, 81(2), pp. 395-414. doi: 10.1111/j.1365-2958.2011.07697.x
- Lazzaro, B. P., Zasloff, M., y Rolff, J. (2020). “Antimicrobial peptides: Application informed by evolution” *Science*, 368(6490), eaau5480. doi:10.1126/science.aau5480
- Lei, J., Sun, L., Huang, S., Zhu, C., Li, P., He, J., Mackey, V., Coy, D. H., y He, Q. (2019). “The antimicrobial peptides and their potential clinical applications”, *American journal of translational research*, 11(7), 3919–3931.
- Ligon, J. M., Hill, D. S., Hammer, P. E., Torkewitz, N. R., Hofmann, D., Kempf, H.-J., & Pöe, K.-H. van. (2000). “Natural products with antifungal activity from *Pseudomonas* biocontrol bacteria”, *Pest Management Science*, 56(8), 688–695. doi:10.1002/1526-4998(200008)56:8<688::aid-ps186>3.0.co;2-v
- López, R., Monteón, V., Chan, E., Montejo, R., & Chan, M. (2012). “Oxygen limitation favors the production of protein with antimicrobial activity in *Pseudoalteromonas* sp.”, *Brazilian Journal of Microbiology*, 43(3), 1206–1212. doi:10.1590/s1517-83822012000300048
- Löwe, H., Schmauder, L., Hobmeier, K., Kremling, A., & Pflüger-Grau, K. (2017). “Metabolic engineering to expand the substrate spectrum of *Pseudomonas putida* toward sucrose”, *Microbiologyopen*, 6(4), e00473.

- Löwe, H., Sinner, P., Kremling, A., & Pflüger-Grau, K. (2020). “Engineering sucrose metabolism in *Pseudomonas putida* highlights the importance of porins”, *Microbial biotechnology*, 13(1), 97-106.
- Magiorakos A. P., Srinivasan A., Carey R. B., Carmeli Y., Falagas M. E., Giske C. G., Harbarth S., Hindler J. F., Kahlmeter G., Olsson-Liljequist B., Paterson D. L., Rice L. B., Stelling J., Struelens M. J., Vatopoulos A., Weber J. T., Monnet D. L. (2012). “Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance” *Clin Microbiol Infect.* 18(3):268-81.
- Mavrodi, O. V., McWilliams, J. R., Peter, J. O., Berim, A., Hassan, K. A., Elbourne, L. D., LeTourneau, M. K., Gang, D. R., Paulsen, I. T., Weller, D. M., Thomashow, L. S., Flynt, A. S. y Mavrodi, D. V. (2021). “Root exudates alter the expression of diverse metabolic, transport, regulatory, and stress response genes in rhizosphere *Pseudomonas*”, *Frontiers in Microbiology*, 12, 651282.
- Molina-Romero, D., Baez, A., Quintero-Hernández, V., Castañeda-Lucio, M., Fuentes-Ramírez, L. E., Bustillos-Cristales, M. R., Rodríguez-Andrade, O., Morales-García, Y. E., Munive, A. y Muñoz-Rojas, J. (2017) “Compatible bacterial mixture, tolerant to desiccation, improves maize plant growth”, *PLoS ONE* 12(11): e0187913. doi: 10.1371/journal.pone.0187913
- Montgomery, D. C. (2005). *Diseño y análisis de experimentos* (2a. Ed.). México: Limusa Wiley.
- Monteagudo-Cascales, E., Santero, E. y Canosa, I. (2022) “The Regulatory Hierarchy Following Signal Integration by the CbrAB Two-Component System: Diversity of Responses and Functions”. *Genes*, 13(2): 375. <https://doi.org/10.3390/genes13020375>
- O’Neil, J. (2016) “Tackling drug-resistant infections globally: final report and recommendations”, *The Review on Antimicrobial Resistance*, [pdf]. Disponible en: <https://apo.org.au/sites/default/files/resource-files/2016-05/apo-nid63983.pdf> (Consultado 10 de octubre de 2021).
- Poblete-Castro, I., Wittmann, C., & Nikel, P. I. (2019). “Biochemistry, genetics and biotechnology of glycerol utilization in *Pseudomonas* species”, *Microbial Biotechnology*. doi:10.1111/1751-7915.13400
- Rodriguez-Mozaz S, Chamorro S, Marti E, Huerta B, Gros M, Sánchez-Melsió A, Borrego CM, Barceló D, Balcázar JL. (2015) “Occurrence of antibiotics and antibiotic resistance genes in hospital and urban wastewaters and their impact on the receiving river”, *Water Research*. 1(69) pp. 234-242. doi: 10.1016/j.watres.2014.11.021

- Shanahan, P., O’Sullivan, D. J., Simpson, P., Glennon, J. D. y O’Gara, F. (1992) “Isolation of 2,4-Diacetylphloroglucinol from a Fluorescent *Pseudomonas* and Investigation of Physiological Parameters Influencing Its Production”, *Applied and Environmental Microbiology*, 58(1), pp. 353-358, doi: 10.1128/aem.58.1.353-358.1992
- Shi, H., Huang, X., Wang, Z., Guan, Y. y Zhang, X. (2019) “Improvement of pyoluteorin production in *Pseudomonas protegens* H78 through engineering its biosynthetic and regulatory pathways”, *Applied genetics and molecular biotechnology*, 103, pp. 3465–3476, doi: 10.1007/s00253-019-09732-z
- Simons, A., Alhanout, K. y Duval, R. E. (2020) “Bacteriocins, Antimicrobial Peptides from Bacterial Origin: Overview of Their Biology and Their Impact against Multidrug-Resistant Bacteria”, *Microorganisms*, 8(5), 639. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8050639>
- Sonnleitner, E., Abdou L. y Haas, D. (2009) “Small RNA as global regulator of carbon catabolite repression in *Pseudomonas aeruginosa*”, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(51) pp. 21866-21871, doi: 10.1073/pnas.091030810
- Takeuchi, K., Kiefer, P., Reimann, C., Keel, C., Dubuis, C., Rolli, J., Vorholt, J. A. y Haas, D. (2009) “Small RNA-dependent expression of secondary metabolism is controlled by Krebs cycle function in *Pseudomonas fluorescens*” *The Journal Of Biological Chemistry*. 284(50), pp. 34976-34985. doi: 10.1074/jbc.M109.052571.
- Takeuchi, K., Someyab, N. y Morohoshi, T. (2023). “Genome-mining approaches for the evaluation of *Pseudomonas protegens* and related strains isolated from the rhizosphere in Japan”, *Physiological and Molecular Plant Pathology*. 125, 101981.
- Valentini, M., y Lapouge, K. (2012). “Catabolite repression in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 regulates the uptake of C4-dicarboxylates depending on succinate concentration”, *Environmental Microbiology*, 15(6), 1707–1716. doi:10.1111/1462-2920.12056
- Van Boeckel, T. P., Brower, C., Gilbert, M., Grenfell, B. T., Levin, S. A., Robinson, T. P., Teillant, A. y Laxminarayan, R. (2015) “Global trends in antimicrobial use in food animals”, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(18), pp. 5649-5654, doi: 10.1073/pnas.1503141112
- Wang, X., Tang, D. & Wang, W. (2020) “Hyperosmotic Adaptation of *Pseudomonas protegens* SN15-2 Helps Cells to Survive at Lethal Temperatures”. *Biotechnology and Bioprocess Engineering* 25, pp. 403–413. doi: 10.1007/s12257-019-0430-x

- Wang, X., Wang, M., Tang, D., y Wang, W. (2020) “Complete Genome Sequence of Plant Growth-Promoting Rhizobacterium *Pseudomonas protegens* SN15-2”, *Microbiology resource announcements*, 9(16), e01548-19, doi: 10.1128/MRA.01548-19
- Yan Q., Lopes L. D., Shaffer B. T., Kidarsa T. A., Vining O., Philmus B., Song C., Stockwell V. O., Raaijmakers J. M., McPhail K. L., Andreote F. D., Chang J. H., Loper J. E. (2018) “Secondary Metabolism and Interspecific Competition Affect Accumulation of Spontaneous Mutants in the GacS-GacA Regulatory System in *Pseudomonas protegens*”, *mBio*, 9(1), e01845-17. doi: 10.1128/mBio.01845-17
- Yan, Q., Philmus, B., Chang, J. H., & Loper, J. E. (2017). “Novel mechanism of metabolic co-regulation coordinates the biosynthesis of secondary metabolites in *Pseudomonas protegens*”, *eLife*, 6, e22835. <https://doi.org/10.7554/eLife.22835>
- Yang, L. H., Xiong, H., Lee, O. O., Qi, S.-H., & Qian, P.-Y. (2007). “Effect of agitation on violacein production in *Pseudoalteromonas luteoviolacea* isolated from a marine sponge”, *Letters in Applied Microbiology*, 44(6), 625–630. doi:10.1111/j.1472-765x.2007.02125.x
- Zongwang, M., Geudens, N., Kieu, N. P., Sinnaeve, D., Ongena, M., Martins, J. C., & Höfte, M. (2016). “Biosynthesis, Chemical Structure, and Structure-Activity Relationship of Orfamide Lipopeptides Produced by *Pseudomonas protegens* and Related Species”, *Frontiers in Microbiology*, 7. doi:10.3389/fmicb.2016.00382