

**TRABAJO FIN DE GRADO**

**BIOLOGÍA**

**Estudio de terpenos volátiles en  
*Streptomyces spp.***

**Valeria Gaya Espinoza**

**Área de Microbiología**

**Junio/2024**



**UNIVERSIDAD DE OVIEDO  
FACULTAD DE BIOLOGÍA**



## DECLARACIÓN DE ORIGINALIDAD

**Valeria Gaya Espinoza**, como alumna del Grado Universitario en Biología de Oviedo, declaro que el Trabajo Fin de Grado **Estudio de terpenos volátiles en *Streptomyces spp.*** es de mi autoría, es original y las fuentes bibliográficas utilizadas han sido debidamente citadas.

En Oviedo a 24 de mayo de 2024

Firmado

## RESUMEN

Dentro del orden de los Actinomicetos podemos encontrar el género *Streptomyces*, el cual destaca por su notable capacidad de producir compuestos bioactivos. En la actualidad, la búsqueda de metabolitos con potencial antimicrobiano es de gran necesidad, debido al declive en el descubrimiento de nuevos fármacos y a la creciente amenaza de la aparición de patógenos multirresistentes. Ante este escenario, la exploración de agrupaciones de biosíntesis de compuestos bioactivos emerge como una posible vía para hacer frente a estos desafíos. En este trabajo, se empleó la cepa *Streptomyces* CS227 proveniente de la superficie de la cutícula de las hormigas cortadoras de hojas de la tribu *Attini*, de Perú. Sobre esta cepa, se diseñó la eliminación del gen terpeno ciclasa de una agrupación de biosíntesis de terpenos, ya que presentó baja homología con otras agrupaciones descritas y por lo tanto pudiera albergar potencial para la síntesis de un compuesto desconocido. A lo largo de nuestro proceso experimental obtendremos un mutante con la finalidad de comparar su perfil metabólico con el de la cepa silvestre para tratar de identificar el producto de dicha agrupación.

Procedimientos experimentales como el descrito, podrían suponer un avance dentro de la investigación destinada a descubrir nuevos compuestos de interés sanitario y a la posible síntesis de novedosos productos farmacológicos.

## ABSTRACT

Within the order of Actinomycetes we can find the genus *Streptomyces*, which stands out for its remarkable ability to produce bioactive compounds. Currently, the search for metabolites with antimicrobial potential is a huge need, due to the decline in the discovery of new drugs and the growing threat of the emergence of multidrug-resistant pathogens. Given this scenario, the exploration of biosynthesis clusters of bioactive compounds emerges as a possible way to address these challenges. In this work, the *Streptomyces* CS227 strain was used, coming from the cuticle surface of leaf-cutter ants of the *Attini* tribe, from Peru. On this strain, the elimination of the terpene cyclase gene from a terpene biosynthesis cluster was designed, since it has low homology with other described clusters and may harbor potential for the synthesis of an unknown compound. Throughout our experimental process we will obtain a mutant in order to compare its metabolic profile with that of the wild strain to try to identify the product of said group.

Experimental procedures such as the one described, could represent an advance in research aimed at discovering new compounds of health interest and the possible synthesis of novel pharmacological products.

## LISTADO DE ABREVIATURAS

**AntiSMASH:** Antibiotics and Secondary Metabolite Analysis Shell

**BLAST:** Basic Local Alignment Search Tool

**DMSO:** dimetilsulfóxido

**DO:** densidad óptica

**Fw:** forward (directo)

**g/L:** relación gramos/litros

**Kb:** kilobase

**NMR:** Resonancia Magnética Nuclear

**OMS:** Organización Mundial de la Salud

**pb:** pares de bases

**rpm:** revoluciones por minuto

**Rw:** reverse (antisentido)

**TAE:** tris-acetato-EDTA

**Tm:** temperatura de fusión

**UV:** ultravioleta

**X-Gal:** 5-bromo-4-cloro-3-indolil- $\beta$ -D-galactopiranosido

# ÍNDICE

1.	INTRODUCCIÓN .....	1
1.1	Género <i>Streptomyces spp.</i> .....	1
1.2	Ciclo de vida .....	1
1.3	Metabolismo secundario. Interés en compuestos producidos por <i>Streptomyces</i> .....	2
1.4	Minería genómica .....	5
1.5	Compuestos volátiles. Interés y función .....	6
1.6	Terpenos .....	7
2.	OBJETIVOS .....	7
3.	MATERIALES Y MÉTODOS .....	8
3.1	Cepas y medios de cultivo .....	8
3.2	Recursos bioinformáticos .....	8
3.3	Estrategia experimental.....	9
3.4	Construcción de plásmido pSEVA-CRISPR con el ARN guía .....	10
3.4.1	Diseño y clonación del ARN guía .....	10
3.4.2	Transformación en células competentes <i>E. coli DH5a</i> .....	12
3.4.3	Extracción de ADN plasmídico (Minipreparación) .....	13
3.4.4	Digestión enzimática del plásmido obtenido.....	13
3.4.5	Purificación de ADN.....	14
3.5	Construcción del plásmido pSEVA 88C1-C18 intermedio .....	14
3.5.1	Electroforesis.....	16
3.5.2	Purificación de fragmentos de ADN a partir de geles de agarosa .....	16
3.5.3	Clonaje por ensamblaje de Gibson.....	17
3.5.4	Digestión del plásmido pSEVA88C1-C18.....	18
3.6	Construcción del plásmido pSEVA-CRISPR final.....	19
4.	RESULTADOS .....	21
4.1	Comprobación de la amplificación de los fragmentos adyacentes.....	21
4.2	Comprobación enzimática de la construcción del plásmido pSEVA88C1-C18 .....	22
5.	DISCUSIÓN .....	23

6. CONCLUSIONES .....	26
7. REFERENCIAS .....	27

# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1 Género *Streptomyces* spp.

El género *Streptomyces* pertenece al filo Actinobacteria, en el cual podemos encontrar una gran variedad de los microorganismos del suelo más reconocidos y prolíficos dentro del dominio Bacteria (Nett *et al.*, 2009). *Streptomyces* es un género de bacterias gram-positivas, catalasa positivas, con un gran contenido de G+C en su ADN y un alto grado de diferenciación en su micelio, destacando como una de sus principales cualidades la alta capacidad para formar enzimas extracelulares y una gran variedad de metabolitos secundarios con posibles actividades antibióticas, antitumorales o inmunosupresoras (Ventura *et al.*, 2007). Estas actinobacterias producen un extenso micelio ramificado y necesitan de un aporte obligatorio de oxígeno, convirtiéndolas así en microorganismos estrictamente aerobios (Anderson *et al.*, 2001).

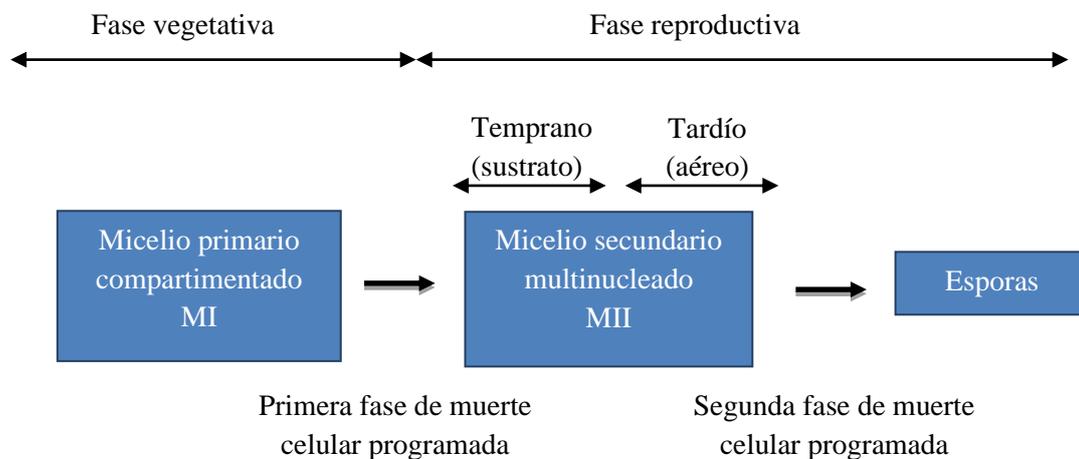
Actualmente, este género es la principal fuente de antibióticos tanto para uso médico, como para uso veterinario y agrícola (Chater, 2006). De hecho, se estima que *Streptomyces* representa un 80% de los productores naturales antibacterianos actuales en el mundo, lo que lo convierte en uno de los puntos clave para la investigación de posibles nuevos compuestos farmacológicos (Wave *et al.*, 2001). La alta producción de antibióticos de este grupo se considera un método de adaptación relacionado con la evolución del mismo en un hábitat de suelo, donde las condiciones pueden llegar a ser hostiles y altamente variables. Además, el alto número de microorganismos de otros géneros presentes en el mismo hábitat y con los cuales deben competir, se convierte en un factor adicional de presión selectiva (Chater y Chandra, 2006).

## 1.2 Ciclo de vida

Las bacterias del género *Streptomyces* son organismos con un ciclo de vida complejo que incluyen procesos de muerte celular programada, diferenciación morfológica y esporulación. Se estima que los procesos de diferenciación podrían estar estrechamente relacionados con la producción de antibióticos (Rioseras *et al.*, 2014).

La germinación de las esporas constituye el primer paso de desarrollo de *Streptomyces* y se describe como una sucesión de pasos distintivos y organizados en tres etapas: oscurecimiento, hinchamiento y emergencia del tubo germinal (Hardisson *et al.*, 1978). Posterior a la

germinación de las esporas, se desarrolla un micelio vegetativo viable, el cual se nombra MI, que crece dentro del suelo. Este micelio compartimentado sufre un proceso de muerte programada temprana, que sigue una secuencia altamente ordenada (Manteca *et al.*, 2005). A continuación, los segmentos viables de este primer micelio se diferencian a un micelio secundario o MII, que tiene como característica principal que es multinucleado. Este MII crece en el sustrato hasta que empieza a crear cubiertas hidrofóbicas y a crecer en el aire, creando así el micelio aéreo (Manteca *et al.*, 2007). Para finalizar, se produce de nuevo un ciclo de muerte celular programada, para finalmente producirse la tabicación de las hifas y crear las esporas que darán lugar a un nuevo ciclo (Figura 1) (Yagüe *et al.*, 2010).



**Figura 1:** Fases de la diferenciación y ciclo de vida en *Streptomyces*. En el esquema se indican las diferentes estructuras del micelio (MI y MII) y los puntos de muerte celular programada correspondientes a la fase vegetativa y reproductiva (Modificado de Manteca y Sánchez, 2009).

### 1.3 Metabolismo secundario. Interés en compuestos producidos por *Streptomyces*

Se pueden diferenciar dos tipos de metabolismos dentro del ciclo vital de *Streptomyces*: el metabolismo primario y el secundario. El metabolismo primario implica una serie de rutas metabólicas y vías enzimáticas interconectadas que median en vías catabólicas y anabólicas. Estas proporcionan energía e intermediarios biosintéticos necesarios para la creación de macromoléculas esenciales y son intrínsecamente similares en todos los organismos. En contraposición, dentro del metabolismo secundario nos encontramos con rutas anabólicas que producen moléculas que no son esenciales para el crecimiento del organismo productor, pero cuyas funciones están relacionadas con una mayor supervivencia del mismo. Dentro de los

metabolitos secundarios, podemos encontrarnos familias de moléculas como las quinolonas, terpenoides, tetraciclinas, etc., muchos de ellos con potencial actividad antifúngica o antibacteriana, y de interés humano por su posible contribución como principio activo de fármacos (Martin y Demain, 1980). A pesar de esta diferenciación entre metabolismos, la separación entre ambos no es tan clara dado que los metabolitos secundarios derivan de los primarios o intermediarios de estos, lo que determina que ambas vías están estrechamente relacionadas.

La biosíntesis de metabolitos secundarios empieza entre la fase exponencial, donde la población bacteriana se está multiplicando rápidamente, y la fase estacionaria, momento en el cual la curva de crecimiento disminuye (Bibb, 2005). También se ha observado como el cambio de morfología está ligado a este proceso, adquiriendo en el momento de formación de hifas multinucleadas no compartimentadas la capacidad de producir estas moléculas. La alteración de parámetros ambientales como el pH del suelo, la concentración de oxígeno, la temperatura ambiental o algún tipo de señalización de estrés, podrían ser determinantes en la expresión génica de la bacteria, alterando su ciclo fisiológico y, con ello, la producción de metabolitos. (Manteca *et al.*, 2008, Antón *et al.*, 2007).

*Streptomyces* ha sido objeto de interés constante por parte de empresas farmacéuticas e instituciones de investigación ya que es el mayor productor de antibióticos del mundo. Desde hace décadas, la búsqueda de nuevos fármacos ha sido de sumo interés, no solo con fines terapéuticos, sino también preventivos o para su uso masivo en industrias como la agricultura o la ganadera. En estos momentos se está afrontando una crisis global: la aparición de patógenos multirresistentes, así como la aparición de enfermedades emergentes y el descenso en el descubrimiento de nuevos compuestos bioactivos. Los microorganismos han adquirido multirresistencia a los antibióticos comunes a un ritmo alarmante, lo que supone un riesgo mortal en enfermedades como la neumonía, la tuberculosis y la gonorrea, las cuales hace años eran fácilmente tratables con el reservorio de fármacos existente (Zaman *et al.*, 2017).

La resistencia a los antibióticos existe desde antes de que los humanos comercializaran con fármacos. Se trata de un proceso de selección darwiniano en el cual los organismos que han desarrollado una resistencia mediante mutaciones espontáneas obtienen ventaja selectiva y se reproducen, transmitiendo a la siguiente generación los genes que le confieren esa resistencia (Shallcross *et al.*, 2015). Estos genes no tienen por qué transmitirse necesariamente de manera vertical, sino que también pueden encontrarse en elementos móviles de la bacteria como los plásmidos y los transposones, y ser así transmitidos horizontalmente por procesos como la transformación, la transducción o la conjugación (Silva *et al.*, 2006). Este proceso se ha acelerado en el mundo moderno debido al indebido consumo por parte de la población, la

prescripción errónea de fármacos y al uso extensivo en la industria principalmente. Se estima que el 80% de los antibióticos en Estados Unidos están destinados a la agricultura, acuicultura y ganadería con la finalidad de hacer más rentable la producción (Hollis *et al.*, 2013).

En el 2019 la OMS declaró la resistencia a los antimicrobianos una de las 10 principales amenazas de salud pública a las que se enfrenta la humanidad. De hecho, se estima que hoy en día las bacterias multirresistentes ya causan 700.000 muertes cada año en el mundo, y un gasto sanitario adicional de 1.500 millones de euros en Europa. En España, se aproximan los fallecimientos anuales a un número de 4.000 personas (Sociedad Española de Medicina de Urgencias y Emergencias, 2023).

Uno de los focos de infección más problemáticos son los hospitales, donde se desarrollan las enfermedades nosocomiales que causan la mayor tasa de mortalidad dentro de las patologías causadas por organismos multirresistentes. La infección ocurre en el entorno clínico y se contagia por diferentes vías como son equipos contaminados, aerosoles o el propio personal del hospital. En un entorno donde el uso de antibióticos es diario, la presión selectiva a la que son sometidos los patógenos es mucho mayor que la de aquellos microorganismos fuera del marco clínico. Bacterias como *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli* y *Actinobacter baumannii* son las predominantes en cuanto a resistencia se refiere (Xia *et al.*, 2016).

A pesar de la existencia de líneas de investigación que abarcan los inhibidores de mecanismos de resistencia como una posible solución a este problema, es crucial continuar investigando y descubriendo nuevos fármacos que puedan servir como alternativas terapéuticas. Hasta ahora, *Streptomyces* ha sido la fuente de más de dos tercios de fármacos antimicrobianos existentes, lo que nos lleva a considerar este género como una verdadera fábrica de compuestos de los cuales podemos beneficiarnos. Según un análisis estadístico, se estima que estas bacterias tienen el potencial de producir más de 15<sup>5</sup> metabolitos secundarios, de los cuales solo conocemos el 3%. Esto es debido a que muchas de las agrupaciones de biosíntesis se encuentran silenciadas en condiciones de laboratorio (Zhang *et al.*, 2017). Este bajo porcentaje resalta la importancia de investigar más a fondo este género, centrando grandes esfuerzos en activar agrupaciones biosintéticas silenciadas mediante distintas aproximaciones y así, aprovechar todas las oportunidades que este ofrece (Watve *et al.*, 2001).

## 1.4 Minería genómica

La minería genómica abarca toda la investigación bioinformática utilizada no solo para detectar la ruta sintética de productos naturales bioactivos, sino también para investigar sus posibles funciones e interacciones químicas.

En las últimas décadas, los investigadores han podido dar explicación a la biosíntesis que precede a la creación de estos compuestos. Actualmente, nos encontramos en la era genómica y de la secuenciación masiva, lo que brinda a la comunidad científica acceso a una gran cantidad de librerías y bases de datos de contenido genómico. La convergencia entre la ingeniería informática aplicada a la biología molecular y el rápido desarrollo en técnicas de secuenciación genética es clave en el desarrollo de la biología sintética y el descubrimiento de nuevos fármacos.

La minería genómica opera mediante la identificación de agrupaciones biosintéticas dentro del genoma de organismos secuenciados. Como parte de esta aproximación, se determinan las secuencias de las enzimas codificadas por estos grupos de genes, seguido de una identificación experimental de la producción de compuestos por parte de una agrupación específica. La eficacia de este proceso depende de la tecnología informática y de la cantidad de información almacenada en bases de datos de acceso público. Para optimizar esta investigación y hacerla más accesible, en la última década se han desarrollado diferentes herramientas como AntiSMASH, que utiliza un algoritmo para asociar la secuencia de clústeres o agrupaciones biosintéticas con otras previamente descritas y su función.

Una de las problemáticas que afrontan los métodos tradicionales en contraposición a la bioinformática es su ineficiencia. La búsqueda de agrupaciones genéticas con actividad biosintética, previo a la minería genómica, requería obligatoriamente de procesos experimentales en laboratorios, enfrentando desafíos como el silenciamiento de genes o la débil expresión de estos bajo ciertas condiciones. Esto hacía aumentar considerablemente el tiempo experimental y el presupuesto necesario para realizar un proyecto de investigación. Actualmente, gracias a la aparición de estas nuevas técnicas bioinformáticas, se puede obtener información que antes era desconocida por la limitación que suponía el silenciamiento de agrupaciones y adicionalmente, se permite la manipulación genética dirigida.

La minería genética surge ante la secuenciación de los genomas, motivado por la necesidad de descubrir nuevos compuestos bioactivos de manera rápida y a un costo relativamente bajo (Albarano, 2020; Wang *et al.*, 2021; Zhang *et al.*, 2017).

## 1.5 Compuestos volátiles. Interés y función

Históricamente, la investigación sobre productos naturales se centraba en compuestos solubles en agua. Sin embargo, en los últimos años, la importancia de los compuestos volátiles bioactivos ha captado la atención de la comunidad científica (Cuervo *et al.*, 2023).

Los compuestos volátiles son metabolitos químicamente diversos con características comunes: baja masa molecular, alta presión de vapor, bajo punto de ebullición y naturaleza lipófila (Rowan, 2011). En entornos microbianos complejos, las relaciones tanto entre especies como intraespecie son cruciales para mantener el equilibrio de la comunidad. Los metabolitos secundarios, y entre ellos los compuestos volátiles, por su capacidad de actuar como mensajeros químicos de acción rápida, desempeñan un papel fundamental en este equilibrio al participar en la señalización o en respuestas defensivas, como puede ser mediante la producción de antibióticos (de Lima Proscópio *et al.*, 2011).

*Streptomyces* ha evolucionado con el tiempo para adaptarse y sobrevivir en un entorno altamente competitivo, produciendo una gran cantidad de metabolitos especializados. Entre ellos, encontramos una amplia variedad de compuestos volátiles con diferentes propiedades, dentro de las cuales resaltamos las antibacterianas y antifúngicas. Estos compuestos volátiles ejercen su acción a distancias mucho mayores que los compuestos solubles. Dado que la mayoría de los suelos no están saturados de agua, la dispersión de compuestos solubles está restringida a distancias cortas. Por lo contrario, la abundancia de poros en el suelo sugiere la importancia del papel que pueden llegar a desempeñar los compuestos volátiles en ese tipo de hábitat.

Estos compuestos no han sido tan extensamente estudiados dados los desafíos asociados a su análisis por su naturaleza gaseosa, como son la falta de equipos y metodologías estandarizadas a un costo asequible. En este estudio se evaluó la producción de compuestos volátiles mediante la absorción de estos metabolitos con carbón activo y su posterior análisis por cromatografía de gases-masas (GC-MS).

La urgente necesidad de nuevos compuestos bioactivos convierte a los volátiles en un nuevo campo prometedor y que hasta el momento ha sido poco explorado (Cuervo *et al.*, 2022; Cuervo *et al.*, 2023).

## 1.6 Terpenos

Los terpenos, también llamados isoprenoides, constituyen la familia más extensa de productos naturales, con más de 95.000 compuestos identificados (Faylo *et al.*, 2021). Se encuentran principalmente en plantas y hongos y son constituyentes esenciales de tanto el metabolismo primario como del secundario. Son reconocidos por tener amplia variedad de funciones, que abarcan desde la capacidad de sintetizar esteroides, vitaminas, sabores y fragancias, hasta su implicación en la producción de algunos de los fármacos más exitosos (Rudolf *et al.*, 2021).

Durante la última década, se ha evidenciado que los terpenos también son producidos por diversas bacterias, especialmente por microorganismos que habitan en el suelo, como *Streptomyces* y otros actinomicetos, pudiendo presentarse tanto en forma soluble como volátil. El uso de técnicas innovadoras, como la minería genómica, ha revelado la presencia de secuencias de proteínas conservadas que contienen un conjunto de dominios funcionales característicos de todas las terpeno sintasas (Cane y Ikeda, 2012). No obstante, el reducido número de terpenos descritos en bacterias en comparación con otros organismos plantea varias hipótesis. Una de ellas sugiere que estas no han desarrollado un metabolismo secundario terpenoide en la misma medida que otros organismos. Otra posibilidad es la existencia de un estricto control regulatorio sobre las vías biosintéticas de terpenos, lo que impide su expresión en condiciones de fermentación de laboratorio. Por último, se propone también que hasta el momento la comunidad científica no ha destinado los recursos necesarios para el descubrimiento a gran escala de terpenos bacterianos (Rudolf *et al.*, 2021).

Las amplias aplicaciones de los terpenos y la capacidad de análisis con herramientas bioinformáticas plantean un campo de investigación prometedor para el desarrollo de fármacos, especialmente enfocado en los compuestos volátiles producidos por actinomicetos, ya que hasta el momento su estudio no ha sido tan extenso como en plantas.

## 2. OBJETIVOS

El género *Streptomyces* es ampliamente reconocido por el sector biotecnológico por su destacada capacidad de producción de compuestos antimicrobianos, siendo históricamente el más prolífico en ese aspecto. El objetivo de esta investigación radica en la identificación del compuesto producido por un clúster específico. Para ello, se construyó un plásmido CRISPR-Cas 9 diseñado para eliminar el gen terpeno ciclasa del clúster 11.1 de la cepa *Streptomyces*

CS227, seleccionado debido a la baja homología con otras agrupaciones previamente descritas. Para llevar a cabo el procedimiento experimental, se diseña, construye y ensambla el plásmido requerido, para transferirlo a la cepa de trabajo. La identificación de este metabolito se basará en la comparación de los perfiles metabólicos obtenidos mediante cromatografía de gases-masas de la cepa mutante y la silvestre.

### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1 Cepas y medios de cultivo

Para llevar a cabo este estudio, se utilizó la cepa *Streptomyces* CS227, aislada de la superficie de la cutícula de las hormigas cortadoras de hojas de la tribu *Attini* en Perú. Esta cepa fue seleccionada como objeto de estudio para a partir de ella generar un mutante eliminando el gen terpeno ciclasa *ctg1\_1717* del clúster 11.1. Para la obtención de esporas se empleó el medio MS, constituido por 20 g/L de agar, 20 g/L de manitol y 20 g/L de harina de soja (Hobbs *et al.*, 1989).

Para albergar la construcción de los plásmidos se empleó la cepa *Escherichia coli-DH5 $\alpha$* , termocompetente y capaz de introducir ADN mediante choque térmico. Esta cepa se cultiva en medio 2xTY conteniendo los correspondientes antibióticos, cuya composición es 16 g de triptona, 5 g de cloruro sódico (NaCl) y 10 g extracto de levadura por cada litro de medio. Para medio sólido se añade 20 g/L de agar.

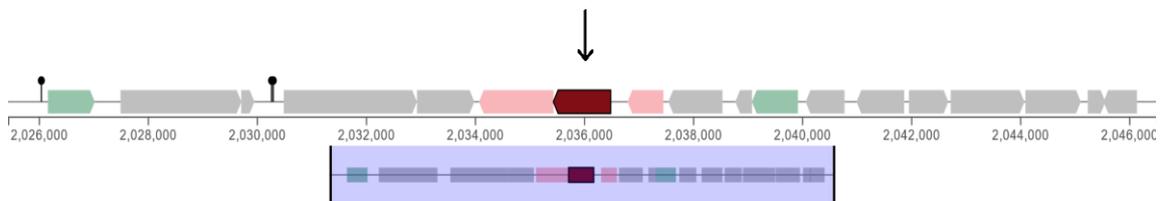
Las condiciones de incubación para las cepas de *E. coli* fueron de 37°C durante 24 horas mientras que en el caso de *Streptomyces*, la temperatura requerida fue de 30°C durante 5 días.

#### 3.2 Recursos bioinformáticos

La selección de la agrupación usada en este trabajo se realizó mediante un análisis bioinformático haciendo uso de la herramienta AntiSMASH, la cual permite la rápida identificación, anotación y análisis de todos los genes de biosíntesis de metabolitos secundarios en genomas de bacterias y hongos (Medema *et al.*, 2011). Gracias a este programa deducimos los posibles productos de los diferentes clústeres a lo largo del genoma, seleccionando uno determinado que tenga como función la producción de un terpeno.

En este trabajo, el clúster de interés es el 11.1 (Figura 2), ya que según el análisis informático ofrecido por AntiSMASH presenta únicamente un 25% de homología con otras agrupaciones ya

descritas. Posteriormente se realizó otro análisis bioinformático mediante el *software* BLAST, analizando únicamente la secuencia del gen terpeno ciclasa de la agrupación. En este caso, se observó un resultado de un 96,6% de identidad con el gen terpeno ciclasa de otro *Streptomyces*, en concreto con la epi-isozizaeno sintasa. La baja homología con otras agrupaciones descritas y el alto porcentaje de identidad con el gen terpeno ciclasa de otro actinomiceto nos sugiere dos posibilidades, que la agrupación a estudio esté implicada en la síntesis de un compuesto desconocido o, que esta guarde relación con el gen con el cual a través del análisis ha mostrado una alta identidad.



**Figura 2:** Estructura del cluster 11.1 de la cepa *Streptomyces* CS227. Imágenes obtenidas del programa AntiSMASH. La flecha negra indica la localización del gen terpeno ciclasa *ctg1\_1717* que se elimina en la cepa mutante.

### 3.3 Estrategia experimental

En este proceso experimental se usa la técnica del sistema de edición génica CRISPR-Cas-9, con el objetivo de eliminar el gen terpeno ciclasa de una agrupación en concreto. Para realizar esto trabajamos con dos plásmidos: pSEVA-CRISPR y pSEVA88C1-C18, ambos con orígenes de replicación tanto para *E. coli* como para *Streptomyces* y con marcadores de resistencia para antibióticos (Magadán-Corpas *et al.*, 2023).

La estrategia a seguir en este proyecto inicia construyendo el vector pSEVA-CRISPR junto al ARN guía a través del programa *Golden Gate*. A continuación, se lleva a cabo un proceso de transformación en células de *E. coli* competentes empleando este organismo como hospedador para el proceso de construcción de los plásmidos, a partir del cual se extrae y purifica el ADN plasmídico. El vector pSEVA88C1-C18 es usado como plásmido intermedio para clonar en él los fragmentos adyacentes al gen terpeno ciclasa mediante el ensamblaje de Gibson. Posteriormente, se digiere enzimáticamente para obtener un segmento que contiene los fragmentos adyacentes. Una vez obtenidos, se purifican y se clonan junto al plásmido pSEVA-CRISPR que contiene el ARN guía mediante un proceso de ligación. El resultado de esto será la obtención de un plásmido capaz de eliminar el gen terpeno ciclasa del clúster seleccionado.

El diseño de los plásmidos y los procedimientos a llevar a cabo fueron diseñados por Magadán-Corpas (Magadán-Corpas *et al.*, 2023).

### 3.4 Construcción del , plásmido pSEVA-CRISPR con el ARN guía

#### 3.4.1 Diseño y clonación del ARN guía

El diseño del ARN guía se llevó a cabo con la ayuda de la herramienta informática CRISPy-web (<https://crispy.secondarymetabolites.org/#/input>) (Blin *et al.*, 2016).

ARN Guía= 5'-ACGGCGCAGTTCGATGTATT-3'

Para el diseño de los oligonucleótidos se añadieron colas que permitirán posteriormente la ligación con el vector digerido por BbsI (Figura 3), dando como resultado los siguientes fragmentos:

Oligonucleótidos en sentido directo: 5'- ACGCACGGCGCAGTTCGATGTATT-3'

Oligonucleótidos en antisentido: 3'-TGCCGCGTCAAGCTACATAACAAA-5'

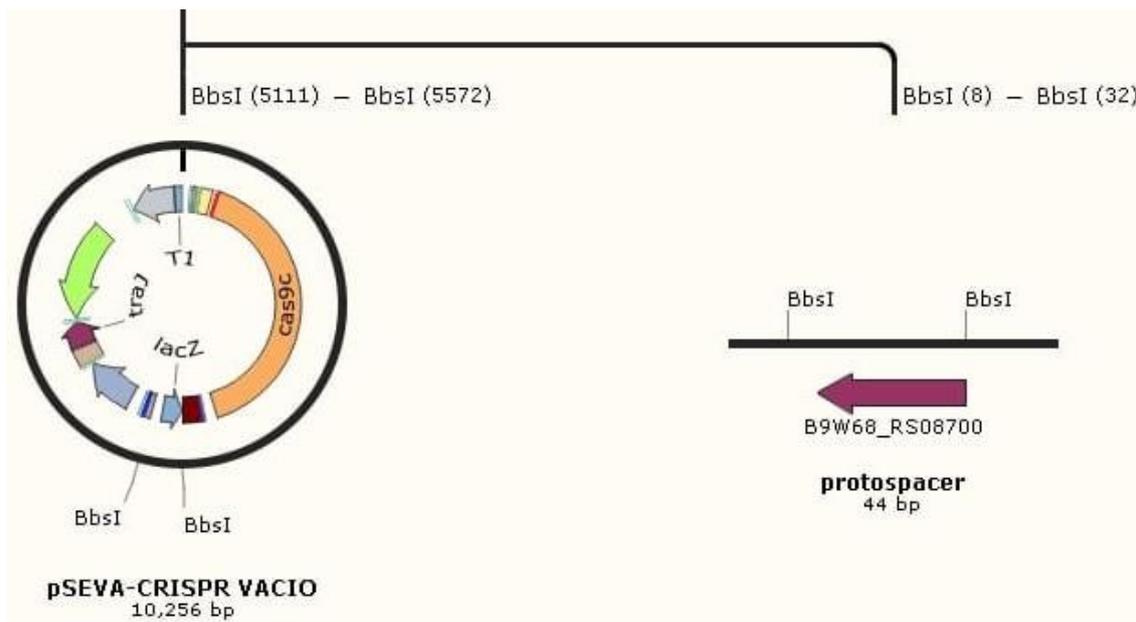
Se inicia la construcción del ARN guía con la mezcla de 1  $\mu$ L del oligonucleótido en sentido directo (100  $\mu$ M) con 1  $\mu$ L del oligonucleótido antisentido (100  $\mu$ M) y 18  $\mu$ L de HEPES (pH=7,5). En el termociclador esta muestra se somete al siguiente ciclo: 95°C durante 5 minutos y posteriormente y hasta alcanzar los 4° un descenso de temperatura de 0,1°C/seg. Finalmente, se inserta en el vector pSEVA-CRISPR gracias al programa *Golden Gate* (Tabla 1), que permite el clonaje del ARN guía al vector gracias al corte molecular de la enzima de restricción BbsI y a la ligación llevada a cabo por la ligasa T4 (Figura 4).

Para llevar a cabo este proceso se precisa de la siguiente proporción:

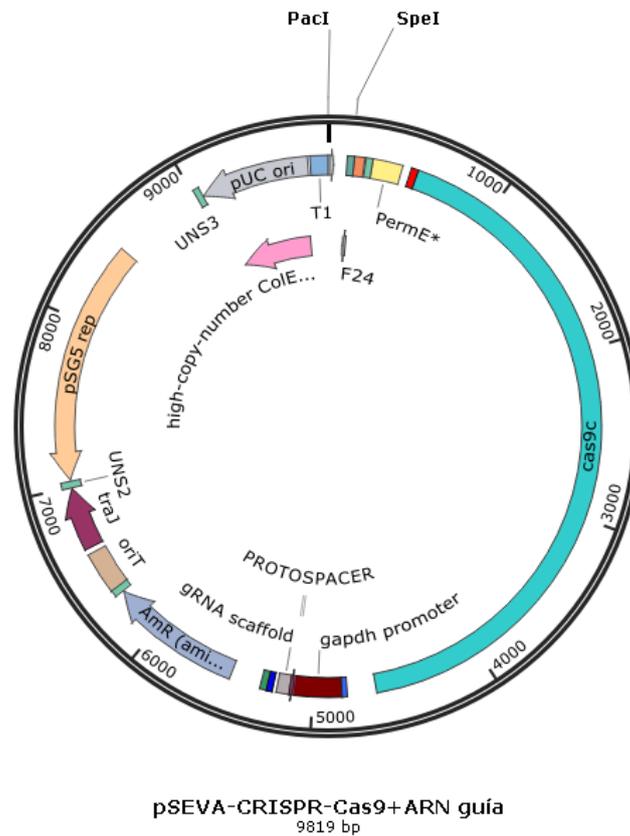
- 0,72  $\mu$ L de pSEVA-CRISPR (138,6 ng/ $\mu$ L)
- 0,3  $\mu$ L de oligonucleótidos del ARN guía
- 2  $\mu$ L de tampón de la ligasa T4
- 1  $\mu$ L de ligasa T4
- 1  $\mu$ L del enzima de restricción BbsI
- H<sub>2</sub>O hasta completar un volumen final de reacción de 20  $\mu$ L

**Tabla 1:** Programa en el termociclador para *Golden Gate*. Se indican tiempos y temperaturas.

TEMPERATURA (°C)	TIEMPO (minutos)
37	10
16	10
Volver al paso I	X9
50	5
65	20
4	∞



**Figura 3:** Esquema de la inserción del ARN guía (protospacer) al vector pSEVA-CRISPR mediante la enzima de restricción BbsI. Esquema hecho con *SnapGene*.



**Figura 4:** Mapa del plásmido pSEVA-CRISPR obtenido. Se muestra el lugar de inserción del ARN guía (protospacer) y los sitios de corte de las enzimas de restricción SpeI y PacI. Mapa hecho con *SnapGene*.

### 3.4.2 Transformación en células competentes *E. coli DH5α*

La introducción del plásmido pSEVA-CRISPR+ARN guía en *E. coli* se lleva a cabo mediante un proceso de choque térmico. Se inoculan 2  $\mu$ L de plásmido en un vial de *E. coli DH5α* competentes, previamente conservadas a  $-80^{\circ}\text{C}$ , y se mantienen en hielo durante 20 minutos. Estas células son capaces de adquirir ADN extraño debido a la modificación de la permeabilidad de su membrana que permite que se abra el poro para la inserción del material extraño mediante choque térmico.

Posteriormente, se introducen en un baño caliente a  $42^{\circ}\text{C}$  durante 45 segundos y se mantiene el tubo en hielo durante 2 minutos más. Una vez terminado el proceso, se cultiva durante una hora en 1 mL de medio 2xTY líquido con una agitación de 250 rpm y una temperatura de  $37^{\circ}\text{C}$ .

Estas células se siembran en medio 2xTY conteniendo 100  $\mu\text{g/mL}$  de apramicina y 40  $\mu\text{g/mL}$  de X-Gal. La apramicina seleccionará aquellas bacterias que hayan adquirido correctamente el plásmido pSEVA-CRISPR, ya que contiene genes que le confieren resistencia a este antibiótico.

La adición de X-Gal, permite diferenciar visualmente por cambio de coloración las colonias en las que se ha insertado el plásmido pSEVA-CRISPR+ARN guía de aquellas en las que se ha insertado el vector vacío. Esto ocurre debido a la presencia en el vector del gen *lacZ*, que codifica para  $\beta$ -galactosidasa, que metaboliza el X-Gal dando lugar a un pigmento de coloración azul. La inserción del ARN guía en el vector, interrumpe el gen *lacZ*, por lo que no se genera el pigmento azul, permitiendo así discernir las colonias que contienen el plásmido pSEVA-CRISPR con el ARN guía correctamente insertado.

Posteriormente se incuban 8 horas a 37°C.

### 3.4.3 Extracción de ADN plasmídico (Minipreparación)

Una vez observado crecimiento en las placas se pican dos colonias no azules y las incubamos en medio 2xTY líquido conteniendo 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de apramicina a 250 rpm y 37°C. Al día siguiente recuperamos los tubos incubados y se lleva a cabo la extracción de ADN plasmídico. Esto se realiza utilizando el kit GeneJET Plasmid Miniprep Kit, siguiendo el procedimiento indicado por la casa comercial (Thermo Scientific).

Finalmente, y para comprobar la correcta inserción del ARN guía en el plásmido pSEVA-CRISPR, se preparan dos muestras de ADN plasmídico extraído y se envían a una empresa externa (Stab Vida) donde se llevará a cabo la secuenciación. Para preparar los tubos cuantificamos el ADN obtenido mediante espectrofotometría empleando un equipo Thermo Scientific NanoDrop. Se prepara un volumen de 10  $\mu\text{L}$  de ADN plasmídico a una concentración de 500  $\text{ng}/\mu\text{L}$  (concentración requerida para la secuenciación de plásmidos según la casa comercial), se añaden 3  $\mu\text{L}$  de cebador en dilución 1:10 y se etiquetan correctamente para su envío.

Cebador empleado: 5'-CAAATCCAGATGGAGTAA-3'

### 3.4.4 Digestión enzimática del plásmido obtenido

La digestión enzimática se realiza para posteriormente construir el plásmido final junto a los fragmentos adyacentes. Para ello, se usan las enzimas de restricción SpeI y PacI que cortan en regiones específicas de la secuencia.

Para ejecutar este proceso se precisa de la siguiente proporción:

- 40  $\mu\text{L}$  de DNA plasmídico obtenido por extracción de *E. coli*
- 2  $\mu\text{L}$  de RNAsa

- 3  $\mu\text{L}$  de la enzima de restricción PacI
- 3  $\mu\text{L}$  de la enzima de restricción SpeI
- 10  $\mu\text{L}$  de tampón
- $\text{H}_2\text{O}$  hasta completar un volumen final de reacción de 100  $\mu\text{L}$

Posteriormente se incubaba en un termobloque a 37 °C durante 1 hora.

### 3.4.5 Purificación de ADN

La purificación de ADN se realiza a partir de los 100  $\mu\text{L}$  de plásmido obtenido en la digestión a los que se añaden 100  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{O}$ . A esta dilución se le añaden 100  $\mu\text{L}$  de fenol, otros 100  $\mu\text{L}$  de cloroformo: isoamílico (proporción 24:1), y se centrifuga a 13 200 rpm durante dos minutos. Se obtienen dos fases de las cuales se recupera la fase acuosa superior, donde se encuentra el ADN extraído, para pasarla a un nuevo tubo. A este nuevo tubo (contiene aproximadamente 200  $\mu\text{L}$ ) se le añaden 200  $\mu\text{L}$  de cloroformo: isoamílico (24:1) y se vuelve a centrifugar a 13 200 rpm durante dos minutos. De nuevo se recupera la fase superior y se lleva a un tubo nuevo en el cual se añade una décima parte de acetato de sodio, en este caso unos 18  $\mu\text{L}$ , y 2,5 volúmenes de etanol frío, 450  $\mu\text{L}$ . Esta mezcla se congela durante media hora a -80°C para que precipite el ADN. A continuación, se centrifuga durante 20 minutos a 13 200 rpm y a una temperatura de 4°C, se descarta el sobrenadante y se lava con 200  $\mu\text{L}$  de etanol al 70%. Se vuelve a centrifugar durante un minuto. Para finalizar se descarta todo el sobrenadante y se deja evaporar en una estufa. Como paso final, se resuspende el producto obtenido en 50  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{O}$ .

### 3.5 Construcción del plásmido pSEVA 88C1-C18 intermedio

La construcción del plásmido intermedio pSEVA88C1-C18 se lleva a cabo para clonar los fragmentos adyacentes aguas arriba y aguas abajo del gen terpeno ciclasa por ensamblaje de Gibson. Una vez realizado, se digiere con las enzimas de restricción SpeI y PacI.

Inicialmente, se diseñan los cebadores de los fragmentos adyacentes (A y B) (Tabla 2) seleccionando dos secuencias de ADN que flanquean el gen terpeno ciclasa para su posterior amplificación. Esta la llevamos a cabo por una Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) haciendo uso de la enzima Taq polimerasa (Thermo Scientific) (Tabla 3).

**Tabla 2:** Secuencias de los cebadores usados para la amplificación de los fragmentos adyacentes A y B.

CEBADORES	SECUENCIAS
A Fw	5'-CAAGACGCTGGCTCTGACATTTCCGCTACTGAACTACTC GGCAGGACACGGAGCAGCA-3'
A Rw	5'-CCAGGTGGTTGATGGGTTGATTGCTTTGGTTGAGACGAG GGACCTTGTCGGCGGGCAT-3'
B Fw	5'-CCTCGTCTCAACCAAAGCAATCAACCCATCAACCACCTG GGTCAGCGACCTGGCAGGT-3'
B Rw	5'-TATGTGACCGTAGAGTATTCTTAGGTGGCAGCGAACGAG GTGTACGGCTCGCAGAAC-3'

Para llevar a cabo la amplificación vamos a diluir en 75,7  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{O}$  la siguiente mezcla de reactivos: 10  $\mu\text{L}$  de DreamTaq Green Bufferx10, 0,8  $\mu\text{L}$  de desoxinucleótidos (dNTPs), 2  $\mu\text{L}$  de cebador Fw 1:10, 2  $\mu\text{L}$  de primer Rw 1:10, 0,5  $\mu\text{L}$  de la enzima Taq polimerasa, 5  $\mu\text{L}$  de DMSO y 4  $\mu\text{L}$  de ADN molde.

Los cebadores cuentan con una temperatura de melting ( $T_m$ ) de  $57^\circ\text{C}$  y precisan de un tiempo de extensión de 1,5 minutos (ya que la enzima Taq requiere 1 min/kb de tiempo de extensión) para la amplificación del fragmento adyacente aguas arriba (cebadores A Fw y A Rw); y requieren una  $T_m$  de  $55^\circ\text{C}$  y un tiempo de extensión de 2 minutos para la amplificación del fragmento adyacente aguas abajo (cebadores B Fw y B Rw).

**Tabla 3:** Programa del termociclador para la amplificación de los fragmentos adyacentes A y B. Se indican fases, ciclos, temperatura y tiempo.

FASE	CICLOS	TEMPERATURA (C°)	TIEMPO
Desnaturalización	1	95	5 min
Desnaturalización	25	95	30 s
Anillamiento		Tm	30 s
Extensión		72	60 s/Kb
Extensión final	1	72	10 min
Enfriamiento	1	15	∞

### 3.5.1 Electroforesis

La electroforesis se lleva a cabo para comprobar la correcta amplificación por PCR del fragmento adyacente aguas arriba (1089 pb) y el adyacente aguas abajo (1690 pb).

Para la preparación de un gel, se emplean 50 mL de tampón TAE 0,5X (20 mM Tris, 10 mM ácido acético, 0,5 mM EDTA) con agarosa en polvo al 0,8%. Se calienta la mezcla para su disolución y se añaden 2 µL de tinte *RedSafe*, que permitirá que se vean posteriormente las bandas bajo la luz ultravioleta. Posteriormente se vierte a un soporte con el peine para formar los pocillos donde se cargan las muestras. Una vez solidificado el gel, se retira el peine y se cargan las muestras. Como marcador se emplean 5 µL de *GeneRuler* (Thermo Scientific). La electroforesis se lleva a cabo en cubetas horizontales a 90 mV de voltaje constante durante aproximadamente 40 minutos. Para visualizar los resultados colocaremos el gel en un transiluminador y se comparan las bandas obtenidas con el patrón que ofrece el marcador.

### 3.5.2 Purificación de fragmentos de ADN a partir de geles de agarosa

Una vez obtenidos los fragmentos, se procede a purificar las bandas correspondientes de los fragmentos de interés a partir del gel de agarosa expuesto en el apartado anterior. Para ello, se

cortan las bandas con un bisturí y se pesan para calcular la proporción de reactivos a usar en los siguientes pasos. En este procedimiento se hace uso del kit comercial GeneJET Gel Extraction Kit, siguiendo el procedimiento sugerido por su fabricante (Thermo Scientific). Finalmente, se mide la concentración de ADN obtenida mediante espectrofotometría usando NanoDrop y se envía a secuenciar a una empresa externa (Stab Vida) para comprobar la correcta obtención de los fragmentos. Para la secuenciación se necesita un volumen de la purificación del fragmento de 10 µL con una concentración de 20 ng/µL (concentración requerida para productos de PCR por la casa comercial) y, al que se le añaden 3 µL de primer, indiferentemente Fw A o Rw B.

### 3.5.3 Clonaje por ensamblaje de Gibson

El clonaje del plásmido pSEVA88C1-C18 junto a los fragmentos adyacentes se lleva a cabo mediante ensamblaje de Gibson®. Este procedimiento se basa en el ensamblaje de varios amplicones por homología de secuencias. El cálculo de las proporciones para llevar a cabo la reacción es preciso, teniendo en cuenta pares de bases y concentración de cada fragmento, empleando para esto el equipo de espectrofotometría ThermoFisher NanoDrop.

Para amplificar el vector pSEVA88C1-C18 se han usado los siguientes cebadores:

Cebador sentido directo 5'-CTCGTTCGCTGCCACCTAAGAATACTCTACGGTCACATAC  
AAGCTTGCGGCCGCGTCG-3'

Cebador antisentido: 5'- CGAGTAGTTCAGTAGCGGAAATGTCAGAGCCAGCGTCTTGC  
CTAGGCGGCCTCCTGTG-3'

Características de cada fragmento:

Vector pSEVA88C1-C18:	4839 pb	ng/ µL=37,9
Fragmento Adyacente:	1089 pb	ng/ µL=39,3
Fragmento Adyacente:	1690 pb	ng/ µL=145,8

Las proporciones calculadas para estos datos han sido:

- 1,32 µL del vector pSEVA 88-C18
- 0,58 µL de fragmento adyacente aguas arriba (1089 pb)
- 0,24 µL de fragmento adyacente aguas abajo (1690 pb)

- 10  $\mu\text{L}$  de mezcla maestra Gibson Assembly®
- $\text{H}_2\text{O}$  hasta completar un volumen final de reacción de 20  $\mu\text{L}$

Se incuba en un termociclador durante 1 hora a 50°C. Posteriormente, se lleva a cabo una transformación en *E.coli DH5 $\alpha$*  como fue descrito en el punto 3.4.3, con la única diferencia de que en este procedimiento se inoculará el volumen total (20  $\mu\text{L}$ ) al vial de las células competentes.

Se incuba este vial durante una hora en 600  $\mu\text{L}$  de medio 2xTY y posteriormente se siembra en placas preparadas de este mismo medio conteniendo 100  $\mu\text{g/mL}$  de apramicina.

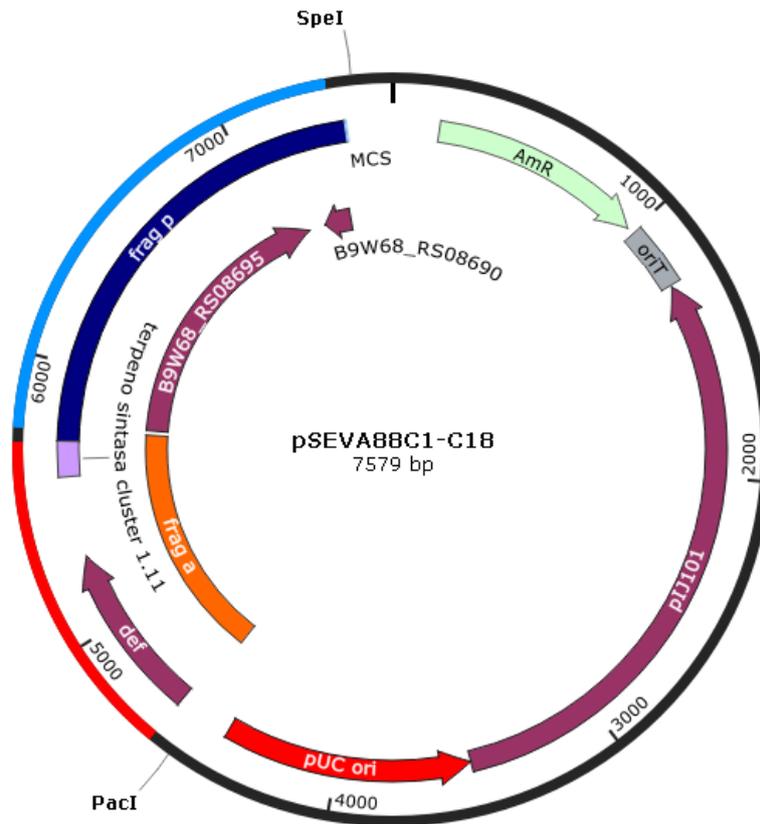
#### 3.5.4 Digestión del plásmido pSEVA88C1-C18

A partir del ADN extraído, realizamos la digestión del plásmido pSEVA88C1-C18 con las enzimas de restricción PacI y SpeI (Fig. 5).

Para llevar a cabo este proceso se precisa de la siguiente proporción:

- 10  $\mu\text{L}$  de DNA plasmídico
- 0,4  $\mu\text{L}$  de RNAsa
- 0,3  $\mu\text{L}$  de la enzima de restricción PacI
- 0,3  $\mu\text{L}$  de la enzima de restricción SpeI
- 2  $\mu\text{L}$  de tampón
- $\text{H}_2\text{O}$  hasta completar un volumen final de reacción de 20  $\mu\text{L}$

Posteriormente se incubará en un termobloque durante una hora a 37 °C.



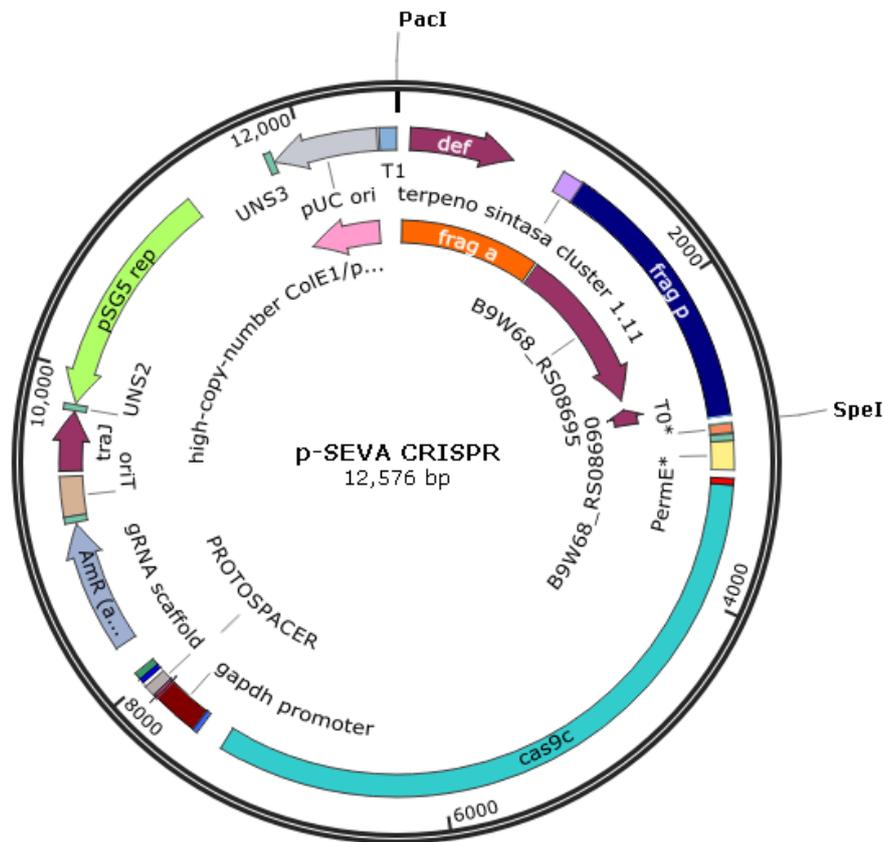
**Figura 5:** Mapa del plásmido pSEVA88C1-C18. Se muestra el lugar de inserción de los fragmentos adyacente aguas arriba en naranja y adyacente aguas abajo en azul oscuro. Se indican sitios de corte realizados durante la digestión por las enzimas de restricción SpeI y PacI. Mapa hecho con *SnapGene*.

### 3.6 Construcción del plásmido pSEVA-CRISPR final

Para obtener el plásmido final, pSEVA-CRISPR (Figura 6), se lleva a cabo una ligación del plásmido pSEVA-CRISPR conteniendo el ARN guía y los fragmentos adyacentes. En el punto anterior se obtuvo en bloque los fragmentos adyacentes al gen gracias a la digestión por las enzimas de restricción SpeI y PacI, las mismas usadas en la digestión del plásmido pSEVA-CRISPR conteniendo el ARN guía en el punto 3.4.4. Posteriormente, se realiza una electroforesis para obtener y purificar la secuencia de ADN correspondiente a los fragmentos adyacentes en bloque a partir del gel de agarosa (procedimiento descrito en el punto 3.5.1 y 3.5.2).

Para realizar la ligación se añade un volumen de los fragmentos obtenidos y de plásmido purificado en proporción 3:1 (proporción usada para extremos cohesivos) hasta un volumen

final de 10  $\mu$ L. Las proporciones empleadas fueron las sugeridas por la herramienta *NEBioCalculator* (New England Biolabs™) en base a la longitud (pb= pares de bases) del inserto y la longitud (pb) y concentración del vector. Las concentraciones fueron determinadas por el equipo ThermoFisher NanoDrop. Se completa la reacción con 2  $\mu$ L de ligasa T4 y 4  $\mu$ L de tampón y se incuba 8 horas a temperatura ambiente.



**Figura 6:** Mapa del plásmido pSEVA-CRISPR final. Se muestra el lugar de inserción del ARN guía (Protospacer), el fragmento adyacente aguas arriba en naranja y el adyacente aguas abajo en azul oscuro. Se indican los sitios de corte de las enzimas de restricción SpeI y PacI. Mapa hecho con *SnapGene*.

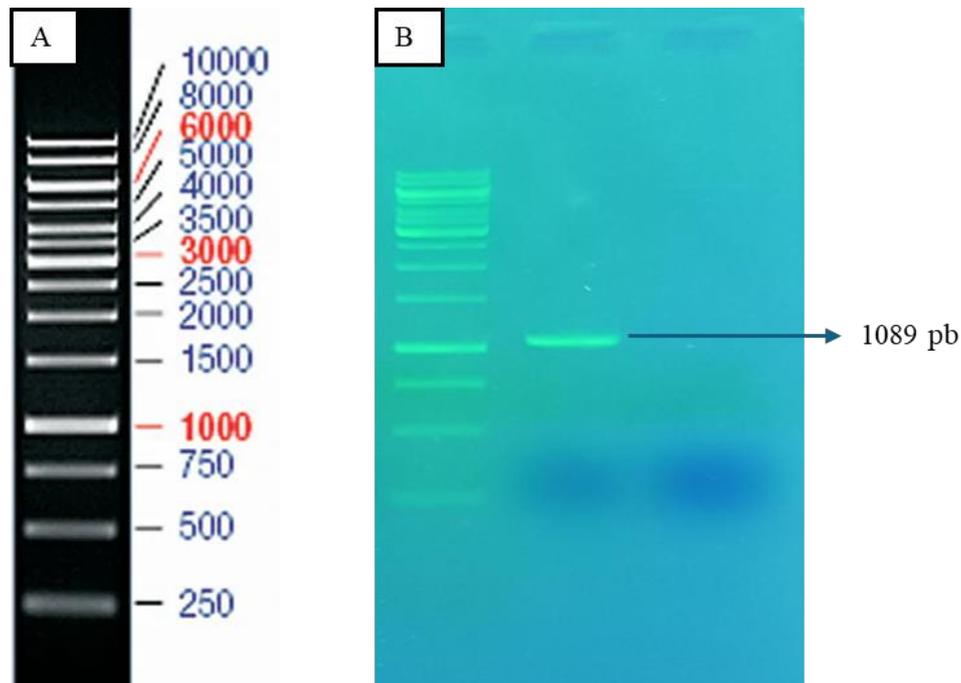
## 4. RESULTADOS

### 4.1 Comprobación de la amplificación de los fragmentos adyacentes

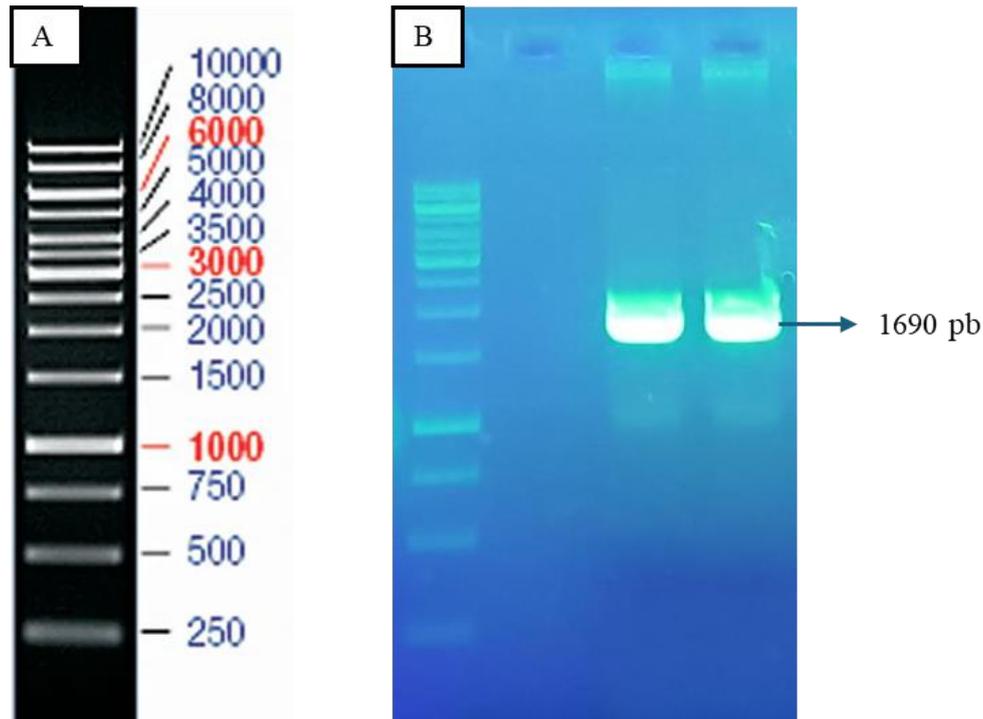
Una vez realizada la amplificación de los fragmentos adyacentes aguas arriba y aguas abajo al gen mediante PCR, se lleva a cabo una electroforesis para su posterior comprobación bajo un transiluminador.

El resultado de la amplificación del fragmento adyacente aguas arriba se muestra en la Figura 7, donde se observa una banda obtenida de un tamaño de 1089 pb, correspondiente a lo esperado.

En la Figura 8 se muestra la banda respectiva a la amplificación del fragmento adyacente aguas abajo, con un tamaño de 1690 pb.



**Figura 6:** A. Patrón de bandeos *GeneRuler 1 Kb DNA Ladder* de la casa comercial *Thermo Scientific*. B. Comprobación mediante PCR de la amplificación del fragmento adyacente aguas arriba. De izquierda a derecha, en el primer carril se observa el marcador comercial *GeneRuler*; en el segundo, se observa la banda correspondiente al fragmento adyacente aguas arriba amplificado con un tamaño de 1089 pb.



**Figura 7:** A. Patrón de bandeo *GeneRuler 1 Kb DNA Ladder* de la casa comercial *Thermo Scientific*. B. Comprobación mediante PCR de la amplificación del fragmento adyacente aguas abajo. De izquierda a derecha, en el primer carril se observa el marcador comercial *GeneRuler*; en el segundo, se observa la banda correspondiente al fragmento adyacente aguas abajo amplificado con un tamaño de 1690 pb.

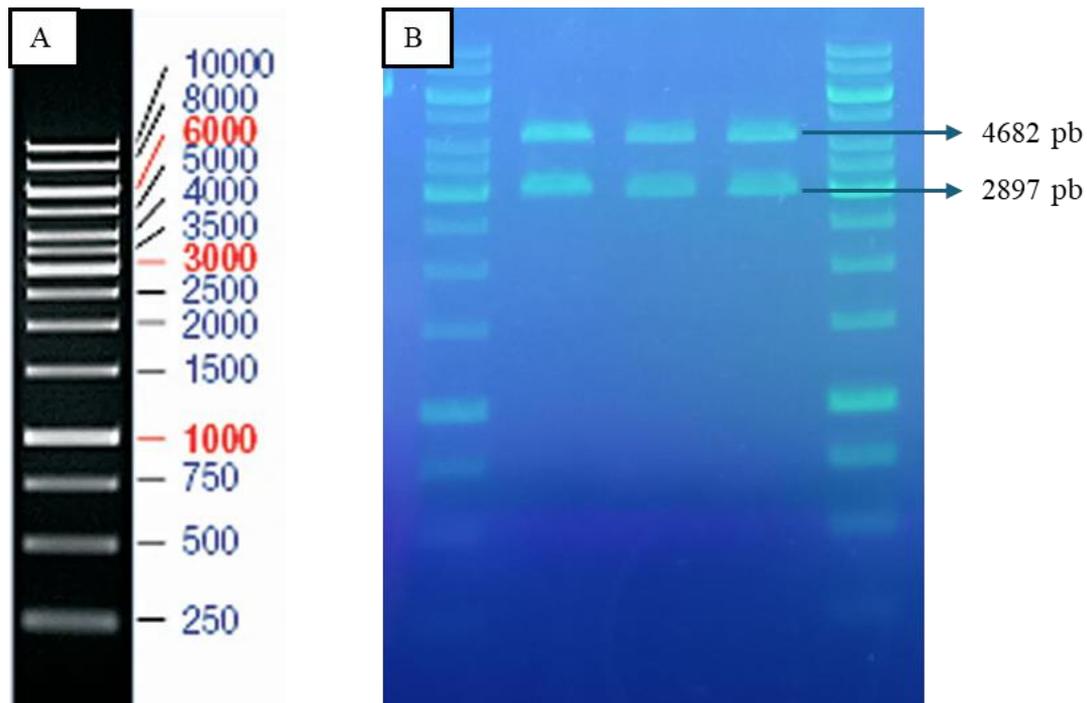
#### 4.2 Comprobación enzimática de la construcción del plásmido pSEVA88C1-C18

La construcción del plásmido pSEVA88C1-C18 junto a los fragmentos adyacentes se comprueba mediante una digestión enzimática. Para ello se usan las enzimas de restricción *PacI* y *SpeI*, que cortan dos secuencias concretas del plásmido que flanquean los fragmentos.

Secuencia de reconocimiento de *PacI*: 5'-TTAATTAA-3'

Secuencia de reconocimiento de *SpeI*: 5'-ACTAGT-3'

Como resultado podemos observar en la Figura 8 la presencia de dos bandas. Una de ellas corresponde a la sección cortada por las enzimas *PacI* y *SpeI* donde se encuentra la secuencia de los fragmentos, con un tamaño de 2897 pb. Por encima de esta, se muestra una banda de mayor tamaño, con 4682 pb, y que corresponde a la secuencia del plásmido sin el fragmento anteriormente descrito.



**Figura 8:** A. Patrón de bandeo *GeneRuler 1 Kb DNA Ladder* de la casa comercial *Thermo Scientific*. B. Comprobación mediante digestión enzimática de la construcción del plásmido pSEVA88C1-C18 junto a los fragmentos adyacentes. De izquierda a derecha, en el primer carril se observa el marcador comercial *GeneRuler*; en el segundo, tercero y cuarto se observa el resultado por triplicado de las bandas obtenidas tras la digestión con los enzimas *SpeI* y *PacI*; en el cuarto carril se muestra repetidamente el marcador *GeneRuler*.

## 5. DISCUSIÓN

Una vez construido el plásmido final pSEVA-CRISPR, el proyecto continúa con el objetivo de conseguir el mutante para finalmente comparar su perfil metabólico con el de la cepa silvestre. Aunque por motivos de problemática experimental no han podido ser descritos anteriormente por falta de resultados propios, se detalla a continuación el procedimiento a seguir.

Tras obtener el plásmido final, pSEVA-CRISPR, se lleva a cabo una transformación en células *E. coli ET-12567 pUZ-8002* electrocompetentes mediante un proceso de electroporación. Las células obtenidas se siembran en medio 2xTY conteniendo 50 µg/mL de concentración de apramicina, 25 µg/mL de cloranfenicol y 50 µg/mL kanamicina, y se incuban durante 8 horas a 37°C para seleccionar aquellas que contengan la resistencia del plásmido. Una vez que haya crecimiento visible de colonias, se realiza una comprobación por PCR.

Si la comprobación da un resultado positivo, se transfiere el plásmido por conjugación a *Streptomyces sp.*

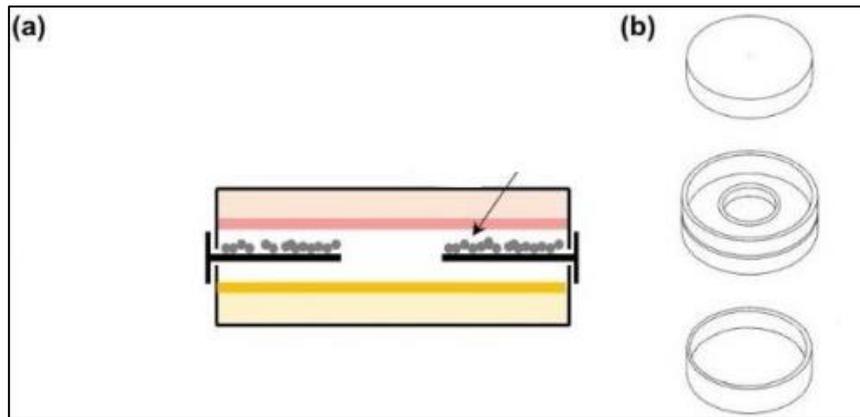
El siguiente paso es la extracción de ADN genómico de las colonias obtenidas para comprobar la delección del gen objetivo. La extracción se realiza mediante procesos mecánicos, para lograr la lisis celular, seguido de procesos químicos para la obtención del ADN. Se centrifuga el resultado obtenido para precipitar la muestra y se resuspende el pellet resultante en agua.

La comprobación de la delección del gen terpeno ciclasa se lleva a cabo mediante dos pruebas de PCR.

1. PCR del fragmento completo: en esta prueba se diseñan cebadores que flanquean aguas arriba y aguas abajo los fragmentos adyacentes A y B. La comprobación se realiza comparando el tamaño del fragmento resultante, que será de menor tamaño en caso de ser un resultado favorable debido a la sustracción de pares de bases pertenecientes al gen terpeno ciclasa.
2. PCR del gen terpeno ciclasa: en este caso, se lleva a cabo la amplificación del gen terpeno ciclasa. Dado que el mutante deseado carece de este gen, esta reacción no debe ser positiva.

A continuación, se cultivan la cepa mutante de *Streptomyces CS227* y la cepa silvestre *Streptomyces CS227* en medio MS junto a 50 mg de carbón activo, cuya función es la absorción de los volátiles emitidos por cada cepa. Como control de los volátiles presentes en el ambiente y aquellos emitidos por el medio de cultivo, se emplea una placa de MS sin microorganismo y con carbón y se incuban las placas a 28°C durante 5 días.

Para ello, se emplea una cámara que pueda contenerlos durante el periodo de incubación necesario. Este dispositivo consta de la base de dos placas Petri enfrentadas (una de ellas contiene el microorganismo) y una pieza central que presenta un agujero que permite el flujo de los compuestos volátiles en la que se dispone el carbón (Figura 9).



**Figura 9:** Cámara para la obtención de compuestos volátiles (VOC). (a) Vista esquemática de la cámara de lado. (b) Representación de cada parte. El agujero en el medio permite el intercambio de compuestos volátiles (Cuervo *et al.*, 2022).

Una vez transcurrido el tiempo de incubación, se recoge el carbón activo y se extraen los metabolitos con acetato de etilo.

Para finalizar este experimento, se analizan los metabolitos en un cromatógrafo de gases-masas. Este análisis nos indica los compuestos extraídos por el acetato de etilo en cada una de las muestras. Se tratará de observar si existen diferencias entre los perfiles metabólicos de la cepa silvestre y mutante, detectando posibles picos diferenciales que indiquen la ausencia de producción de un compuesto por parte de la agrupación que hemos inactivado en la cepa mutante mediante la eliminación del gen terpeno ciclasa.

En caso de existir un pico diferencial, se tratará de identificar el compuesto haciendo uso de los datos de espectrometría de masas obtenidos en este análisis. Por un lado, se realizará una comparación de estos datos obtenidos en relación al compuesto representado por el pico diferencial con aquellos correspondientes al epi-isozizaene, ya que al inicio del procedimiento experimental se había encontrado una alta identidad entre ambos genes terpeno ciclasa. En caso de que la identificación determine que no se corresponde a este metabolito, se realizará una búsqueda empleando bases de datos como la librería NIST (Instituto Nacional de Estándares y Tecnología) para tratar de identificar el compuesto. Si llegado a este punto no se identifica el metabolito a analizar, se llevará a cabo un procedimiento para determinar la estructura mediante NMR (Grivet, 2001).

Si tras el análisis de metabolitos en el cromatógrafo de gases-masas no se observa ningún pico diferencial entre la cepa silvestre y la mutante se plantearán distintos cambios a ejecutar durante la fase experimental.

El medio de cultivo inicialmente usado para cultivar *Streptomyces* fue MS, que podría ser sustituido por medio R5A ya que es óptimo para la producción de metabolitos (Fernández *et al.*, 1998). Otro cambio a ejecutar podría ser la sustitución de carbón activo por otros adsorbentes. Dentro de estos podemos destacar a los tamices moleculares, caracterizados por poseer una estructura porosa que nos permite separar moléculas según su tamaño e idóneo para la dispersión de compuestos orgánicos volátiles debido a su uniformidad (Gao *et al.*, 2023). Otra opción es la sílica gel, adsorbente con buena estabilidad y una desorción cuantitativa con disolventes polares como el agua, el alcohol o la acetona (Van Mourik, 1965). Cabe destacar que el uso de disolvente podría ser sustituido por técnicas como la espectroscopía de masas de desorción programada por temperatura, método utilizado para monitorizar la interacción entre las moléculas adsorbidas y el adsorbente. Los átomos de hidrógeno escapan progresivamente según aumenta gradualmente la temperatura, estos difunden y son medidos por el espectroscopio determinando así el tamaño de las moléculas obtenidas (Wang *et al.*, 2021). Todas estas variantes durante la fase experimental podrían llevar a un resultado distinto al inicialmente obtenido y, por lo tanto, plantear la posibilidad de la existencia de un compuesto producido por la agrupación 11.1 de *Streptomyces* CS227 a pesar de no haber obtenido en el primer análisis un pico diferencial en el perfil metabólico obtenido por cromatografía de gases-masas.

## 6. CONCLUSIONES

Los compuestos volátiles producidos por actinomicetos plantean un campo de investigación prometedor para el desarrollo de fármacos, debido a su alta bioactividad y al hecho de ser un área poco explorada hasta el momento. Se destaca la utilidad del análisis de este tipo de compuestos ya que desempeñan un papel importante en la señalización microbiana y la antibiosis. Si bien este proyecto carece de resultados concluyentes, se plantea una variedad de ajustes a llevar a cabo durante el procedimiento experimental para explorar diferentes posibles resultados y nuevas posibilidades. Alguna de las variantes metodológicas descritas podría identificar el compuesto producido por la agrupación 11.1 de *Streptomyces* CS227, ya que se desconoce cuál es su producto. Dada la creciente necesidad de descubrir nuevos compuestos bioactivos frente a la crisis de la aparición de patógenos multirresistentes, aproximaciones experimentales como la descrita, donde convergen la bioinformática y la biología molecular, podría resultar en la determinación de un metabolito no previamente descrito con potencial para la síntesis de novedosos productos farmacológicos.

## 7. REFERENCIAS

- Albarano L, Esposito R, Ruocco N, Costantini M. 2020. Genome Mining as New Challenge in Natural Products Discovery. *Mar Drugs*. 18(4):199
- Anderson AS, Wellington EM. 2001. The taxonomy of *Streptomyces* and related genera. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 51(3):797–814
- Antón N, Santos-Aberturas J, Mendes MV, Guerra SM, Martín JF, Aparicio JF. 2007. PimM, a PAS domain positive regulator of pimarcicin biosynthesis in *Streptomyces natalensis*. *Microbiology*. 153(9):3174–83
- Bibb MJ. 2005. Regulation of secondary metabolism in streptomycetes. *Curr Opin Microbiol*. 8(2):208–15
- Blin K, Pedersen LE, Weber T, Lee SY. 2016. CRISPy-web: An online resource to design sgRNAs for CRISPR applications. *Synth Syst Biotechnol*. 1(2):118–21
- Cane DE, Ikeda H. 2012. Exploration and Mining of the Bacterial Terpenome. *Acc Chem Res*. 45(3):463–72
- Chater KF, Chandra G. 2006. The evolution of development in *Streptomyces* analysed by genome comparisons. *FEMS Microbiol Rev*. 30(5):651–72
- Chater KF. 2006. *Streptomyces* inside-out: a new perspective on the bacteria that provide us with antibiotics. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 361(1469):761–68
- Cordovez V, Carrion VJ, Etalo DW, Mumm R, Zhu H, et al. 2015. Diversity and functions of volatile organic compounds produced by *Streptomyces* from a disease-suppressive soil. *Front. Microbiol*. 6:
- Cuervo L, Álvarez-García S, Salas JA, Méndez C, Olano C, Malmierca MG. 2023. The Volatile Organic Compounds of *Streptomyces* spp.: An In-Depth Analysis of Their Antifungal Properties. *Microorganisms*. 11(7):1820
- Cuervo L, Méndez C, Salas JA, Olano C, Malmierca MG. 2022. Volatile Compounds in Actinomycete Communities: A New Tool for Biosynthetic Gene Cluster Activation, Cooperative Growth Promotion, and Drug Discovery. *Cells*. 11(21):3510

- Dhodary B, Spittler D. 2021. Ammonia Production by *Streptomyces* Symbionts of Acromyrmex Leaf-Cutting Ants Strongly Inhibits the Fungal Pathogen Escovopsis. *Microorganisms*. 9(8):1622
- Faylo JL, Ronnebaum TA, Christianson DW. 2021. Assembly-Line Catalysis in Bifunctional Terpene Synthases. *Acc Chem Res*. 54(20):3780–91
- Fernández E, Weissbach U, Sánchez Reillo C, Braña AF, Méndez C, et al. 1998. Identification of two genes from *Streptomyces argillaceus* encoding glycosyltransferases involved in transfer of a disaccharide during biosynthesis of the antitumor drug mithramycin. *J Bacteriol*. 180(18):4929–37
- Gao W, Tang X, Yi H, Jiang S, Yu Q, et al. 2023. Mesoporous molecular sieve-based materials for catalytic oxidation of VOC: A review. *Journal of Environmental Sciences*. 125:112–34
- Grivet J-P. 2001. NMR and Microorganisms. *Current Issues in Molecular Biology*. 3(1):7–14
- Hardisson C, Manzanal MB, Salas JA, Suárez JE. 1978. Fine structure, physiology and biochemistry of arthrospore germination in *Streptomyces antibioticus*. *J Gen Microbiol*. 105(2):203–14
- Hobbs G, Frazer CM, Gardner DCJ, Cullum JA, Oliver SG. 1989. Dispersed growth of *Streptomyces* in liquid culture. *Applied microbiology and biotechnology*. 31(3):272–77
- Hollis Aidan, Ahmed Ziana. 2013. Preserving Antibiotics, Rationally. *New England Journal of Medicine*. 369(26):2474–76
- Lacey HJ, Rutledge PJ. 2022. Recently Discovered Secondary Metabolites from *Streptomyces* Species. *Molecules*. 27(3):887
- de Lima Procópio RE, da Silva IR, Martins MK, de Azevedo JL, de Araújo JM. 2012. Antibiotics produced by *Streptomyces*. *The Brazilian Journal of Infectious Diseases*. 16(5):466–71
- Magadán-Corpas P, Ye S, Pérez-Valero Á, McAlpine PL, Valdés-Chiara P, et al. 2023. Optimized De Novo Eriodictyol Biosynthesis in *Streptomyces albidoflavus* Using an Expansion of the Golden Standard Toolkit for Its Use in Actinomycetes. *Int J Mol Sci*. 24(10):8879

- Manteca A, Alvarez R, Salazar N, Yagüe P, Sanchez J. 2008. Mycelium differentiation and antibiotic production in submerged cultures of *Streptomyces coelicolor*. *Appl Environ Microbiol.* 74(12):3877–86
- Manteca A, Claessen D, Lopez-Iglesias C, Sanchez J. 2007. Aerial hyphae in surface cultures of *Streptomyces lividans* and *Streptomyces coelicolor* originate from viable segments surviving an early programmed cell death event. *FEMS Microbiol Lett.* 274(1):118–25
- Manteca Á, Fernández M, Sánchez J. 2005. A death round affecting a young compartmentalized mycelium precedes aerial mycelium dismantling in confluent surface cultures of *Streptomyces antibioticus*. *Microbiology (Reading)*. 151(Pt 11):3689–97
- Manteca A, Sanchez J. 2009. *Streptomyces* Development in Colonies and Soils. *Appl Environ Microbiol.* 75(9):2920–24
- Martin JF, Demain AL. 1980. Control of antibiotic biosynthesis. *Microbiol Rev.* 44(2):230–51
- Medema MH, Blin K, Cimermancic P, De Jager V, Zakrzewski P, et al. 2011. antiSMASH: rapid identification, annotation and analysis of secondary metabolite biosynthesis gene clusters in bacterial and fungal genome sequences. *Nucleic Acids Research.* 39(suppl\_2):W339–46
- Nett M, Ikeda H, Moore BS. 2009. Genomic basis for natural product biosynthetic diversity in the actinomycetes. *Nat Prod Rep.* 26(11):1362–84
- Riostras de Bustos B. 2017. *Desarrollo de Streptomyces: regulación y aplicaciones industriales*. doctoral thesis
- Rowan DD. 2011. Volatile Metabolites. *Metabolites.* 1(1):41–63
- Rudolf JD, Alsup TA, Xu B, Li Z. 2021. Bacterial terpenome. *Nat Prod Rep.* 38(5):905–80
- Sánchez JS. 2006. [Resistance to antibiotics]. *Rev Latinoam Microbiol.* 48(2):105–12
- Shallcross LJ, Howard SJ, Fowler T, Davies SC. 2015. Tackling the threat of antimicrobial resistance: from policy to sustainable action. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 370(1670):20140082

Sociedad Española de Medicina de Urgencias y Emergencias. 2023. *Las bacterias multirresistentes ya causan 700.000 muertes cada año en el mundo.*

Van Mourik JHC. 1965. Experiences with Silica Gel as Adsorbent. *American Industrial Hygiene Association Journal*. 26(5):498–509

Ventura M, Canchaya C, Tauch A, Chandra G, Fitzgerald GF, et al. 2007. Genomics of Actinobacteria: Tracing the Evolutionary History of an Ancient Phylum. *Microbiol Mol Biol Rev*. 71(3):495–548

Wang J, Nielsen J, Liu Z. 2021. Synthetic Biology Advanced Natural Product Discovery. *Metabolites*. 11(11):785

Wang Y, Hu S, Cheng G. 2021. Effect of Specimen Geometry on the Thermal Desorption Spectroscopy Evaluated by Two-Dimensional Diffusion-Trapping Coupled Model. *Materials*. 14(6):1374

Watve MG, Tickoo R, Jog MM, Bhole BD. 2001. How many antibiotics are produced by the genus *Streptomyces*? *Arch Microbiol*. 176(5):386–90

Xia J, Gao J, Tang W. 2016. Nosocomial infection and its molecular mechanisms of antibiotic resistance. *BST*. 10(1):14–21

Yagüe P, López-García MT, Rioseras B, Sánchez J, Manteca Á. 2013. Pre-sporulation stages of *Streptomyces* differentiation: state-of-the-art and future perspectives. *FEMS Microbiol Lett*. 342(2):79–88

Yagüe P, Manteca A, Simon A, Diaz-Garcia ME, Sanchez J. 2010. New method for monitoring programmed cell death and differentiation in submerged *Streptomyces* cultures. *Appl Environ Microbiol*. 76(10):3401–4

Zaman SB, Hussain MA, Nye R, Mehta V, Mamun KT, Hossain N. A Review on Antibiotic Resistance: Alarm Bells are Ringing. *Cureus*. 9(6):e1403

Zhang MM, Qiao Y, Ang EL, Zhao H. 2017. Using natural products for drug discovery: the impact of the genomics era. *Expert Opinion on Drug Discovery*. 12(5):475–878.