

BIOSÍNTESIS DE TETRACICLINAS

BIOSYNTHESIS OF TETRACYCLIN

Alejandro Canale-Guerrero¹, Patricia Chombo-Morales², Conrado Soto-Velazco³, Roberto Sigüenza-López⁴, Alfredo I. Feria-Velasco⁵

cga35024@cucba.udg.mx / pchombo@ciatej.net.mx / csoto@cucba.udg.mx
[/veracruz500@gmail.com](mailto:veracruz500@gmail.com) / aferiav@biosmedica.com

Recibido: noviembre 7, 2011 / Aceptado: febrero 28, 2012 / Publicado: febrero 29, 2012

RESUMEN. Este artículo describe la producción de tetraciclina biosintética o de primera generación, con el objetivo de mostrar, con propósitos educativos, uno de los procesos de producción industrial de antibióticos más interesantes y de limitada difusión. En este manuscrito se detallan, el proceso de propagación del microorganismo productor, tanto a nivel de laboratorio como en tanque germinador; la producción de tetraciclina en el tanque fermentador y el proceso de recuperación del antibiótico, poniendo en relieve el uso del agua de cocimiento de maíz, un subproducto de la industria de almidón, como parte de los ingredientes de los medios de cultivo utilizados en la elaboración del producto, contribuyendo, con ello, a disminuir la contaminación del ambiente.

PALABRAS CLAVE: Tetraciclinas naturales, tetraciclinas de primera generación, *Streptomyces aureofaciens*, agua de cocimiento de maíz, fermentación, proceso de recuperación.

ABSTRACT. This article describes, the production of biosynthetic tetracyclines or first generation tetracyclines. The aim is to show, with educational purposes, one of the most interesting and with very limited diffusion, the industrial antibiotic production process. This manuscript describes in detail, the microorganism propagation at laboratory and germination tank levels, the tetracycline production into a fermentor, as well as the downstream process. The use of corn steep liquor, a sub-product from the corn starch industry, is pointed out as ingredient for the tetracycline process described, since it contributes in this way to reduce the environmental pollution.

KEYWORDS: Natural tetracyclines, first generation tetracyclines, *Streptomyces aureofaciens*, corn steep liquor, fermentation, down stream process.

La resistencia de las bacterias hacia los antibióticos se ha promovido, no sólo por el abuso de la aplicación o incumplimiento de la dosis prescrita, sino también, en otro contexto más amplio, por la falta de medidas de higiene que da lugar a una mayor frecuencia de infecciones (presentes de manera crítica en comunidades marginadas); el uso de bacterias transgénicas con marcadores de antibióticos en sus plásmidos y por la capacidad de los microorganismos para formar bio-películas resistentes a los ataques por antibióticos [1]. El amplio uso de antibióticos en la alimentación animal [2,3] Todo lo mencionado es aprovechado por los microorganismos para que, mediante mecanismos de transmisión, tales como plásmidos y transposones, la información genética, pase rápidamente entre bacterias [4].

1. Autor de Correspondencia Depto. de Salud Pública. Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias. Universidad de Guadalajara. Carretera Guadalajara-Nogales, Km 15.5. Las Agujas, Nextipac. C.P. 45110. Zapopan, Jal. México. Tel. : (0133) 37771150, ext. 33107. www.cucba.udg.mx

2. Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología del Estado de Jalisco. Av. Normalistas 800. Colinas de la Normal. C.P. 44270. Guadalajara, Jalisco. www.ciatej.net

3. Depto. de Botánica y Zoología. CUCBA. Universidad de Guadalajara

4. Depto. de Salud Pública. CUCBA. Universidad de Guadalajara

5. Coordinación de Investigación. Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias. Universidad de Guadalajara.

Más aún, la mayoría de los gérmenes resistentes aparecen en los mismos hospitales, donde frecuentemente se han encontrado bacterias de procedencia cutánea, desarrollando variantes peligrosas. A pesar de la gran cantidad de antibióticos disponibles en el mercado, una persona podría morir en un hospital de cualquier parte del mundo, víctima de una infección causada por una bacteria resistente. La búsqueda de nuevas estrategias, pueden en parte, ser la solución al problema de la resistencia microbiana a los antibióticos. Tal ha sido el caso de las tetraciclinas biosintéticas, que en un principio fueron aplicadas contra muchos patógenos incluyendo bacterias gram-positivas, gram-negativas y rickettsias, por lo cual eran consideradas antibióticos de amplio espectro pero que, debido a las razones antes expuestas, generaron microorganismos resistentes, a tal grado, que dejaron de ser efectivas. Las tetraciclinas biosintéticas o de primera generación, constituyen un grupo de antibióticos de amplio espectro, encabezados por la clorotetraciclina o aureomicina, aislada en 1947 a partir de un cultivo de *Streptomyces aureofaciens* [5]. Poco tiempo después surgieron, la oxitetraciclina o terramicina generada por *Streptomyces rimosus* y la tetraciclina propiamente dicha, las cuales son consideradas, tetraciclinas de primera generación. [6]. Las tetraciclinas de segunda y tercera generación (minociclina, doxiciclina, metaciclina y tigeciclina), son tetraciclinas producidas, mediante la modificación química de la tetraciclina base, generada biosintéticamente [7] y actualmente están siendo utilizadas para el control de varias enfermedades, dentro de las cuales se encuentran el cáncer, la gangrena, la uretritis gonocócica, el linfogranuloma venéreo y las causadas por *Helicobacter pylori*, entre otras, contra las cuales, las tetraciclinas de primera generación no tienen efecto significativo. Resulta interesante conocer entonces, como objetivo académico, el proceso de producción industrial de la tetraciclina natural o biosintética, considerando que en muchos casos, las modificaciones químicas hechas a esas moléculas, dan lugar a las tetraciclinas de segunda y tercera generaciones.

MECANISMO DE ACCIÓN

Las tetraciclinas biosintéticas bloquean la síntesis de proteínas, impidiendo la unión del ARN de transferencia, que porta el aminoácido, con las unidades ribosomales (30S) que están montadas sobre la cadena de ARN mensajero y que están produciendo la cadena polipeptídica ([figura 1](#)). Además de este mecanismo, las tetraciclinas pueden quelar el magnesio necesario para que se produzca la unión ribosómica e inhibir algunos sistemas enzimáticos bacterianos, dentro de ellos, la fosforilación oxidativa [8].

A este grupo de antibióticos pertenecen la clorotetraciclina, bromotetraciclina, oxitetraciclina y la tetraciclina propiamente dicha, cuyo nombre es, de acuerdo a la International Union of Pure and Applied Chemistry, (IUPAC): 4-(dimethylamino)-3,6,10,12,12a-pentahydroxy-6-methyl-1,11-dioxo-1,4,4a,5,5a,6,11,12a-octahydrotetracene-2-carboxamide [9]. Todos ellos comparten una fórmula común ([figura 2](#)).

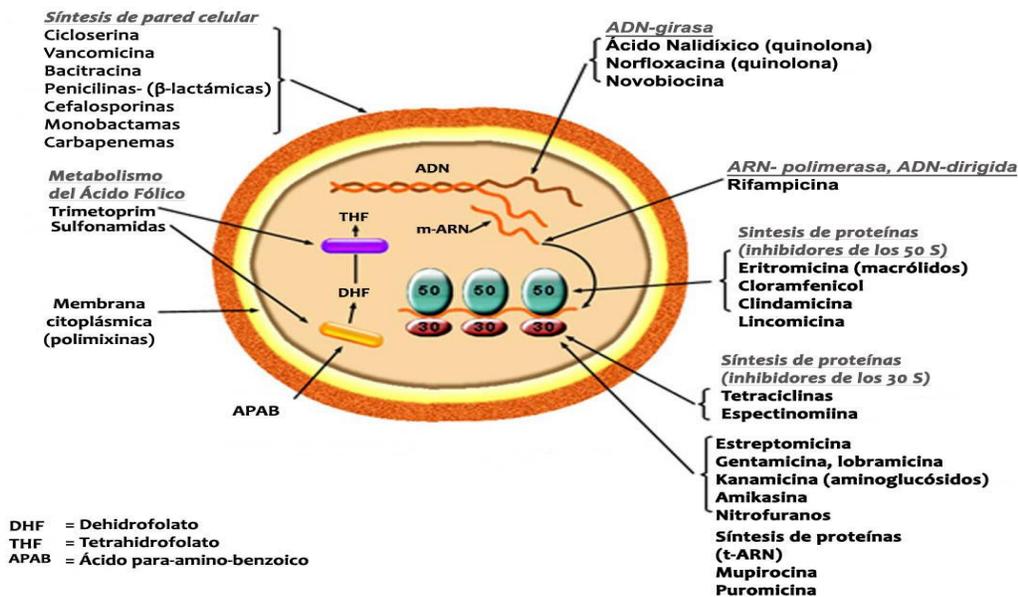


Figura 1. Mecanismo de acción de la mayoría de los compuestos antibacterianos y análogos de factores de crecimiento (modificada de Madigan [10])

1. PROCESO DE PRODUCCIÓN INDUSTRIAL DE TETRACICLINA.

1.1 LABORATORIO DE FERMENTACIÓN.

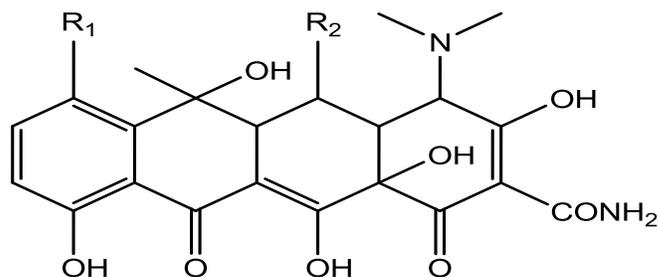
1.1.1 Placas de Petri.

El microorganismo que produce la tetraciclina es el *Streptomyces aureofaciens* y desarrolla colonias en un medio de cultivo cuya formulación se muestra en la [tabla 1](#).

Tabla 1. Formulación del medio de cultivo para cajas de Petri y tubos de agar inclinado (cultivos “maestro” y de “trabajo”).

Ingrediente	Concentración (%)
1. Sólidos de agua de cocimiento de maíz	0.4
2. Sacarosa	1.0
3. Sulfato de magnesio	0.025
4. Fosfato de potasio monobásico	0.2
5. Fosfato de amonio	0.2
6. Agar	2.0
Agua destilada	100 ml

El pH se ajusta entre 6.3 y 6.4



R1:	R2:	ANTIBIÓTICO:
H	H	Tetraciclina.
Cl	H	Cloro-tetraciclina.
Br	H	Bromo-tetraciclina.
H	OH	Oxitetraciclina.

Figura 2. Estructura química de las tetraciclinas biosintéticas de primera generación.

El microorganismo se siembra en la superficie del medio en cajas de Petri y después de 4 a 5 días de incubación a 28°C, se desarrollan colonias con las siguientes características: circulares, aplanadas, de 3-4 mm de diámetro, convexas, de bordes enteros, superficie brillante y de color naranja intenso.

1.1.2 Cultivos “maestro” y de “trabajo”.

Se escoge una colonia típica (con las características mencionadas anteriormente), la cual se macera en condiciones asépticas y se siembra en la superficie de 3 ó 4 tubos de ensayo, conteniendo medio de cultivo inclinado y estéril, con la misma formulación descrita para el medio de placas. Después de dos días de incubación a 28°C, se seleccionan los tubos que muestren un crecimiento homogéneo y no estén contaminados. Estos cultivos denominados “maestro” se almacenan por un período de cinco meses a 8°C, excepto uno, del cual se toman alícuotas que se siembran en un mayor número de tubos con agar inclinado. Estos cultivos ya desarrollados después de incubados a 28°C, constituyen los cultivos de “trabajo” que se almacenan a 8°C y que serán utilizados en la siembra de los “inóculos” que se destinarán a la “Planta de Producción”.

1.1.3 Inóculo.

El “inóculo” consiste en un matraz Erlenmeyer de 2500 ml (Fernbach) conteniendo 1500 ml del medio de cultivo líquido cuya fórmula se muestra en la [tabla 2](#).

El medio de cultivo del “inóculo” se esteriliza 60 min. a 121°C y una vez frío, es inoculado en condiciones asépticas con 5 ml de una suspensión acuosa de esporas de *S. aureofaciens*, provenientes de un tubo de “trabajo”. Los “inóculos” Fernbach se incuban 48 h a 28°C en agitación orbital a 202 rpm. Después de la

incubación, los matraces se someten a pruebas de contaminación antes de sembrarlos en el tanque “Germinador-A”.

2. PLANTA FERMENTACIÓN.

2.1 Germinador de primera etapa (“Germinador-A”).

El tanque germinador de primera etapa tiene un volumen de carga de 300 L y lleva 260 L de medio de cultivo ([tabla 3](#)), antes de esterilizar (A.E.), el cual aumenta a 300 L después de la esterilización.

Tabla 2. Formulación del medio de cultivo de la etapa de “Inóculo”.

<i>Ingrediente</i>	<i>Concentración (%)</i>
1. Sacarosa	3.5
2. Sólidos de agua de cocimiento de maíz	2.5
3. Sulfato de amonio	0.2
4. Fosfato monobásico de potasio	0.1
5. Carbonato de calcio	0.7
Agua destilada	100 ml

pH natural = 4.6-4.8. se ajusta a 6.5 con NaOH 0.1N

Tabla 3. Formulación del medio de cultivo de la etapa de “Germinador-A”

<i>Ingrediente</i>	<i>Concentración (%)</i>
1. Aceite de maíz	0.2
2. Sólidos de agua de cocimiento de maíz	1.3
3. Sulfato de amonio	0.4
4. Azúcar granulada	3.5
5. Carbonato de calcio	0.4

El procedimiento de preparación del medio de cultivo se inicia al adicionar los ingredientes: tres, dos y cuatro (en ese orden), al tanque de mezclado que ya contiene previamente, 200 L de agua fría. Después de agitar la mezcla durante cinco min., se adiciona el ingrediente # uno y se agita por treinta min. Se determina el pH y en caso necesario, se ajusta entre 6.6 y 6.8; se adiciona el ingrediente # cinco y se afora el medio a 260 L con agua fría, los cuales se transfieren al tanque “Germinador-A” (“G-A”) para esterilizar con vapor saturado (125 °C y presión de 1.6 Kg·cm⁻²), durante cuarenta min.; se enfría a 28°C y se determina el pH. Después de lo anterior, el “G-A” se inocula con 1.5 L de un “Inóculo Fernbach” avalado por el Laboratorio de Fermentación y se incuba por 24 h con un régimen de aire de 0.18 m·min⁻¹, a una

temperatura de 28°C y a una presión de 0.4 Kg·cm⁻². En caso de formarse demasiada espuma en el tanque durante el período de incubación, se agregan pequeñas cantidades de aceite de maíz, estéril. Los parámetros a evaluar para saber si el “G-A” está listo para inocular al tanque “Germinador-B” (germinador de segunda etapa o “G-B”), son: catalasa, 24 unidades; paquete de micelio, 98% y ausencia de contaminación. A lo largo de todo el período de incubación se toman muestras del “G-A” cada cuatro horas, para evaluar los tres parámetros anteriores. El volumen del “G-A” que se inocula al tanque “G-B” es el 10% del volumen de medio de cultivo del “G-B”.

2.2 Germinador de segunda etapa (“Germinador-B”).

El medio de cultivo del “G-B” tiene la formulación que se muestra en la [tabla 4](#). Los ingredientes mostrados se disuelven en un volumen de 3,750 L de agua fría.

Los ingredientes 3, 4 y 5 se disuelven en 1,300 L de agua fría, agitando durante cinco minutos, después de lo cual, se adiciona el ingrediente # 2, que se disuelve mediante agitación durante 30 min. El medio de cultivo debe tener un pH natural de 6.6 a 6.8 pero en caso negativo, se ajusta con NaOH.

Tabla 4. Medio de cultivo del tanque Germinador-B (“G-B”).

<i>Ingrediente</i>	<i>Concentración (%)</i>
1. Aceite de maíz	0.20
2. Agua de cocimiento de maíz	1.30
3. Sulfato de amonio	0.36
4. Azúcar	2.00
5. Carbonato de calcio	0.40

Se adiciona el ingrediente núm. 1, se afora el medio a 1500 L y se esteriliza mediante el sistema de esterilización “batch” a 125°C por 40 min., dentro del tanque “Germinador B”. Cuando el medio de cultivo se ha enfriado a 28°C, se determina el pH que debe estar entre 6.4 y 6.6. Una vez que el Laboratorio de fermentación ha confirmado que el medio de cultivo de este germinador se encuentra estéril, entonces se inocula con 300 L procedentes del tanque germinador “A”, de tal forma que el volumen final del “G-B” es ahora de 1,900 L. El tanque así inoculado se incuba durante 24 h a temperatura de 28°C, aireación de 1.11 m·min⁻¹ y presión de “cabeza”, de 0.4 kg·cm⁻².

2.3 Tanque fermentador o biorreactor de producción.

El tanque fermentador tiene un volumen de carga de 24,700 L pero se maneja a un volumen de trabajo de 26,500 L, con el medio de cultivo mostrado en la [tabla 5](#).

El procedimiento de preparación del medio de cultivo es el siguiente: en el tanque mezclador se disuelve el ingrediente # 1 en 3,000 L de agua a 75°C, con agitación durante 20 min. y posteriormente, se afora a 3,750 L con agua caliente. Enseguida se adicionan los ingredientes del 2 al 8, en ese mismo orden y agitando, para después, aforar a 5,000 L con agua caliente y finalmente, agregar el ingrediente # 9. El medio de cultivo así preparado se envía al sistema de esterilización continua por “tubos de retención”, donde se esteriliza a 123°C por 2 min., después de lo cual el medio se enfría rápidamente a 90°C y posteriormente, a 30°C con agua, para aforar el volumen a 22,000 L, ya en el tanque fermentador. El

fermentador se inocula con 1,800 L procedentes del tanque "G-B", lo cual hace un total de 26,500 L. La temperatura del medio de cultivo se baja y se conserva a 28°C durante todo el tiempo de incubación. El pH se ajusta entre 6.2 y 6.4, manteniéndose así, durante toda la fase LAG. Durante la fase exponencial del microorganismo, el pH se ajusta entre 5.75 y 5.85 con hidróxido de amonio. Después de las 25 h de proceso, se agregan pequeñas cantidades de aceite de maíz estéril, cada 40 h hasta el final (120 h). El plan de aire para esta etapa es el siguiente: de la hora cero a la cinco, 1.0 m·min⁻¹; de la hora seis a la diez, 2.0 m·min⁻¹; de la hora once a la quince, 4.0 m·min⁻¹ y de la hora quince hasta el final, 6.0 m·min⁻¹. Es necesario hacer notar que, tanto en los dos tanques germinadores como en el fermentador, el aceite de maíz no sólo sirve para abatir la espuma, evitando que los tanques pierdan medio de cultivo por la línea de "venteo" (o de salida de gases), mojen el filtro y se contaminen, sino también, para proporcionar una fuente de carbono alterna que el *S. aureofaciens* usa, una vez agotado el substrato principal.

Tabla 5. Formulación del medio de cultivo utilizado en el tanque fermentador.

Ingrediente	Concentración (%)
1. Harina de maíz	3.3
2. Sulfato de amonio	0.7
3. Sulfato de zinc	0.004
4. Sulfato de magnesio	0.12
5. Sulfato ferroso	0.002
6. Sulfato de cobalto	0.0002
7. Carbonato de calcio	0.6
8. Sólidos de agua de cocimiento de maíz	1.25
9. Aceite de maíz	0.4

El nivel de producción de tetraciclina en el tanque fermentador es el principal parámetro que se evalúa a lo largo de cada lote, aunado a la producción de catalasa y de micelio, a partir de las 12 h de haber inoculado el tanque fermentador. Además de lo anterior, la calidad de cultivo puro se determina desde antes que el tanque se inocule; ya inoculado y durante todo el proceso de incubación.

3. RECUPERACION DE LA TETRACICLINA.

El "caldo fermentado" se retira del tanque fermentador; se recibe en un tanque con agitación; se acidifica con ácido clorhídrico y se le agrega sulfato de sodio para evitar que el antibiótico producido se degrade. Esta mezcla es luego filtrada a través de un filtro prensa con filtro-ayuda ("Dicalite"® o tierra de diatomáceas). El filtrado se envía a un segundo tanque agitado para continuar el proceso de extracción, mientras que el micelio del microorganismo y los sólidos del medio de cultivo retenidos en la "torta", se suspenden en agua fría, se agitan y se vuelven a filtrar por filtro prensa con ayuda de "Dicalite"®. Este proceso de suspensión de la "torta" en agua y filtración, se repite tres veces más para lograr extraer los residuos de antibiótico, lo más posible. La "torta" final se descarta y los extractos se juntan con el filtrado colocado en el segundo tanque, donde se agrega hidróxido de sodio para elevar el pH y lograr la

precipitación del antibiótico. Se agita repetidas veces para lograr el crecimiento de los cristales de tetraciclina y se agrega "Dicalite" ®, para luego filtrar a través de filtro prensa. El filtrado se descarta, enviándolo al área de tratamiento de efluentes, y la "torta" recuperada y húmeda de tetraciclina, se disuelve (1:1) en una solución de agua-metanol a pH de 1.2, a la cual se agregan, ferrocianuro de sodio y sulfato de calcio, para lograr que los materiales contaminantes e insolubles, precipiten y se recojan en la "torta", después de filtrar a través del filtro prensa. El filtrado recuperado se trata con urea a pH de 3.5-4.0 y después de centrifugar, se recuperan los cristales de "tetra-urea" que se suspenden en agua-oxitol a pH de 3.5 para obtener finalmente, los cristales de tetraciclina-base que son luego centrifugados y secados ([figura 3](#)).

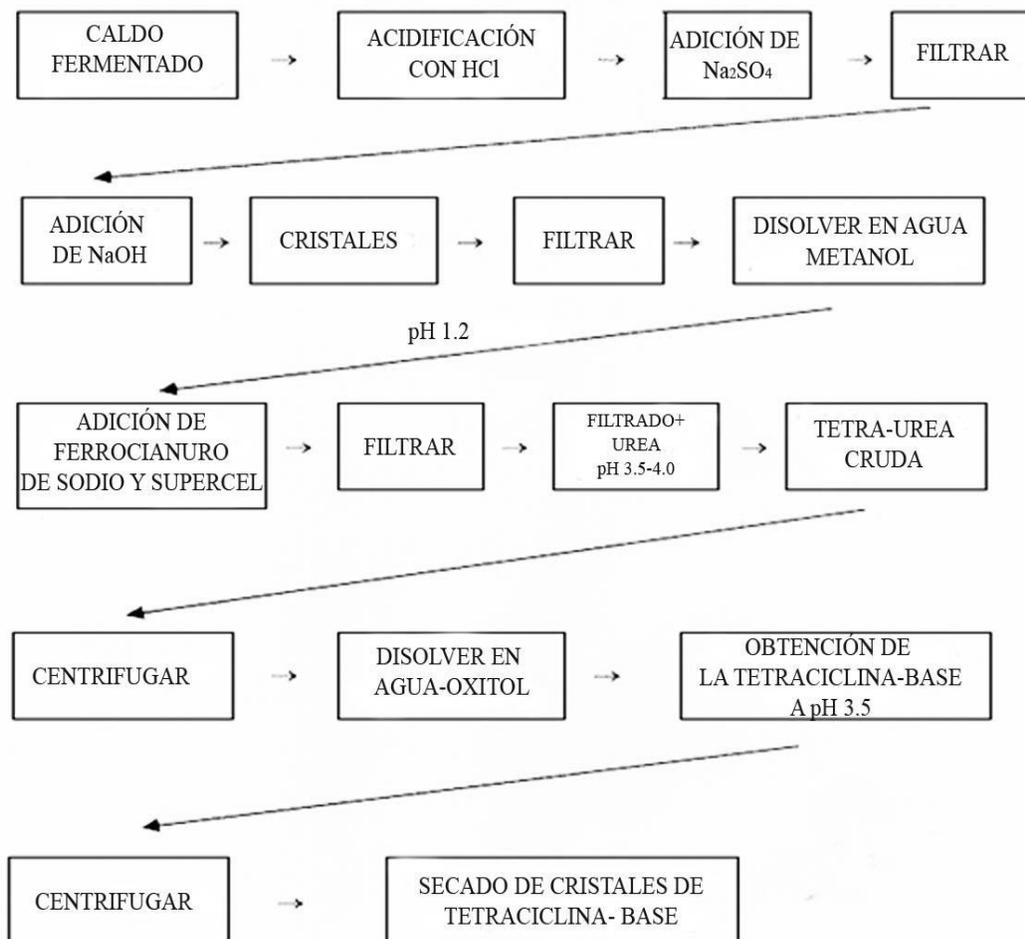


Figura 3. Diagrama de bloques del proceso de recuperación de tetraciclina.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El proceso de biosíntesis de tetraciclina, reportado por Darken *et al* [11], menciona que *Streptomyces aureofaciens* es el microorganismo productor de la tetraciclina y si bien describe los ingredientes, sus proporciones, el pH, las condiciones de incubación en las etapas de placas y tubos inclinados, al igual que

en matraces agitados y fermentadores piloto de 25 gal., no menciona la existencia de fermentadores a nivel de producción industrial, ni explica el proceso de recuperación de la tetraciclina, que es un aspecto importante en la producción del antibiótico. Culik et al [12] describe el uso de varios inhibidores de la producción de cloro-tetraciclina, considerando que el cultivo de *Streptomyces sp* usado, produce simultáneamente, el antibiótico mencionado y la tetraciclina. El estudio se realizó en un fermentador de 1 litro de capacidad y aunque menciona los ingredientes del medio de cultivo empleado y las condiciones de incubación, no menciona la aireación, la agitación ni proceso alguno de recuperación del antibiótico. Ross y Schügerl [13], en su estudio para conocer el tiempo exacto en que *Streptomyces aureofaciens* consume el fosfato, menciona los ingredientes y sus proporciones, de los medios de cultivo utilizados para el inóculo y el fermentador (100 L de volumen nominal), así como también las condiciones de proceso en cada caso. Sin embargo, no se reporta un procedimiento de recuperación, tipo industrial, del antibiótico producido y solo se menciona la filtración de las muestras provenientes del fermentador, para su análisis en un sistema de HPLC. Shang-Shyng y Meei-Yueh [14] produjeron tetraciclina a nivel laboratorio, inoculando una cepa de *Streptomyces viridifaciens* (ATCC 11989) en un medio de cultivo sólido a base de residuos de camote. Tanto las formulaciones de los medios de cultivo usados para el inóculo, como la del medio de fermentación, al igual que las condiciones de proceso, fueron descritas al detalle, aunque no existió un proceso de extracción del antibiótico. Un ensayo semejante fue realizado por Asagbra et al [15] usando medios de cultivo sólido a base de cáscaras de cacahuate, mazorcas de maíz, cáscaras de yuca y cáscaras con pulpa de manzana, adicionadas de sales minerales y fuente de nitrógeno, inoculadas por separado con varias especies de *Streptomyces*. Los resultados mostraron que hubo producción significativa de tetraciclina y aunque la formulación del medio fue descrita al detalle al igual que las condiciones de proceso, la producción fue a nivel laboratorio y el proceso de recuperación industrial no fue manejado. Jones y Porta [16] reportaron que con sacarosa como fuente de carbón, la eficiencia de producción de tetraciclina por *Streptomyces aureofaciens* (ATCC 10762) fue incrementada cuando se agregaron, aceite de soya y de girasol al medio de cultivo en pequeñas cantidades. El experimento se realizó a nivel de matraces agitados y se observa el mismo patrón: las formulaciones de los medios de cultivo, tanto en el inóculo como en el fermentador, se encontraron ampliamente descritas, al igual que las condiciones de proceso, pero no fue así con el proceso de recuperación de la tetraciclina. Madigan et al [10], describen en su texto la biosíntesis industrial de tetraciclinas mencionando las formulaciones de los medios de cultivo utilizados en las diferentes etapas (placas, tubos de agar inclinado, inóculo, tanque germinador y fermentador), pero aunque señala algunas condiciones de proceso (tiempo de incubación en el inóculo, germinador y fermentador, pH en el germinador y fermentador), carece de información sobre la temperatura, niveles de aireación en el germinador y fermentador, velocidad de agitación, tipo de esterilización, así como el proceso de recuperación de la tetraciclina, al detalle.

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Es evidente que en la literatura técnico-científica no se describe un proceso de producción de tetraciclina completo y detallado, como el que aquí presentamos, lo cual justifica su publicación para conocimiento del público especializado. Se recomienda que procesos industriales similares, sean publicados al detalle con la finalidad de usarlos como modelos en asignaturas afines.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen la intervención de la Biól. Angélica María Velázquez-Flores, de la Unidad Multimedia Instruccional del CUCBA, UdeG, por las ediciones hechas a varias imágenes incluidas en el presente artículo.

REFERENCIAS

1. Altekruze J. 1999. Lucha contra los Microbios. Zeit Film DW. Programa Prisma. Agosto. Deutsche Welle Alemania.
2. Luis-Juan-Morales. A., Rosas-Barbosa, B.T., Alaniz de la O.R., Medina-Lerena M.S., Flores del Angel A., Torres-López K.S. (2010) Resistencia a antimicrobianos de cepas de *Campylobacter*, aisladas de pollo crudo. Memorias del XII Congreso Internacional de Inocuidad de Alimentos, pag. 105-108.
3. Noa-Lima E., Noa M., González D.G., Landeros P., Reyes W. 2009. Evaluación de la Presencia de Residuos de Antibióticos y Quimioterapéuticos en Leche, en Jalisco, Mexico. Rev. Salud Anim. **31**(1):24-33.
4. Neu C. H. (1992). The Crisis in Antibiotic Resistance. *Science*. **257**:1064-1073.
5. Griffin, M.O., Fricousky, E., Ceballos, G., Villareal, F. (2010). Tetracyclines: a pleiotropic family of compounds with promising therapeutic properties. Review of literature. *Am J Physiol Cell Physiol* **299**:539-548.
6. Thaker M., Spanogiannopoulos P., Wright G.D. (2010) The tetracycline resistome. *Cell. Mol. Life Sci.* **67**:419-431.
7. Canale-Guerrero A., Chombo-Morales P., Ramírez-Cerda E., Feria-Velasco A. (Septiembre 1, 2011). El resurgimiento de las tetraciclinas. *E-gnosis* [on line] vol. 9 Art. # 3 <<http://www.e-gnosis.udg.mx/vol9/art3>> ISSN 1665-574. Consultado: 13 septiembre 2011.
8. Nelson M.L. (1998). Chemical and Biological Dynamics of Tetracyclines. *Adv. Dent. Res.* 12:5-11.
9. O' Neil, M.J. (Editor). (2006). The Merck Index. 14th Edition, pp 1582, comp. 9196. Merck Research Laboratories, Division of Merck & Co., Inc. Whitehouse Station, NJ. USA.
10. Madigan M.T., Martinko J.M., Parker J. (2006). Brock. Biology of Microorganisms. 11th. Edition. 941-953. Pearson, Prentice Hall. N.J., U.S.A.
11. Darken M.A., Berenson H., Shirk J.R., Sjolander N.O. (1960). Production of Tetracycline by *Streptomyces aureofaciens* in Synthetic Media. *Appl. Microbiol.* **8**(1):46-51
12. Culik, K. Palkoska J., Vondracek M, Skoda J. (1969). Fermentation process for the production of tetracycline. Patent 3429780. USA
13. Ross A. and Schügerl K. (1988) Tetracycline production by *Streptomyces aureofaciens*: the time lag of production. *Applied Microbiology and Biotechnology*. **29**: 174-180.
14. Sahng-Shyng Y. and Meei-Yueh L. (1989). Tetracycline Production with Sweet Potato Residue by Solid State Fermentation. *Biotechnology and Bioengineering*. **33**:1021-1028.
15. Asagbra A., Sanni A.I., Oyewole D.B. (2005) Solid State fermentation production of tetracycline by *Streptomyces* strains using some agricultural wastes as substrate. *World journal of Microbiology and Biotechnology*. **21**:107-114
16. Jones A.M. and Porta M.A. (1998) Vegetable oils in fermentation: beneficial effects of low level supplementation. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. **21**: 203-207.