



2 Ej. No. 76

**Universidad Nacional Autónoma de México**

**Facultad de Química**

**Determinación de la Antibiosis que  
Presentan Ciertas Esponjas Marinas  
Sobre Bacterias, Levaduras y Hongos.**

**T E S I S**

Que para obtener el título de  
**QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO**  
**P R E S E N T A**

**Blanca Leticia de Jesús Mijangos Albornes**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

# TESIS CON FALLA DE ORIGEN

## C O N T E N I D O

	Página
INTRODUCCION .....	1
GENERALIDADES	
1) Antecedentes .....	3
2) Generalidades sobre esponjas .....	6
3) Resistencia bacteriana a los antibióticos .....	18
Mutación (resistencia cromosómica) .....	19
Transformación (captación de DNA libre) .....	22
Transducción ( infección vírica ) .....	26
Conjugación celular (aparejamiento) .....	29
4) Comportamiento de los microorganismos de prueba frente a los antibióticos comerciales .....	36
MATERIAL Y METODOS	
1) Esponjas .....	60
2) Extractos crudos de las esponjas .....	60
3) Determinación de la antibiosis in vitro .....	61
RESULTADOS .....	65
DISCUSION .....	87
CONCLUSIONES .....	90
BIBLIOGRAFIA .....	92

La participación de la Microbiología en la Industria Farmacéutica -- allá por los años cuarenta, trajo consigo una transformación tan profunda de ésta, que bien pudieramos hablar de auténtica revolución. Los avances registrados en el conocimiento de los microorganismos y en las técnicas de su manipulación genética, encuentran hoy su aplicación rutinaria en la identificación de nuevas sustancias terapéuticas, en el trabajo de investigación en el laboratorio y en los procesos de producción propiamente dichos.

Desde una perspectiva comercial y clínica, los antibióticos constituyen la clase más importante de fármacos que se obtienen de los microorganismos. Las ventas correspondientes al ejercicio de 1978 de los cuatro grupos principales del sector de los antibióticos penicilinas, cefalosporinas, tetraciclinas y eritromicina ascendieron a 4200 millones de dólares. También ofrece un elevado interés comercial, dentro de los antibióticos, el grupo de los aminoglucósidos, donde se incluye la estreptomina. En el panel de ventas, tras los antibióticos vienen las vitaminas, que comercializaron un volumen de ventas de 670 millones de dólares, en el año de 1978, (1).

Los microorganismos responsables de la fermentación en la industria de los antibióticos se inscriben dentro de un margen taxonómico bastante limitado, ya que János Berdy, del Instituto de Investigación de Química Farmacológica de Budapest, los ha clasificado en tres grupos principales. Bastan seis géneros de hongos filamentosos para producir 1000 antibióticos diferentes, entre esos hongos se cuentan los mohos de los géneros: Cephalosporium y Penicillium.

Entre las bacterias no filamentosas hallamos a los Actinomicetes, tres géneros de éstos elaboran hasta 3000 agentes antibióticos dife -

rentes, correspondiendo la porción mayor al género Streptomyces. No existe relación alguna significativa, entre el número de antibióticos que produce un género y su importancia clínica o comercial, recordemos que de los 5000 conocidos hasta la fecha, sólo hay un centenar en el mercado, de estos últimos la mayoría proceden de los Streptomicetes, que en 1977, rindieron 69 productos, (1).

La proporción de los antibióticos que se fueron incorporando a la industria disminuyó rápidamente después de los años cincuenta. El descenso se debió sobre todo a la dificultad existente en aislar antibióticos suficientemente superiores a los comercializados, como para garantizar su éxito clínico. A consecuencia de la aludida disminución y del desarrollo de resistencia a ciertos antibióticos por parte de las bacterias, la investigación sobre los antibióticos experimentó cambios de rumbo; los estudios se han centrado en la modificación de la estructura de los ya aislados y en la búsqueda de nuevas fuentes productoras de los mismos. Es por eso, que con los avances tecnológicos actuales, se contempló a los productos de los mares como un maravilloso recurso por investigar, dando por resultado un futuro halagüeño en este sentido.

Desde que Nigrelli dió a conocer en el año de 1954 sus investigaciones relacionadas con la existencia de sustancias antimicrobianas en las esponjas, (40) varios centros de investigación, se han avocado a continuar con este trabajo para obtener una alternativa a la producción de antibióticos. Con este fin, el presente trabajo se desarrolló para ampliar el conocimiento de las sustancias antimicrobianas contenidas en esponjas y continuar en la búsqueda de alternativas para encontrar nuevos antimicrobianos de interés clínico.

## GENERALIDADES

## 1.- Antecedentes:

El término antibiótico fué propuesto por Waksman, descubridor de la estreptomycinina, para definir sustancias dotadas de actividad antimicrobiana y extraídas de estructuras orgánicas vivientes.

La búsqueda de antecedentes demuestra que en 1889 Vuillemin en un trabajo titulado " Antibiose et symbiose ", crea el término " antibiosis " para describir la lucha entre seres vivos por la supervivencia. Más tarde Ward adopta esta palabra para describir el antagonismo microbiano. Con posterioridad, ya en plena era antibiótica, el término significó, durante algún tiempo, sustancia extraída de seres vivos, ya fuesen bacterias, hongos o algas con capacidad para anular la vida de diversos microorganismos.

Esta génesis era primordial para distinguirlo de los quimioterapéuticos derivados de la definición de " Quimioterapia " dada por Ehrlich en 1906, al tratamiento de las enfermedades infecciosas con sustancias químicas antimicrobianas, (9).

En la actualidad las investigaciones en el campo de los antibióticos han sido cada vez más exhaustivas debido a la gran resistencia que han manifestado los microorganismos patógenos frente a los antibióticos tradicionales, por lo que los investigadores, día a día, buscan nuevas fuentes que los provean de sustancias capaces de atacar a estos microorganismos y es por eso que han incursionado en terrenos que antiguamente eran ignorados. Como ejemplo de esto tenemos la gran serie de investigaciones realizadas con productos de origen marino uno de los cuales son las esponjas.

Nigrelli fué quien observó por primera vez, en 1954, la acción antimicrobiana de ciertas esponjas subtropicales, al colocar un pequeño trozo de la esponja sobre las cajas de petri sembradas. Fué hasta -- 1959, cuando reportó una sustancia que poseía actividad antimicrobiana contra bacterias Gram negativas, Gram positivas, Mycobacterium sp y Candida albicans, llamándola ectionina, (40).

Las sustancias antibióticas extraídas de esponjas han sido de gran interés en los últimos años debido a que han mostrado actividad antimicrobiana por igual, ante microorganismos Gram positivos y Gram negativos, aunque hasta el momento no han llegado al período de uso -- clínico por dos razones principalmente: químicamente los compuestos-- hasta ahora aislados para pruebas de antibióticos son ciclohexadie-- nos bromados y fenoles polihidroxibromados; algunos son derivados de acetaminas y dihidroxiindoles los cuales parecen poseer una posible toxicidad en humanos y en pruebas de actividad antimicrobiana no parecen mostrar una apreciable inhibición comparada con antibióticos - estándar, (43).

Desde los trabajos pioneros de Bergmann sobre los ácidos grasos y esteroides en esponjas, se han aislado más de 100 diferentes compuestos, por lo común en los últimos 8 a 9 años, mostrando varios de ellos actividad antimicrobiana, (37).

Los productos naturales conocidos a partir de las esponjas, se han agrupado de acuerdo con su probable origen biosintético; compuestos-- bromados, terpenos, compuestos de mezclas biogénicas y esteroides, -- ácidos grasos y pigmentos. Los compuestos que han manifestado actividad antimicrobiana pertenecen principalmente al primer grupo y como ejemplo podemos citar a la Ectionina, Aeroplysin 1, Aeroplysin 2, Dibromolactona, aerotherionin, Homoaerotherionin, Dibromophakellin, Oroidin, etc.



Los extractos de más de 100 especies de esponjas que han sido sujetos a prueba de actividad antimicrobiana, han dado resultados positivos - (Jakowska y Nigrelli, 1960). Stempien et. al. (1969) reportaron la presencia de sustancias antimicrobianas en extractos de 23 a 125 especies de esponjas colectadas en las aguas del Caribe y de las Islas - Bahamas, (43).

Las esponjas pertenecientes al género Verongia son representativas - de los estudios exhaustivos que realizaron y se siguen realizando para encontrar la presencia de sustancias antimicrobianas, como ejemplo se puede citar los trabajos realizados por Fattorusso E., Minale L., y Sodano G. en 1972 (23); Minale L., Sodano G., Chan W.R. y Chen A.M. en 1972 (36); Moody K. Thomson R.H., Fattorusso E., Minale L. y Sodano en 1972 (38); Andersen Raymon J. y Faulker D. John en 1973 (3).

Otros géneros de esponjas que se han estudiado con éxito en la búsqueda de nuevos compuestos antimicrobianos, son Ianthella ardis, la cual fué estudiada por Fulmor W. Van Lear G.E., Morton G.O. y Mills R.D., - en el año de 1970 (25); Consulich D.B., y Lovell F.M., en 1971 (18) - Irsinia variabilis en 1973 por Faulkner John D. (24). Phakellia flabellata en 1971 por Sharma G.M., y Burkholder P.R., (47) y Polyfibrospongia maynardii por Van Lear G.E., Morton G.O. y Fulmon W. en 1973 - (56).

De los géneros de esponjas más estudiados en la actualidad tenemos especies pertenecientes a las mencionadas que se localizan en gran número de las Costas de México y como ejemplo citamos a las esponjas Ianthella ardis, Haliclona rubens, Verongia fistularis y Haliclona sp., estudiadas en el presente trabajo.

## 2.- Generalidades sobre esponjas.

Las esponjas, componentes del phylum Porifera, son los más primitivos de los animales multicelulares. No posee tejidos ni órganos verdaderos, y sus células despliegan considerable independencia, son sésiles y sus movimientos son apenas apreciables.

Esta combinación de características convenció a Aristóteles, a Plinio y a otros antiguos naturalistas, de que las esponjas eran plantas; de hecho, no fué hasta 1765 (Barnes, 1977) cuando se observaron por primera vez corrientes internas de agua, en que se reconoció claramente la naturaleza animal de las esponjas, (7).

Excepto unas 150 especies de agua dulce, las esponjas son animales marinos. Abundan en todos los mares, dondequiera que haya rocas, conchas, maderos sumergidos, o corales que les brinden un substrato conveniente, una minoría de especies viven sobre arenas blandas movedizas o en fondos lodosos. La mayor parte de las esponjas prefieren aguas relativamente superficiales, pero algunos grupos, como las esponjas vítreas, viven a grandes profundidades.

Estructura de las esponjas.- Su tamaño es variable, algunas esponjas calcáreas miden sólo unos centímetros, mientras que las más voluminosas llegan a medir varios metros. El tipo de crecimiento está subordinado a la naturaleza y, a la inclinación del substrato, a la disponibilidad de espacio y a la velocidad y el tipo de corriente, por lo cual la mayoría son irregulares y presentan incrustaciones erectas masivas o bien crecen en forma ramificada.

La mayoría están brillantemente coloreadas, encontrándose esponjas verdes, amarillas, anaranjadas, rojas y púrpuras. Con la excepción de las esponjas incoloras o pardogrisáceas.

Las especies del phylum Porifera que poseen el tipo más simple y primitivo de estructura, se llaman esponjas asconoides, términos estructural más que taxonómico. Tienen forma de tubo y son siempre pequeñas, viven en grupos o colonias de tubos fusionados a lo largo de sus ejes longitudinales o de sus bases.

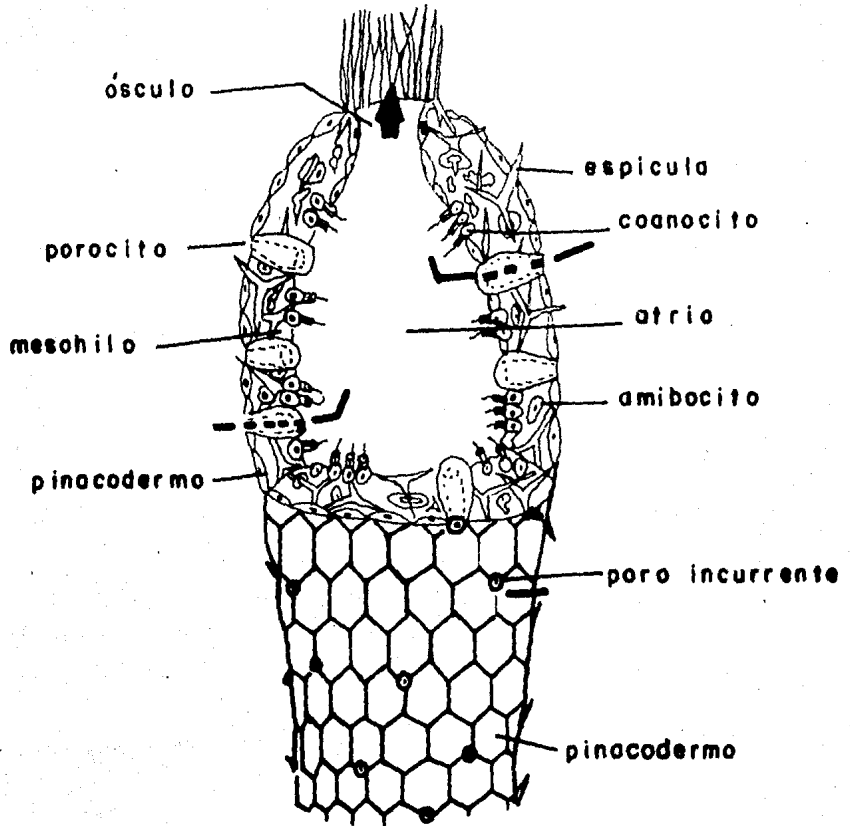
Su superficie está perforada por gran número de pequeñas aberturas, llamados poros incurrentes, de donde deriva el nombre de Porifera (portadores de poros). Estos poros abren hacia una cavidad interior el atrio (espongocele), que se abre a su vez al exterior, por el ósculo, amplia abertura en la parte superior del tubo. A lo largo de los poros incurrentes pasa una corriente constante de agua al interior del espongocele y sale al exterior por el ósculo.

La superficie externa está cubierta por una epidermis de células poligonales planas, los pinacocitos. Los poros están formados por una clase de células llamadas porocito, que tienen la forma de un tubo corto y va desde la superficie externa hasta el espongocele. La abertura o lumen del tubo forma el poro incurrente u ostium y el extremo exterior de la célula puede cerrarse o abrirse por la contracción (Figura 1).

Debajo del pinacodermo se encuentra una capa llamada mesohilo, que consta de una matriz de proteína gelatinosa que contiene el material esquelético y células ameboides.

El esqueleto es relativamente complejo y brinda un amazón de sostén para las células vivas del animal, puede estar compuesto de espículas calcáreas silíceas, fibras proteínicas de espongina, o de una combinación de ellas.

Figura 1.



Esponja asconoide parcialmente seccionada.

Las espículas existen en una gran variedad de formas y son importantes para la identificación y clasificación de las especies. Se encuentran dos términos aplicables a algunos de los tipos de espículas; megascleros, formados por espículas largas, cuyo principal soporte es el esqueleto, y microscleras, consideradas como más pequeñas. El esqueleto está localizado en el mesénquima, pero las espículas se proyectan frecuentemente a través de la epidermis. La sustancia constitutiva de las fibras de esponjina es una proteína fibrosa relacionada con la queratina y la colágena.

Las células ameboides del mesohilo comprenden ciertos tipos de células; células grandes, con pseudópodos obtusos y núcleos grandes, llamadas arqueocitos, capaces de formar otros tipos de células necesarias; amebocitos fagocíticos ambulantes y también células fijas llamadas colencitos, que están fijadas por medio de largas hebras citoplásmicas.

El esqueleto es secretado por amebocitos llamados esclerocitos, los cuales se derivan de un escleroblasto.

En el interior del mesohilo y revistiendo el atrio, hay una capa de células, llamadas coanocitos. El coanocito es ovoide con un extremo adyacente al mesénquima, mientras el otro se proyecta en el atrio y es portador de un flagelo rodeado por un collar basal contráctil. De los coanocitos depende el movimiento del agua a través de la esponja y la obtención del alimento, la intensidad del flujo hídrico puede ser lenta, porque el amplio atrio contiene demasiada agua que puede ser expulsada por el ósculo rápidamente. A medida que la esponja aumenta de tamaño se intensifica el problema del movimiento de agua, porque un aumento en el volumen del atrio no va acompañado de un incremento suficiente del área de la superficie de la capa de coanocitos, lo que resolvería el problema. Pero con el curso de la evolución

el problema se ha resuelto por el plegamiento de la pared corporal y disminución del atrio. Gracias al primer mecanismo aumenta el área superficial de la capa de coanocitos, mientras que la reducción del espongocele disminuye el volumen de agua que debe circular por el mismo. El resultado de estos cambios es un incremento notable y más eficaz del flujo de agua a través del cuerpo ( Figura 2).

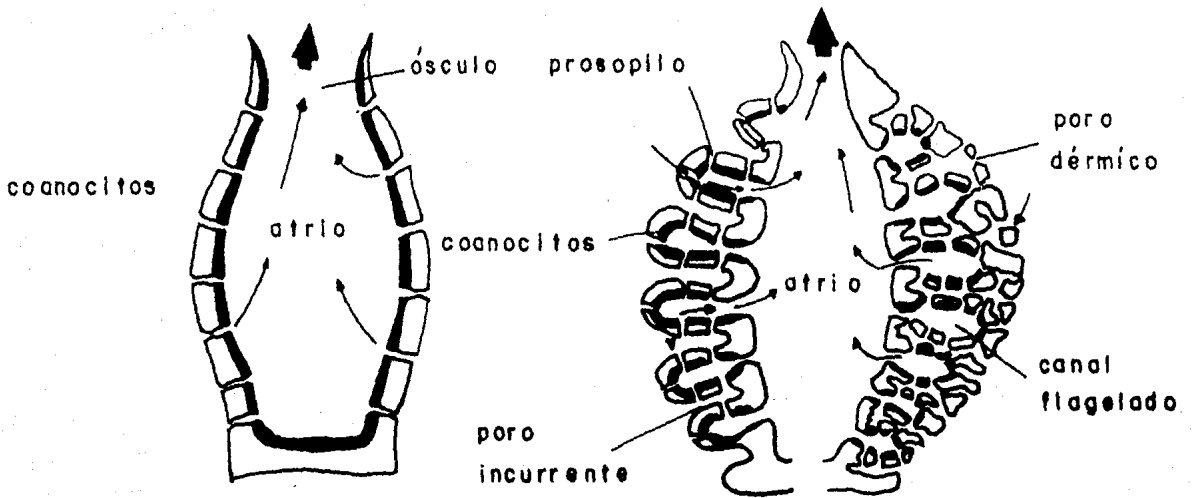
Las esponjas que muestran las primeras etapas de plegamiento de la pared corporal reciben el nombre de siconoides, en ellas la pared corporal se ha "plegado" horizontalmente formando prolongaciones digitiformes ( Figura 2). Esta forma de desarrollo da origen a las bolsas epidérmicas, que se extienden hacia adentro desde el exterior, y a evaginaciones que se proyectan hacia afuera desde el atrio.

En este tipo más avanzado de esponjas, los coanocitos no revisten la superficie del espongocele en toda su extensión, sino que quedan circunscritos a las evaginaciones que reciben el nombre de canales radiados o flagelados. Las invaginaciones correspondientes, a partir del lado epidérmico, se conocen como canales incurrentes y están revestidas por pinacocitos epidérmicos. Los dos canales se comunican entre si por aberturas llamadas prosopilos.

Estos animales carecen de porocitos. El agua fluye en ellos por los canales incurrentes y flagelados, los prosopilos y el atrio, y sale al exterior por el ósculo.

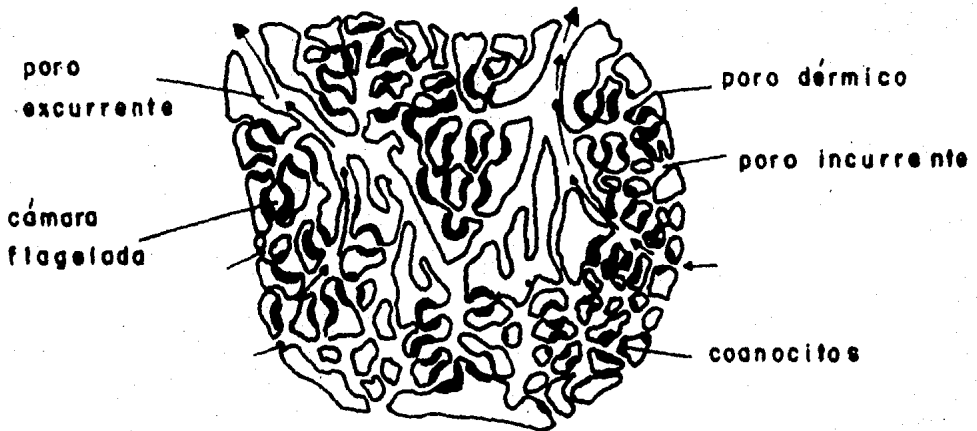
En la esponja leuconoide se observa el más alto grado de plegamiento ( Figura 2), son las más comunes en donde ha desaparecido el atrio, quedando como vestigios del mismo, conductos por los cuales circula el agua hasta el ósculo, son siempre irregulares y pueden alcanzar tamaños considerables, en lugar de un solo ósculo pueden poseer va-

Figura 2.



Tipo asconoide

Tipo siconoide



Tipo leuconoide

Tipos morfológicos de esponjas .

rios.

Fisiología.- La fisiología de la esponja depende, en gran parte, de la corriente de agua que pasa a través del cuerpo, que lleva a éste, oxígeno y alimento y elimina los desechos. Inclusive los espermatozoides y los huevos son llevados hacia adentro y hacia afuera por -- las corrientes de agua.

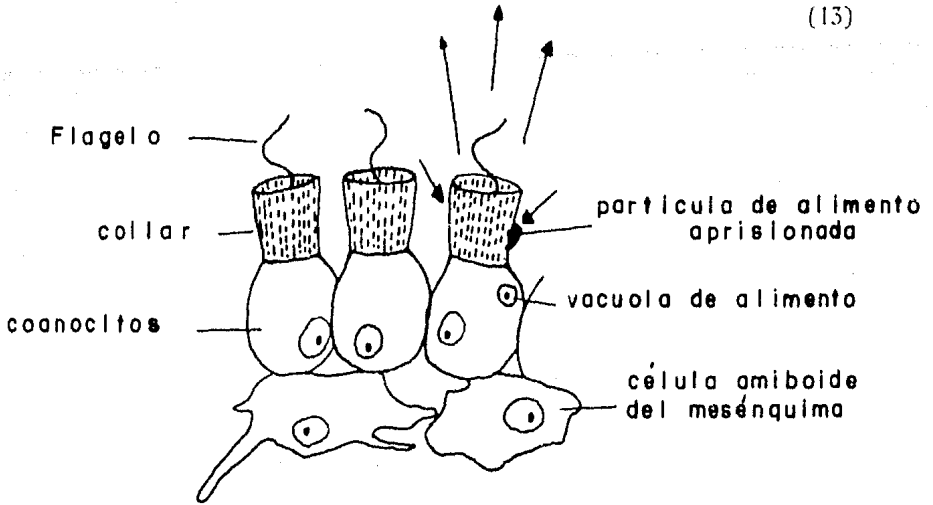
Las esponjas se alimentan de un material constituido por partículas sumamente finas, donde el 80% de la materia orgánica filtrable consumida por la esponja, es de un tamaño inferior al que puede observarse mediante microscopía ordinaria, el otro 20% consta de bacterias, dinoflagelados y otro plancton fino. Reiswing cree que las partículas mayores ( de 5 a 50 micras) son fagocitadas por células que revisten las paredes de pasos inhalantes, las partículas de tamaño bacteriano e inferior ( menos de 1 micra) son probablemente eliminadas y engullidas por los coanocitos, por último las partículas mayores son digeridas intracelularmente. Los amebocitos actúan probablemente como centros de almacenamiento para reservas de alimento (Figura 3).

La corriente de agua es producida por el batir de los flagelos de -- los coanocitos, pero no existe ni coordinación ni sincronismo de éstos en una cámara particular. Los coanocitos están vueltos hacia el apopilo y cada flagelo vibra en forma espiral desde su base hasta su punta ( Figura 4 ). Como resultado, el agua succionada al interior de la cámara vibrátil a través de los pequeños prosopilos situados entre las bases de los coanocitos, es impelida luego al centro de la cámara y fuera del apopilo mayor, hacia un canal de escurrimiento.



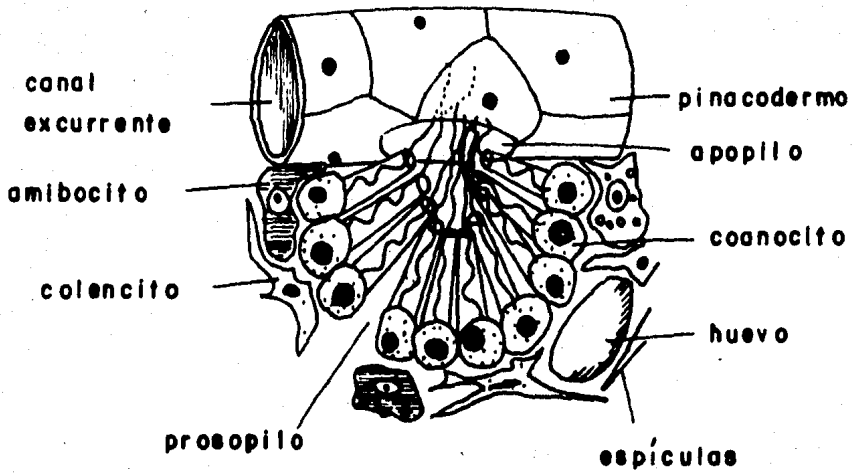
Figura 3.

(13)



Sección de una capa flagelada y del mesenquima subyacente.

Figura 4.



Corte a través de la cámara flagelada de la esponja.

Las esponjas adultas son incapaces de locomoción, aunque algunas especies pueden contraer o modificar hasta cierto punto la forma del cuerpo.

No se ha encontrado sistema nervioso alguno en las esponjas y las reacciones son locales e independientes, aunque son capaces de responder a estímulos externos, tales como la luz brillante y a los estímulos mecánicos que provocan en la esponja una lenta contracción.

Clases de esponjas.- Tomando como base la naturaleza del esqueleto, las esponjas se dividen en 4 clases:

1) Clase calcárea o Calcispongiae.- Se caracterizan por poseer espículas compuestas de carbonato de calcio. La mayoría son relativamente pequeñas (menos de 10 cm. de altura), blanquecinas, en forma de vaso o tubulares y se encuentran en aguas costeras relativamente superficiales.

2) Clase Hexactinellida o Hyalospongiae.- Se conocen como esponjas vítreas. Sus espículas son siempre del tipo triaxónico o de 6 radios, algunas de las espículas se fusionan a menudo para formar un esqueleto parecido a una rejilla formada de largas fibras silíceas. Son las más simétricas y las más especializadas de las esponjas, miden de 10 a 30 cm., la mayoría son de color pálido, su forma es de copa, vaso o urna. Son principalmente de aguas profundas (entre 450 y 900 metros).

3) Clase Demospongiae.- Incluye al mayor número de especies, su color es casi siempre brillante, el esqueleto es variable; puede constar de espículas silíceas, de fibras de espongina, o de una combinación de ambas. Las espículas son monoaxónicas o tetraxónicas, la mayoría son irregulares y leuconoides.

La familia Spongiidae incluye las esponjas corrientes de baño. Su esqueleto carece de espículas y está compuesto solamente de fibras de espongina.

4) Clase Sclerospongiae.- Son esponjas coralinas, leuconoides y difieren de los demás en que tienen un esqueleto interno de espículas silíceas y fibras de espongina, así como una cubierta de carbonato de calcio. Tienen una configuración en estrella.

Reproducción.- La reproducción asexual es por gemación o por una gran variedad de procesos que implican formación y liberación de un agregado de células esenciales, especialmente amebocitos.

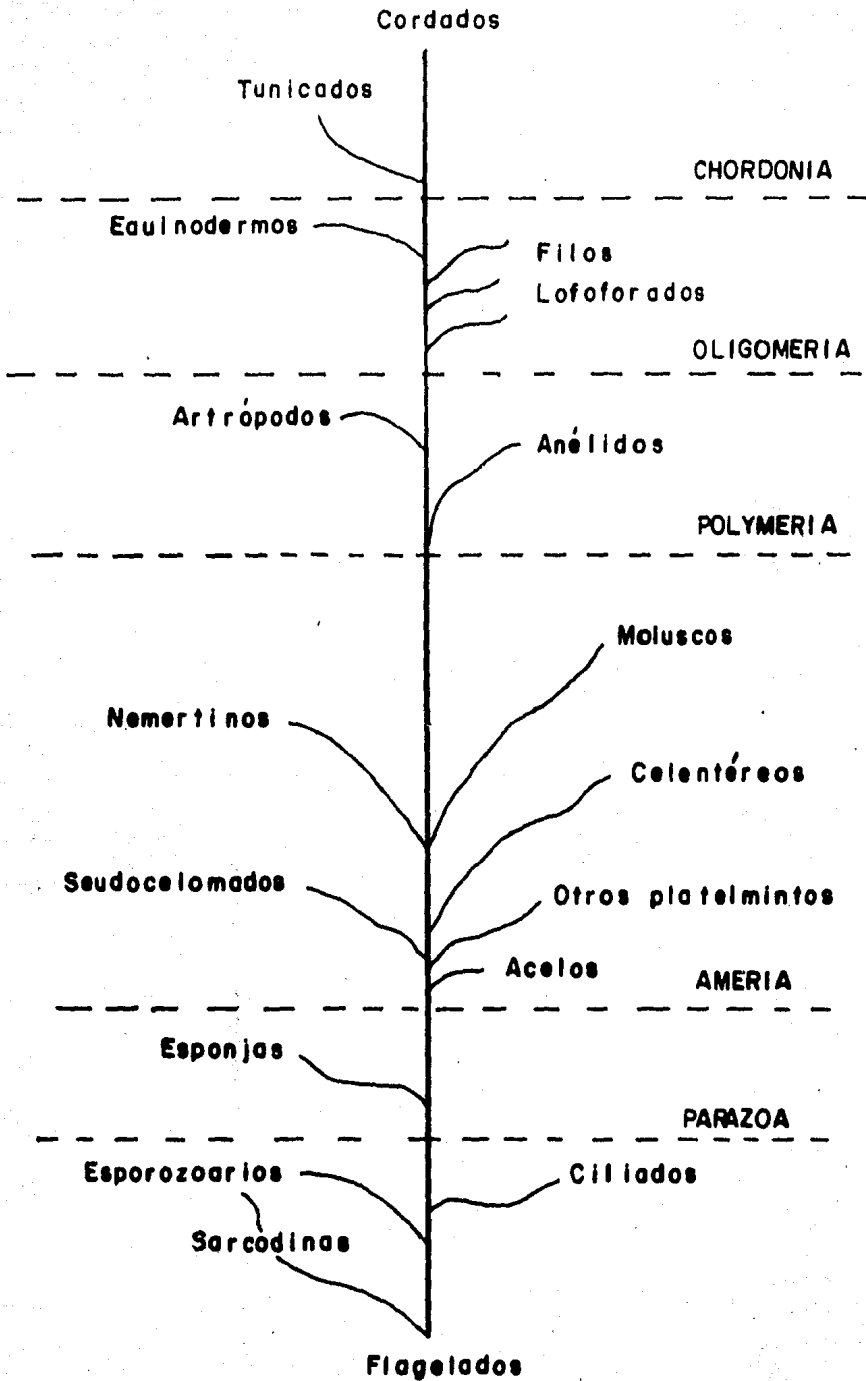
La reproducción sexual es a través de gametos que se desarrollan en el tejido mesenquimal, los masculinos liberados de una esponja pueden entrar en otra a través de la corriente incurrente de agua y fecundar allí mismo a los huevos. Las células fecundadas sufren parte de su desarrollo en el mismo lugar y abandonan la esponja cuando alcanzan un estado larvario denominado anfibrástula, que contiene pequeñas células flageladas en uno de los hemisferios y células no flageladas de función principalmente nutritiva en el otro hemisferio. La anfibrástula vive durante un breve tiempo formando parte del plancton, si encuentra un substrato adecuado para fijarse, lo hace por el polo flagelado y se desarrolla directamente dando una esponja pequeña. Las células flageladas dan lugar a los coanocitos y el resto de la esponja deriva de grandes células no flageladas, (8).

Posición Filogenética de las Esponjas.- Se acepta hoy, sin duda alguna, que las esponjas tuvieron su origen antes de la era paleozoica.

Si bien el origen de las esponjas es todavía dudoso, se acepta hoy

sin reservas que estos animales se separaron pronto de la línea evolutiva principal de los metazoarios y que no cedieron lugar a ningún otro miembro del reino animal. Buen número de hechos indican que las esponjas son phylum terminal muerto. Vemos que carecen de boca y cavidad digestiva; toda su estructura corporal se ciñe en torno de su sistema único de conductos para agua; la capa epidérmica está muy poco desarrollada, y, por último, la embriogenia de estos animales -- muestra peculiaridades que no se encuentran en ningún otro grupo de metazoarios. Por virtud del aislamiento de su posición filogenética, las esponjas se separan a menudo del resto de los animales multicelulares ( Eumetazoa ) y se sitúan en un subreino aparte, denominado Parazoa (Figura 5).

Figura 5.



Filogenia del reino animal según concepción de Hadzi.

### 3.- Resistencia bacteriana a los antibióticos

La resistencia bacteriana a los antibióticos por una parte y por otra la hipersensibilidad que se desarrolla por parte de ciertos individuos frente a algunos de éstos, constituyen los principales obstáculos para su uso exitoso. Cuando la resistencia se desarrolla en el curso de un tratamiento, además de que éste puede no mostrar el esperado efecto terapéutico hacia el paciente en turno, este fenómeno a la larga viene a ser muy importante sobre la comunidad, ya que la eliminación de cepas sensibles y la diseminación de las resistentes, origina una situación en la cual muchas enfermedades son resistentes desde su inicio teniéndose que adoptar un tratamiento alternativo; por esta razón, la valoración de la sensibilidad o resistencia bacteriana frente a los antibióticos, ha tomado gran importancia. Tales estimaciones son un pre-requisito esencial para el uso racional de los antibióticos y para conservar la eficacia de este importante grupo de sustancias terapéuticas.

Dado que el desarrollo de resistencia bacteriana pone en entredicho la utilidad de un antibiótico, el descubrimiento de nuevos antimicrobianos ha encontrado buena acogida; sin embargo, debe tenerse en cuenta que es una auténtica competencia la que se presenta, ya que aunque sean muchos los recientemente obtenidos, la probabilidad de resistencia frente a uno determinado, depende de los mecanismos de acción eficientes que pueden condicionar la aparición de ésta. De los modos de acción, existen muchos diferentes mediante los cuales los microorganismos pueden adquirir resistencia frente a los medicamentos.

La aplicación terapéutica de un antibiótico tiende a eliminar las cepas sensibles, pero persiste una pequeña minoría que ya desde el --

principio es resistente. El ejemplo clásico es la existencia de cepas de estafilococos penicilina-resistentes; el aumento progresivo de estos estafilococos, se explicaba por la teoría de la genética selectiva, ciertas "mutantes" de las cepas bacterianas ya resistentes con anterioridad al empleo de la penicilina, se fueron desarrollando en forma silenciosa y en poco tiempo se situaron ventajosamente con relación a las cepas destruidas por el antibiótico. El ambiente hospitalario es un medio ecológico favorable porque el personal sanitario que alberga estafilococos en la nasofaringe, sirve de base para el intercambio de genes y para la expansión de las cepas resistentes a la penicilina.

La resistencia adquirida por otros microorganismos como estreptococo, gonococo y meningococo a las sulfamidas, se explicaba por su empleo masivo, ya fuera como terapéutica o como prevención en los campamentos militares y escuelas, (5,9,15,30).

### Mutación

El término mutación se aplica ampliamente a todos los cambios hereditarios en el genoma, excepto los que tienen lugar por incorporación de material genético procedente de otro microorganismo.

La mutación a un nivel molecular representa una alteración en la secuencia de nucleótidos en el genoma.

Con el término reversión se hace referencia al retorno al fenotipo primitivo, al cual sólo se llega mediante un cambio en una zona distinta que corrija fenotípicamente la mutación (supresión), (19).

En todas las poblaciones microbianas, aparecen espontáneamente mutan

tes que exhiben un cambio de locus cromosómico, el cual controla la susceptibilidad o resistencia frente a un medicamento determinado. Aunque estos mutantes aparecen en forma espontánea, la presencia del medicamento sirve como medio selector de los mismos.

Así, la "presión de selección" del medicamento antimicrobiano, desempeña una parte importante en el favorecimiento de la supervivencia y proliferación de mutantes resistentes a los medicamentos en un solo-huésped (paciente) o en un medio determinado (por ejemplo algún hospital).

Normalmente son muy raros los errores detectables en la replicación del DNA (mutación espontánea) y hay solo uno por cada  $10^8$  - a  $10^9$  nucleótidos en cada replicación, (12).

La mutación puede causar cualquier cambio en el orden de sucesión de los nucleótidos de un gen alterando la estructura y, por tanto, la función de la proteína específica. Estos cambios consisten en:

1.- Reemplazamiento de un nucleótido por otro distinto; 2.- Inserción de un nucleótido supernumerario; 3.- Pérdida de un nucleótido. El orden puede cambiar en cualquiera de las siguientes formas:

Mutaciones del grupo 1.- Transiciones.- En estas mutaciones se substituye una purina por otra, o bien una pirimidina por otra, lo cual conduce a la sustitución de un AT por un CG o viceversa. Son producidas por análogos de las bases, ejemplo: 5-bromouracilo (análogo de la pirimidina), 2 aminopurina (análogo de la purina) y además pueden inducir la reversión de todas las mutaciones que producen.

Mutaciones del grupo 2.- Alteraciones en la disposición para la lectura.- Implican la eliminación y la inserción de una base, ejemplo: las inducidas por los derivados de la acridina. Estos compuestos pueden-



causar una reversión de las mutaciones que producen.

Mutaciones del grupo 3.- Transversiones.- En las que un par de purina pirimidina reemplaza a un par pirimidina-purina, o viceversa (AT → CG ó TA).

Mutaciones del grupo 4.- Deleciones.- Consisten en la pérdida de más de un nucleótido ( con frecuencia, cientos o miles). Se pueden inducir por medio de varios agentes: ácido nitroso, agentes alquilantes-bifuncionales e irradiaciones ionizantes. Estos agentes pueden unir entre sí las dos cadenas de ADN, dando la impresión de que un segmento está situado alrededor del punto de unión, no se replica, y que los segmentos situados a los lados se replican regularmente y se unen entre si, (12,19).

Según el antibiótico, varía la rapidez con que se presente la resistencia. El antibiótico frente al cual se produce con mayor rapidez es la estreptomycinina ya que la resistencia puede desarrollarse a veces en el transcurso de una noche. Frente a la eritromycinina y a la novobiocina pueden también desarrollarse resistencias en pocos días. Frente a la mayoría de los antibióticos restantes, la resistencia se desarrolla paulatinamente y su progresión a menudo no se manifiesta en un determinado paciente, observándose sólo que tras la administración durante varios años de un antibiótico, por ejemplo una tetraciclina, algunas cepas, incluso aisladas por primera vez, son ya resistentes al antibiótico.

Una vez que ha aparecido una mutante resistente a las drogas en una población de células bacterianas, aquélla puede ser transferida a las otras células por cualquiera de los tres mecanismos: transformación, transducción ó conjugación, dependiendo de cuál mecanismo sea-

capaz de actuar, ( 5,19,30).

#### Transformación:

En 1928, F. Griffith descubrió el fenómeno de la transformación, experimentando sobre las infecciones de ratones con Streptococcus pneumoniae, (27). Este microorganismo es el causante de la neumonía en humanos y es extremadamente patógeno para el ratón, debe su patogenicidad, como es sabido, a la cápsula de polisacáridos que presentan las colonias S (lisas), y que las R (rugosas) no la presentan siendo no patógenas. Griffith observó que al inyectar ratones con una suspensión de células S destruidas por calentamiento, junto con otra suspensión de células R viables, los animales contraían neumonía y morían. Al cultivar la sangre de los ratones muertos observó la presencia de bacterias tipo S; esto no ocurría cuando los animales eran inyectados únicamente con células patógenas destruidas. Finalmente se concluyó que las bacterias S destruidas por calentamiento transformaron a las bacterias tipo R viables en células patógenas. La naturaleza hereditaria de esta transformación se demostró cuando las células, hijas de las nuevas patógenas, fueron a su vez utilizadas para transformar a otras no patógenas.

Estos experimentos sugerían que los genes de las células destruidas por calentamiento no sufrían ningún daño y eran liberados al medio, de donde atravesando la pared de las células vivas se incorporaban a ellas convirtiéndolas en patógenas. ( Figura A ).

En 1944, Avery y colaboradores (4) establecieron que el ADN era el " principio transformante" de los experimentos de Griffith.

Se concluye así que la transformación es el paso de material genético del exterior al interior de una célula, confiriéndole nuevas características genéticas. Este nuevo material que ha penetrado, está

compuesto por pequeños fragmentos de ADN que derivan de una célula bacteriana y son tomados por otras células de la misma especie o de otras especies relacionadas, (49).

Posteriormente, Hotchkiss en 1954 (29) realizó trabajos de transformación con otras características bacterianas, las cuales no tienen que ver con la formación de cápsula. Aisló una cepa penicilina-resistente, Pen<sup>R</sup>, mutante de neumococo tipo S, extrajo su ADN y adicionó el principio transformante a un cultivo de penicilina-sensible, Pen<sup>S</sup>, R mutantes. Encontró que algunas de las bacterias receptoras Pen<sup>S</sup>-R se transformaron en Pen<sup>S</sup>-S otras en Pen<sup>R</sup>-R y finalmente una pequeña fracción en Pen<sup>R</sup>-S- donadoras.

Se obtuvieron transformaciones análogas de extractos de ADN de estreptomicina-resistentes Str<sup>R</sup>, (49).

La transformación se ha podido obtener sólo en pocas especies bacterianas entre las cuales se incluyen Haemophilus influenzae, Neisseria, Streptococcus, Xanthomonas phaseoli, patógeno para las plantas, Rhizobium, Bacillus subtilis y con E. coli se ha observado un tipo especial de transformación que requiere una infección simultánea -- por un fago, (19).

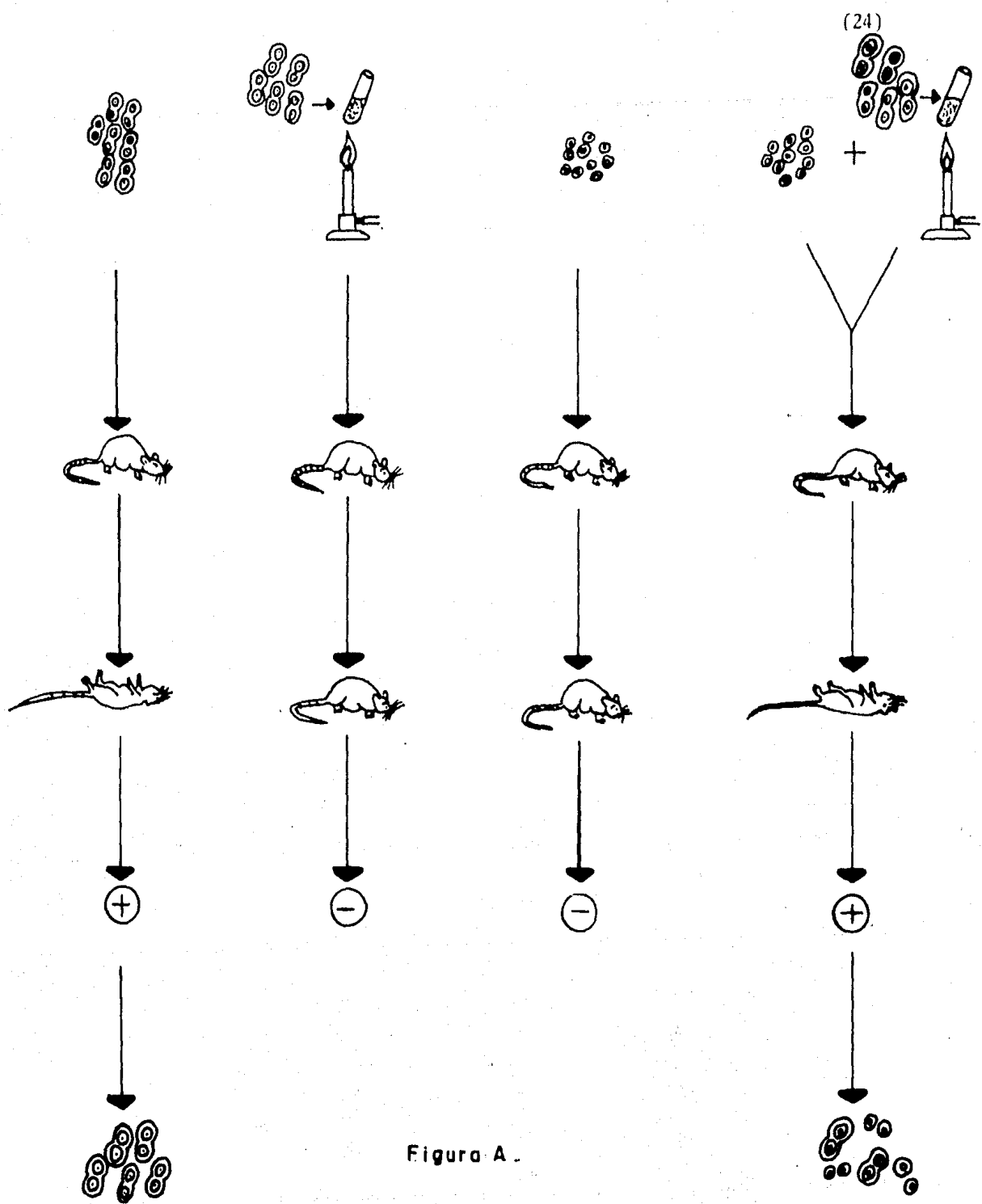


Figura A.  
 TRANSFORMACION.

Figura A  
TRANSFORMACION

Este dibujo expone los experimentos realizados por Griffith en 1928- con Streptococcus pneumoniae . En el primer caso, la inoculación con un pneumococo liso patógeno viable provoca la enfermedad en el ratón. El segundo caso se refiere a la inoculación del pneumococo patógeno- pero destruido; el ratón no murio ni presentó enfermedad. El tercer- caso ejemplifica la inoculación de las células rugosas no patógenas- viables y el ratón no contrae la enfermedad.

La combinación clave de este experimento es el caso 4, en el que se- inoculan células S destruidas y células R viables, hay transforma -- ción de células viables no patógenas y por lo tanto el animal muere- por neumonía.

Tomado de: Stent G. and Calendar R. (1978) " molecular Genetics: An- introductory narrative". Freeman WH & Co., San Francisco. p.p. 182 (Figura 7-2), (49).

## Transducción

En el proceso de transducción, los fagos intervienen en la transferencia del material genético bacteriano de una célula a otra.

Este aspecto de los fagos fué descubierto por Zinder y Lederberg -- (1951) (49), al ver que un pequeño fragmento del cromosoma bacteriano se incorporaba a la partícula de fago que era liberada cuando se lisaba la célula huésped e inyectaba no sólo su propia dotación genética, sino también material genético del primer huésped, (48).

El empleo de estos bacteriógrafos se basa en que el material genético a clonar se halla empaquetado en la cápsula viral, en su capacidad de infectar bacterias y en su capacidad de ser lisogénicos.

La lisogenia es uno de los dos caminos a seguir por el ADN viral -- dentro de la bacteria, consiste en la inserción del material genético del fago en el cromosoma bacteriano, debido a la existencia de un gene viral y de esta manera permite la supervivencia de la bacteria.

En el otro camino llamado lisis, el virus se apropia de la maquinaria genética del microorganismo, se replica y lo rompe, liberando -- nuevas partículas virales (Fig. B), (21,22,39).

La transducción se realiza en gran número de géneros, como Salmonella, Escherichia, Shigella, Pseudomonas, Staphylococcus, Bacillus y Proteus y posee ciertas ventajas para la construcción de mapas: El ADN se halla protegido del medio ambiente, lo cual hace que el proceso sea más fácilmente reproducible y los fragmentos transferidos -- al llevar la cubierta del fago poseen, por lo tanto, una longitud -- más uniforme (19).

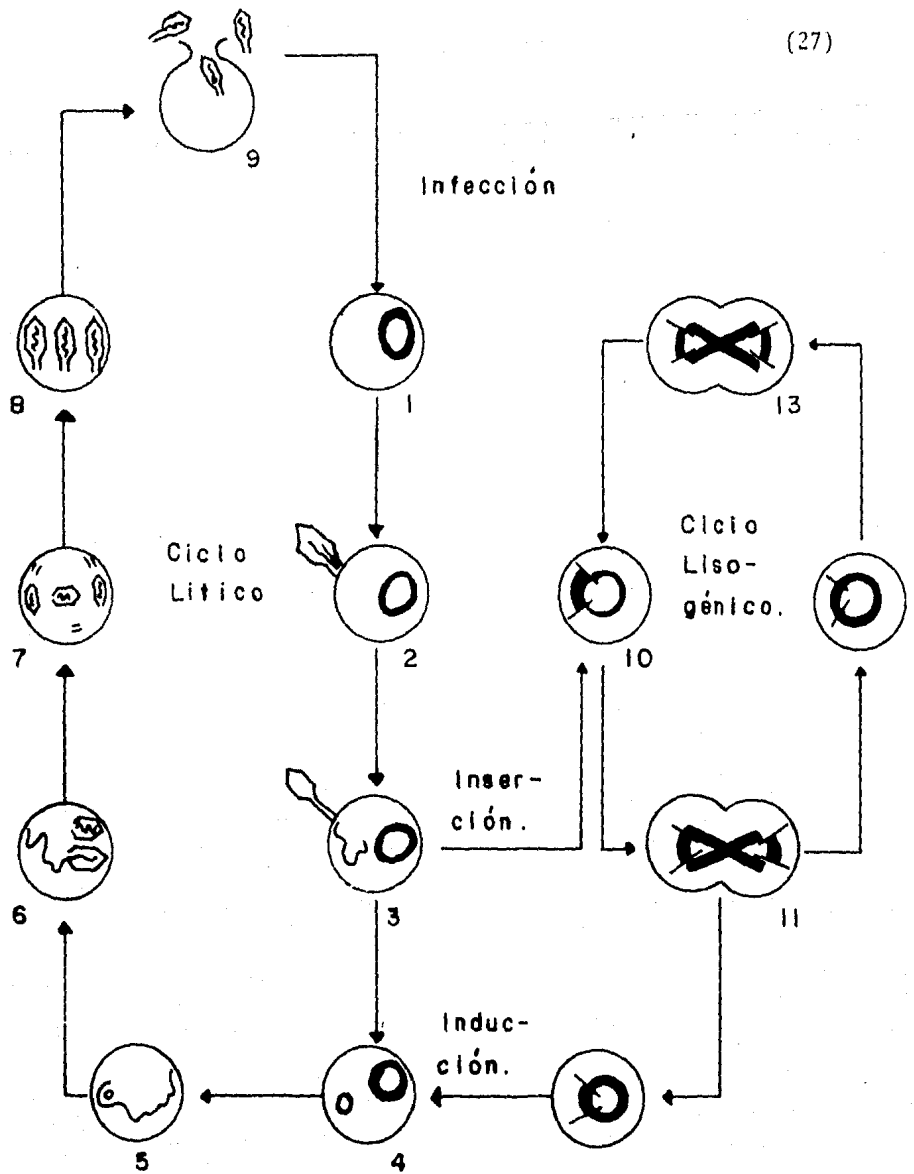


Figura B.

CICLO DE VIDA DEL FAGO LAMBDA.

Figura B  
CICLO DE LA VIDA DEL FAGO LAMBDA

Por medio de esta secuencia esquemática se puede apreciar que no siempre la célula bacteriana se rompe y muere después de ser infectada por el fago lambda. Una vez que el ADN ha penetrado en E. coli (2), puede seguir dos caminos: uno de ellos es la vía lítica en la cual el ADN viral recircula (3 y 4) se replica originando múltiples copias (5). Al mismo tiempo dirige la síntesis y ensamble de proteínas de cabeza y cola de partículas virales y finalmente empaqueta segmentos de ADN en las cápsides (6 y 7). Estas se unen simultáneamente a las colas formando los fagos maduros (8) que al cabo de 60 minutos después de la infección, son liberados al medio para infectar otras células (9 y 1). Por otro lado este colifago puede coexistir en E. coli como parte semipermanente del cromosoma bacteriano (10). Ahí se replica y segrega en la división celular y se va heredando de generación en generación por tiempo indefinido. Este virus latente o provirus mantiene su capacidad lítica y existen factores que pueden provocar el ciclo lítico nuevamente como los rayos X, luz ultravioleta, etc.

Tomado de: Campbell A.- 1978. " How viruses insert their DNA into the DNA of the host cell ".

En recombinant DNA, Reading from Scientific American.

Freeman WH and Co.- Sn. Francisco .- p.p. 71-80



La frecuencia con la que se presenta va desde  $10^{-5}$  a  $10^{-8}$  por célula (43), además se pueden distinguir dos tipos de transducción: la primera llamada transducción generalizada, en la cual cualquier material genético puede ser transformado del donador al receptor, los genes del huésped derivan de cualquier porción del genoma, incorporándose o adicionándose al genoma viral. La segunda, es la transducción especializada: ocurre sólo en virus temperados; un grupo restringido de genes del huésped se integran directamente dentro del genoma del virus (usualmente reemplazan algunos de los genes del virus) y se transfieren al receptor durante la lisogénesis.

Una importante distinción entre ellas, es cómo se formó el lisado en la transducción: en la especializada esto debe ocurrir por inducción de una célula lisogénica; en cambio, en la generalizada, puede ocurrir por infección lítica o por inducción de las células lisogénicas (12, 19).

### Conjugación

En 1946, Lederberg y Tatum (49) llevaron a cabo un experimento con E. coli para revelar que es posible la recombinación por conjugación: Por mutagénesis produjeron dos estirpes auxótrofas de E. coli, que se diferenciaban entre sí en 4 genes. Una estirpe requería para el crecimiento los compuestos biotina (B) y metionina (M), y la otra, los compuestos treonina (T) y leucina (L), o sea ( $B^-M^-T^+L^+$ ) y ( $B^+M^+T^-L^-$ ) Fig.C ), (48).

Se comprobó que la recombinación necesitaba un contacto celular y no un factor soluble como la transformación.

La conjugación bacteriana es un proceso de transferencia genética --

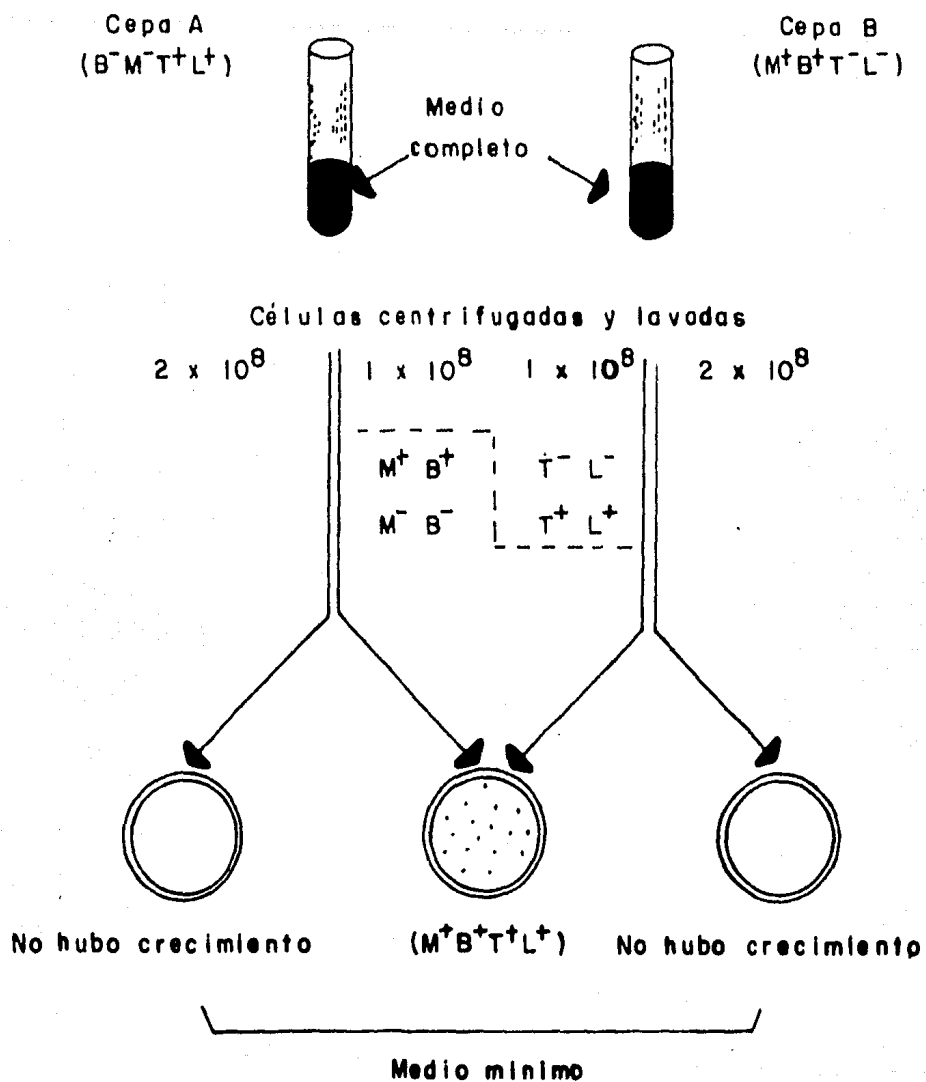


Figura C.

que involucra el contacto directo o apareamiento entre células. El material genético transferido puede ser un plásmido o puede ser una porción del cromosoma, (12,19).

### Plásmidos

Los plásmidos son moléculas de ADN circular en replicación autónoma, cuyo rasgo distintivo reside en su separación física del cromosoma bacteriano huésped, son heredables a las células hijas en la división celular y son capaces de mantenerse en estado extra cromosomal. Hay, sin embargo, plásmidos llamados episomas, que se pueden integrar al cromosoma bacteriano. Un mismo plásmido puede ser episomal en una bacteria y no episomal en otra por ejemplo el factor F de E. coli ( Figura D).

En la actualidad, los plásmidos bacterianos se agrupan en 3 categorías: la primera se halla representada por el llamado factor sexual que contiene la información genética que codifica para la formación de un pili, esta estructura sirve a la célula para la transferencia de información genética a otras células ( conjugación). En la segunda categoría se hallan plásmidos que confieren la resistencia a los antibióticos y/o dictan la síntesis de la colicina y son incapaces de conjugar esta información. La tercera categoría es una mezcla de las dos anteriores, es decir, los plásmidos pueden transferir resistencia a antibióticos o su carácter colicinogénico, por la existencia de un factor de transferencia.

El descubrimiento de los plásmidos permitió entender fenómenos de la genética bacteriana que no se podían explicar en base a simples mutaciones. El ejemplo más claro de esta situación fue la aparición de-

resistencia bacteriana a los antibióticos, determinada por el factor-R. La producción de una resistencia debida a la conjugación de episomas se observó por primera vez en Japón (1959) (59), este fenómeno se observa sólo en las enterobacterias y en algunas otras especies de microorganismos Gram negativos.

La célula donadora, en virtud de la posición del plásmido conjuntativo, contiene una estructura superficial, la cual está involucrada en el apareamiento y la transferencia del ADN. Esta estructura es un pili sexual, el cual unirá la célula donadora con la receptora formando un puente, el plásmido conjugativo posee la información genética para codificar el pili sexual y cualquier otro gene que se necesite para la transferencia del ADN. La conjugación sólo ocurre entre cepas de bacterias que estén estrechamente relacionadas, (12).

Watanabe y Mitsuhashi en Japón (59), investigaron que los factores de resistencia (R) transportan genes que le confieren a la célula huésped resistencia a diferentes agentes antimicrobianos, como los antibióticos. Un solo plásmido puede transportar genes separados para la resistencia a la estreptomicina, cloramfenicol, tetraciclinas, sulfonamidas, penicilinas, neomicinas y kanamicinas. En algunos casos ha sido posible disociar el plásmido en diferentes partículas más pequeñas: elementos denominados factor de transferencia de resistencia -- (FTR) que transportan a los genes que gobiernan los procesos de transferencia intercelular y elementos separados, llamados determinantes R, los cuales transportan los genes de resistencia. En otros casos, los diferentes elementos permanecen ligados estrechamente y entonces se denomina el plásmido, factor R.

La mayor parte de la resistencia gobernada por plásmidos está mediada por inactivación enzimática de la droga (por ejemplo, por acetila-

ción, adenilación o fosforilación), mientras que la resistencia mediada por cromosomas refleja habitualmente una afinidad disminuida de sus moléculas blanco para la droga. En general, del 60 al 90% de los genes de resistencia en los patógenos Gram negativos son transportados en plásmidos transferibles, (12,19,30).

Las medidas para evitar el aumento de resistencias bacterianas, son un elemento importante de las normas generales para el empleo de antibióticos: evitar el empleo innecesario de los mismos especialmente con fines profilácticos, administrar dosis suficientemente elevadas en un período de tiempo limitado y recurrir al tratamiento combinado cuando se administren antibióticos frente a los que puede desarrollarse rápidamente una resistencia, como la estreptomycinina.

Es indudable que la restricción del uso de antibióticos como suplemento alimenticio, sería el paso más factible para detener el aumento de la resistencia bacteriana transferida, pero esta decisión tiene muchos ángulos imperfectos porque escapa a los controles sanitarios.

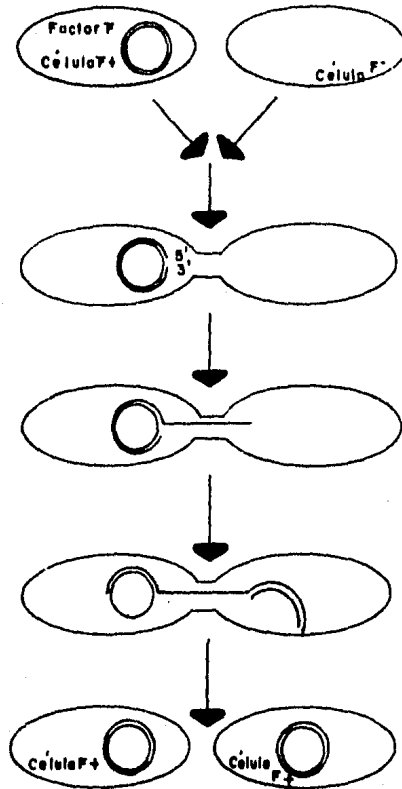


Figura D.

## Figura D.

TRANSFERENCIA DEL FACTOR F DE UNA CELULA F<sup>+</sup> A UNA F<sup>-</sup> DURANTE LA  
CONJUGACION DE E. Coli.

Esta figura ejemplifica la conjugación bacteriana en E. coli por la transferencia del factor F de una célula F<sup>+</sup>. Normalmente una copia del elemento F pasa por el " pili " o tubo de conjugación a la célula F<sup>-</sup>. La célula F<sup>+</sup> retiene una copia de este elemento y de esta forma todas las células de un cultivo se volverán F<sup>+</sup>.

Tomado de: Goodenough U. and Levine P,- 1974.- " Genetics" Holt, -  
Rinehart and Winston Inc. New York.- p.p. 397

4.- Comportamiento de los microorganismos de prueba frente a los antibióticos comerciales.

a) Bacterias.

Staphylococcus (Staphylococcus aureus):

Los estafilococos pertenecen a la Familia Micrococcaceae, son cocos-Gram positivos, crecen agrupándose en racimos irregulares, inmóviles, no forman esporas, no son capsulados, su diámetro varía entre 0.7 y 1.2 micras, Microorganismos facultativos, que desarrollan mejor bajo condiciones aerobias. Algunas cepas crecen entre 6.5° y 46° C - pero el óptimo es 30°-37° C el valor de pH entre 4.2 y 9.3 (óptimo a 7-7.5) y en 15% de NaCl 40% de bilis. Pueden ser miembros de la flora normal de la piel y mucosas del hombre, también se les encuentran regularmente en el aire y en los lugares habitados por el hombre, en tanto que otros causan gran variedad de procesos supurados en el hombre tales como furúnculos, ántrax, osteomielitis, abscesos, infecciones en las heridas, neumonía, empiema, pericarditis, meningitis y artritis purulenta. Ciertas cepas elaboran una enterotoxina que produce intoxicaciones alimentarias, (6,14,16,19,30).

Su comportamiento predecible frente a ciertos antimicrobianos es:

Sensible frente a : Eritromicina, Oxacilina, Rifocina, Novobiocina, - Dicloxacilina, Cefalosporina, Nafcilina, Cloxacilina, Bacitracina, Lincomicina, Meticilina, Clo-ranfenicol, Tretaciclina, Kanamicina, Leucomicina y Gentamicina.



Resistente frente a: Ampicilina, Colistina, Penicilina, Polimixina B y Sulfonamida.

En la actualidad se han continuado las investigaciones encaminadas a esclarecer el comportamiento de Staphylococcus aureus frente a diversos antibióticos comerciales, tal es el caso del estudio realizado por Trejo y Pérez Juan Antonio, Ortíz Gerardo, et. al. en el Hospital de Pediatría del Instituto Mexicano del Seguro Social, en 1981, (52) los cuales probaron 290 cepas de Staphylococcus aureus frente a diferentes agentes antimicrobianos, obteniendo como resultado que la resistencia a la penicilina G fué de un 80-97% y la producción de  $\beta$ -lactamasa fué puesta en evidencia en todas las cepas de prueba, mostrando una mínima inhibición a concentraciones  $> 1 \mu\text{g/ml}$ . La resistencia a otros agentes antimicrobianos fué variable: gentamicina-29.4%, eritromicina 24.5% y rifampicina 12%.

Debido a la creciente resistencia de Staphylococcus aureus a los agentes antimicrobianos conocidos, se han desarrollado nuevos antibióticos como lo son: cefmeroxime, el cual fué dado a conocer por Kenji O., Mitsuzo K., Makoto K. y Susumu M. en 1981 (31); ceftazidime, ceftizodime y cefotiam, que son derivados de las cefalosporinas y fueron evaluados por Bodey G.P., Fainstein V. y Hinkle A.M. en 1981 (11).

#### Micrococcus (Micrococcus luteus ):

Es otro género de la Familia Micrococcaceae, caracterizado por encontrarse los microorganismos solos, en pares y la forma de división en tres planos da lugar a la formación de racimos irregulares o paquetes de células regulares, pero nunca en cadenas. Usualmente cocos -

Gram positivos, miden 1-2 micras de diámetro. Forman un pigmento amarillo o naranja en agar, inmóviles, aerobios estrictos, su ciclo de la glicolisis funciona solo bajo condiciones aerobias. Los ciclos del ácido cítrico y hexosamonofosfato, son los principales caminos de requerimiento de energía. Parásitos facultativos, algunos son saprotrofos de vida libre y otros patógenos. Se encuentran en la piel, la garganta y la nasofaringe, algunas formas están en el suelo o son marinas, también se encuentran en el aire, polvo, leche y pus, (6,14, 16).

Su comportamiento predecible frente a ciertos antimicrobianos es:

Sensible frente a : Lizosima y a Novobiocin algunas cepas

Resistente frente a: Lisis por Lisostafina ( 1 Unidad/ml.)

Streptococcus ( Streptococcus faecalis):

En el género Streptococcus, de la Familia Streptococcaceae, se incluyen microorganismos que se dividen en planos paralelos para formar cadenas de cocos.

Los miembros de este género son Gram positivo, de forma esférica u oval miden de 0.5 a 1 micra de diámetro, inmóviles, facultativos, no esporulados. Las cepas virulentas poseen cápsula que es de ácido hialurónico. Se encuentran ampliamente distribuidos en la naturaleza y pueden hallarse en la leche, los productos lácteos, el queso, el agua, el polvo, en los vegetales y en la boca e intestinos de varios animales inclusive en el hombre. Los estreptococos se encuentran relacionados con una gran variedad de estados patológicos, entre los que se cuentan la erisipela, las infecciones focales, la endocarditis bacteriana, la fiebre reumática, la escarlatina, la amigdalitis,

la artritis, la fiebre puerperal y la faringitis.

Pocos tejidos del cuerpo humano son inmunes a la infección estreptocócica, (6,14,16,30).

Su comportamiento predecible frente a ciertos antimicrobianos es:

Sensible frente a: Penicilina + Estreptomina, Penicilina, Ampicilina, Bacitracina, Neomicina y Estreptomina .

Resistente frente a : Sulfamidas, Cefaloridina, Cloxacilina, Colistina, Eritromicina, Gentamicina, Kanamicina, Lincomicina, Meticilina, Nafcilina, Novobiocina, Oxacilina y Polimixina B.

Bacillus ( Bacillus subtilis y Bacillus cereus):

De la Familia Bacillaceae, los microorganismos del género Bacillus son grandes y se agrupan formando cadenas, Gram positivos que se tñen con los colorantes ordinarios de la anilina, forman esporas y son aerobios.

La mayoría de los miembros de este género son microorganismos saprofitos como Bacillus subtilis y Bacillus cereus que prevalecen en el suelo, el agua, el polvo, la leche y sobre vegetales diversos. Algunos son patógenos de los insectos. Tales microorganismos raramente producen enfermedades en el hombre.

Entre los miembros del género Bacillus, el tamaño y la estructura de la espora es un carácter constante y distintivo que sirve como base para la identificación en Bacillus subtilis y Bacillus cereus, el -

diámetro de la espora nunca es mayor que el de la célula vegetativa, por ello ésta no se deforma al tener lugar la esporulación.

Bacillus subtilis:

Son bacilos rectos o curvos, con extremos redondeados, se encuentran aislados o en cadenas cortas, miden 3 a 4 micras de largo por 1 micra de ancho. Forman esporas centrales, subterminales, ovales y que germinan lateralmente. Miden 1.2 micras por 0.6 micras y aparecen sobre el agar en 18 horas. Móviles por 8 a 12 flagelos peritricos.

Bacillus cereus:

Las células de Bacillus cereus son pequeñas, gruesas, con extremos truncados o ligeramente redondeados, se presentan aisladas, en pares, en pequeños grupos y en cadenas, algunas de sus cepas (B. cereus variedad mycoides) están caracterizadas por la facultad de formar cadenas muy largas de células.

Esta propiedad estructural da a sus colonias en agar un aspecto muy notable, miden 0.8 micras a 1.3 micras por 2 a 6 micras, esporulados con esporas grandes, centrales, ovales que miden de 1 a 1.6 micras por 2 a 2.5 micras y que aparecen en un término de 24 a 48 horas, (14,16,30,48).

Su comportamiento predecible frente a ciertos antimicrobianos es:

Bacillus subtilis:

Sensible frente a : Ampicilina, Penicilina, Sulfamidas y Estreptomina.

Resistente frente a : Bacitracina, Colistin, Gentamicina, Neomicina y Polimixina B.

Bacillus cereus:

Sensible frente a : Ampicilina, Penicilina, Cefaloridina, Estreptomina y Sulfamidas.

Resistente frente a: Gentamicina, Polimixina B y Neomicina.

Escherichia ( Escherichia coli):

Las bacterias coliformes de la Familia Esterobacteriaceae son bacilos cortos, gruesos, Gram negativos, que se encuentran aislados, en pares ó formando cadenas cortas, miden 0.5 micras de ancho por 1 a 3 de largo, se tiñen bien con los colorantes de anilina, muchas cepas son móviles con flagelos peritricos, son microorganismos facultativos. Las cápsulas son raras en E. coli y no son esporulados, Escherichia coli es la especie predominante en el intestino grueso del hombre y animales; sólo se transforma en patógeno cuando alcanza otro tejido, particularmente en:

- 1) Infecciones aisladas pero a veces graves y a menudo fatales, siendo las más frecuentes las de vías urinarias, donde causa la cistitis o también pielitis, pielonefritis, apendicitis, peritonitis, infecciones vesiculares, septicemia, meningitis y endocarditis.
- 2) Diarrea epidémica del recién nacido.
- 3) Diarrea estival, (14,19, 30).

Su comportamiento predecible frente a ciertos antimicrobianos es:

Sensible frente a: Cefalosporina, Colimicina, Acido Nalidíxico, Kanamicina, Tetraciclina, Ampicilina, Gentamicina, Cloramfenicol, Aminoglucósidos, Fosfomicina, Nitrofurantoina y Neomicina.

Resistente frente a: Penicilina, Bacitracina, Cloxacilina, Oxacilina, Eritromicina, Lincomicina, Meticilina, Nafcilina y Novobiocina.

Recientemente se han incrementado el número de cepas de Escherichia coli enteropatógenas que afectan a la población infantil, tal hecho ha ido al parejo con la resistencia adquirida por las mismas, frente a la gran variedad de antibióticos que existen en la actualidad. De los estudios realizados referentes a la transmisión de la resistencia, podemos mencionar los desarrollados por Vakulenko S.B., et. al. en Moscú, Rusia en el año de 1979, quienes detectaron el mecanismo de transmisión de plásmido-R, (55); y el trabajo desarrollado por Tantulavanich S. et. al. en 1981 en los Estados Unidos, en donde concluyeron que el plásmido-R parece ser el elemento genético predominante responsable de la transmisión de la resistencia de carbenicilina, gentamicina y tobramicina entre las bacterias asociadas a hospitales, (51).

Otros estudios enfocados a la resistencia de E. coli frente a los antibióticos son los desarrollados por Brow R.E., Stancato F.A., y Wolfe A.D. en 1981, quienes determinaron la influencia de una nueva tiosemicarbazona en su crecimiento y síntesis macromolecular causando bacteriostasis (13); Tsuji Hikoji, et.al. en la Universidad de Tokio, Japón en 1982, probaron 100 cepas frente a importantes antibió-

ticos  $\beta$ -lactámicos como : cefuroxima, cefoxitin, cefamandol, cefalexin, cefazolin, cefaloridina, cefalotina, ampicilina, carbenicilina y kanamicina, dando una mayor resistencia frente a ampicilina y carbenicilina y siendo moderada frente a cefalotina , cefaloridina y cefamandol (53) ; todas las cepas que examinaron Larsen, Jens Laurits y Soegard Henry, en 1981 fueron sensibles a polimixina B y colistina, el 50-60% fué resistente a estreptomycin, sulfonamidas y tetraciclinas, 2.5% a cloramfenicol, 11.5% a ampicilina (33).

Carlone N.A. et. al. en Italia en 1980, estudiaron una mezcla de amoxicilina-fosfomicina que resultó sinérgica contra bacterias sensibles a ambos antibióticos (17).

#### Shigella ( Shigella flexneri):

El género Shigella son bacilos Gram negativos, inmóviles, facultativos, no esporulados, no capsulados, miden 0.4 a 0.6 micras de grueso y de 1 a 3 micras de largo. En los cultivos jóvenes pueden presentarse formas cocobacilares, se tiñen fácilmente con los colorantes de anilina. Como todos los de la Familia Enterobacteriaceae, poseen estructura antigénica compleja, muchas especies comparten antígenos comunes con otras bacterias intestinales. Su hábitat natural está limitado al intestino del hombre y otros primates, en el que algunas especies producen la disentería bacilar, una enfermedad intestinal de corta duración caracterizada por dolor abdominal, calambres, diarrea con moco y sangre y fiebre.

El microorganismo causante puede ser una de las varias especies de Shigella de las cuales Shigella dysenteriae es la más virulenta , (14, 30, 48).

Su comportamiento predecible frente a ciertos antimicrobianos es:

Sensible frente a : Polimixina B, Cefalosporina, Tetraciclina, Colimicina, Cefalostina, Acido nalidíxico, Kanamicina, Gentamicina, Ampicilina y Sulfas.

Resistente frente a : Nafcilina, Meticilina, Bacitricina, Cloxacilina Eritromicina, Lincomicina, Cloramfenicol, Tetraciclinas, Sulfadiazina, Estreptomina, Penicilina y Novobiocina.

Hansson H.B., Walder M. y Juhlin I. en 1981, en un estudio realizado en Suecia, probaron 199 cepas de Shigella frente a diferentes antimicrobianos, obteniéndose como resultado que Shigella flexneri fué resistente frente al mecillinam, ác. nalidíxico y trimetoprim; menos susceptible a ampicilina, cloramfenicol y doxyciclina; y el 64% de las cepas fueron resistentes a sulfametoxazol, (28).

Salmonella ( Salmonella typhi):

El género Salmonella pertenece a la Familia Enterobacteriaceae. Son bacilos gruesos, cortos, móviles con flagelos peritricos, por lo general alrededor de 12 dispuestos periféricamente. Gram negativos, facultativos, se encuentran aislados, en pares y ocasionalmente en cadenas cortas. Miden 0.6 a 0.7 micras de grueso y 2 a 3 micras de largo, se tiñen con los colorantes de anilina, son no capsulados y no esporulados. Poseen antígenos H ó flagelar específico, antígenos somáticos de grupo denominado O y algunas especies tienen antígenos Vi ó antígenos de virulencia. Su hábitat son las heces de enfermos de fiebre tifoidea o de portadores de microorganismos.

Son de especial importancia para el hombre, por su papel etiológico -



en las enfermedades transmitidas por los alimentos, existiendo la producción de trastornos gastrointestinales violentos, de presentación brusca después de un corto período de incubación, por lo común transitorios.

El mecanismo de transmisión suele ser por medio de alimentos, agua ó leche contaminados y por las moscas.

Salmonella typhi produce tres tipos de enfermedad:

1) Gastroenteritis, 2) Fiebres entéricas, características en el intestino delgado, como la fiebre tifoidea, con invasión de la sangre, 3) Septicemia, sin ninguna manifestación entérica, (14,30).

Su comportamiento predecible frente a ciertos antimicrobianos es:

Sensible frente a : Polimixina B, Cefalosporina, Colimicina, Acido nalidíxico, Kanamicina, Trimetropina + Sulfametoxazol, Ampicilina, Gentamicina, cloramfenicol y Tetraciclina.

Resistente frente a : Novobiocina, Nafcilina, Meticilina, Sulfamidas, Oxacilina, Ertitromicina, Cloxacilina, Bacitracina, Penicilina y Lincomicina.

Debido a la frecuencia con que se presentan las enfermedades causadas por los diferentes tipos de Salmonella, es uno de los microorganismos que más se ha estudiado con respecto a la resistencia a antimicrobianos; así podemos mencionar los trabajos realizados por Bhatia Rajesh Vaze S. y Agarwl D.S., en Nueva Delhi, India en 1981 (10), quienes obtuvieron los siguientes resultados al probar 34 cepas de Salmonella-

typhimurium frente a diferentes antimicrobianos: 28 de ellas (82.35% mostraron resistencia a ampicilina, cloramfenicol, gentamicina, kanamicina, estreptomina, tetraciclina; 6 (17.65%) a ampicilina, cloramfenicol, kanamicina, estreptomina y tetraciclina, la resistencia a ampicilina fué autotransferible en 33 cepas (97.06%). Van Leeuwen, W. J., et. al. (57) en 1982 publicaron su trabajo realizado entre 1975 a 1980 en el cual probaron la resistencia de 130,000 cepas de Salmonella frente a ampicilina, cloramfenicol, kanamicina, tetraciclina y trimetoprim; observaron que la resistencia a tetraciclina decreció del 80% en 1974 al 25% en 1980 en Salmonella typhimurium; también en contraron que predominaba la presencia del fago 193 el cual les confiere dicha resistencia a las drogas antes mencionadas.

Otros trabajos nos ilustran la capacidad que presentan en la transmisión de dicha resistencia; por ejemplo podemos mencionar los estudios de Schmidt F, Van Treeck U y Wiedemann B. en 1979, (45) sobre el plásmido rBP11 en Salmonella typhimurium que confiere resistencia a ampicilina y Sulfonamidas. Koltsida K, Paraskevopoulou P. y Kontomichalou P. en Grecia en 1979 (32), mencionan 30 cepas de Salmonella heidelberg resistentes a la ampicilina, que transfirieron esta resistencia a E. coli, también transfirieron resistencia a carbenicilina entre 4-16 veces más.

Pohl P. et. al. en 1981 (42) en Francia y Bélgica, aislaron 449 cepas multirresistentes de Salmonella, de las cuales en 236 cepas encontraron la presencia del plásmido-R, Inc H que confiere resistencia a  $\geq 4$  antimicrobianos y a compuestos de telurio. Mago M.L., Saxena S.N. y Ahuja S. en la India en 1982, (34) probaron un total de 474 cepas resistentes a múltiples drogas debido a su capacidad de transferir resistencia.

Klebsiella ( Klebsiella pneumoniae):

Incluidos en el género Klebsiella de la Familia Enterobacteriaceae, - están microorganismos caracterizados por poseer una gruesa cápsula ge latinosa que da a sus cultivos una consistencia mucóide. Son bacilos gruesos, cortos, con extremos redondeados, Gram negativos, inmóviles.

Se encuentran aislados ó en pares, miden 0.5 a 0.8 micras por 1 a 5 - micras. Se tiñen con los colorantes ordinarios de anilina, facultati vos. Algunas cepas poseen antígenos somáticos (O) y capsulares (K) co munes.

Se encuentran en la nariz, boca, tubo digestivo y en infecciones del aparato respiratorio y urinario. Son la causa de una pequeña propor ción de todos los casos de neumonía, los cuales son casi siempre mor tales, también se han encontrado como causa de otitis media, empiema, pericarditis, meningitis y septicemia y se encuentran con frecuencia relacionados con las bronquitis aguda y crónica, (6,14,16,19).

Su comportamiento predecible frente a ciertos antimicrobianos es:

**Sensible frente a :** Colistina, Neomicina, Polimixina B, Cefalospori nas, Aminoglucósidos, Cloramfenicol, Estreptomici na, Tetraciclina, Gentamicina, Kanamicina, Nitrofu rantoína y Sulfamidas.

**Resistente frente a :** Bacitracina, Penicilina, Cloxacilina, Eritromi cina, Lincomicina, Meticilina, Nafcilina, Novo biocina y Oxacilina.

Enterobacter (Enterobacter sp. y Enterobacter hafniae):

En la Familia Enterobacteriaceae se encuentra clasificado el género - Enterobacter es similar morfológicamente a Escherichia , pero se difieren por medio de pruebas fisiológicas. Son bacilos rectos, Gram-negativos, frecuentemente móviles y por lo común capsulados, no esporulados, facultativos. Se encuentran ampliamente distribuidos en la naturaleza, en la leche , en los granos, en los desagües, en el agua y en el conducto intestinal. Poseen un bajo grado de patogenicidad para el hombre; sin embargo, pueden causar enfermedades en las vías urinarias, (14,19) . Enterobacter hafniae está algunas veces asociado con gastroenteritis, (16,30).

Su comportamiento predecible a ciertos antimicrobianos es:

Enterobacter sp.

Sensible frente a : Polimixina B, Colistina, Gentamicina, Aminoglucósidos, Kanamicina, Neomicina y Cloramfenicol.

Resistente frente a : Ampicilina, Bacitracina, Cloxacilina, Eritromicina, Lincomicina, Meticilina, Nafcilina, Novobiocina, Oxacilina, Penicilina, Estreptomicina y Sulfamidas.

Enterobacter hafniae:

Sensible frente a : Gentamicina, Cloramfenicol, Kanamicina, Nitrofurantoína y Tetraciclina.

Resistente frente a : Bacitracina, Cloxacilina, Lincomicina, Eritromicina, Meticilina, Nafcilina, Novobiocina y Penicilina.

Serratia ( Serratia marcescens):

Es un bacilo cromógeno, que puede producir un pigmento de color rojo-intenso ( prodigiosina ) en el cultivo, no es esporulado , Gram negativo, pequeño, aerobio, móvil con flagelos peritricos, algunas cepas capsuladas, generalmente de vida libre, encontrándose en el agua, en el suelo, alimentos y saprofitos en plantas descompuestas.

Ocasionalmente se encuentra en muestras patológicas, en las cuales -- pueden crecer después de la recolección, (14,16,30).

Su comportamiento predecible frente a ciertos antimicrobianos es:

Sensible frente a : Fosfomicina, Aminoglucósidos, Gentamicina, Kanamicina y Neomicina.

Resistente frente a : Ampicilina, Bacitracina, Cefaloridina, Cefalotina, Cloxacilina, Eritromicina, Lincomicina, Meticilina, Nafcilina, Oxacilina, Novobiocina, Penicilina y Sulfamidas.

En general Serratia marcescens es altamente resistente a varios antibióticos. Esta resistencia se vió que era debida a  $\beta$  - lactamasas presentes en un plásmido-R, aunque las cepas de Serratia marcescens sin éstas son también muy resistentes a casi todos los antibióticos  $\beta$  - lactámicos comercialmente disponibles. Se mencionó que una nueva penicilina semisintética: apalcilina (50) y las cefalosporinas semisintéticas: ceftizoxime (50) y cefmeroxime (31) tienen una potente

actividad contra bacterias Gram negativas incluyendo a Serratia marcescens.

Olexy, Vera M., et. al en 1982 (41), estudiaron que las cepas de Serratia marcescens que contienen plásmidos-R, transfieren resistencia a  $\geq 11$  antibióticos. Las que contienen un solo plásmido-R con una masa de 89 megadaltons (Mdal) codifican resistencia para 9 antibióticos: ampicilina, carbenicilina, cefalotin, estreptomina, kanamicina, gentamicina, tobramicina, sisomicin y sulfonamidas; en cambio, - las que contienen 2 plásmidos-R de 89 Mdal y 59 Mdal; sobre todo éste último, codifican para ampicilina, carbecilina, cefalotin, kanamicina, neomicina y tetraciclinas.

Miller, Marcia A., Lefrock, Jack L. y Vercler Mary., en 1981 (35) - probaron 20 cepas frente a N-formimidoil tienamicina, moxalactam, cefotaxime, cefoperazone y 3 ureidopenicilina; azlocilina, mezlocina y piperacilina. A una concentración de  $< 0.97 \mu$  g/ml, se inhibió el 100% de los microorganismos frente a N-formimidoil tienamicina y cefotaxime, el 90% frente a moxalactam y el 60% frente a cefoperazone.

#### Proteus ( Proteus sp.):

De la Familia Enterobacteriaceae, son bacilos Gram negativos, pequeños, delgados y pleomorficos, se encuentran aislados, en pares y frecuentemente en cadenas largas, miden de 0.5 a 1 micra por 1 a 3 micras, aerobios facultativos, activamente móviles con flagelos peritricos, no esporulados, no capsulados. Su hábitat es el suelo, el contenido intestinal del hombre, agua rica en materia orgánica, y materiales putrefactos.

Proteus, como los bacilos coliformes, producen enfermedades en el hombre sólo cuando abandonan su habitat normal en el intestino. Se hallan frecuentemente en enfermedades crónicas de las vías urinarias y lesiones focales en pacientes debilitados, o en aquellos que están recibiendo infusiones intravenosas. Proteus vulgaris se encuentra normalmente formando parte de la flora fecal del intestino.

Proteus morganii (Morganella morganii,) (58) ha sido culpado de las diarreas de verano en niños. Proteus rettgeri (Providencia rettgeri (58) y Proteus morganii (Morganella morganii (58) se encuentran en las enfermedades de los hospitales, (14, 30).

Su comportamiento predecible frente a ciertos antimicrobianos es:

Sensible frente a: Gentamicina, Kanamicina, Cloramfenicol, Nitrofurantoína y Neomicina.

Resistente frente a: Tetraciclina, Meticilina, Nafcilina, Novobiocina, Oxacilina, Lincomicina, Penicilina, Ampicilina, Bacitracina, Cloxacilina, Colistina, Eritromicina, Polimixina B y sulfamidas.

Pseudomonas (Pseudomonas aeruginosa):

El género Pseudomonas pertenece a la Familia Pseudomonadaceae, está compuesto por bacilos Gram negativos, móviles con flagelos polares, aerobios, que producen pigmentos que se difunden a través del medio (fluoresceína, en verde y en piocianina, en azul). Se encuentran ampliamente distribuidos en el suelo, el agua, las aguas negras y el aire.

Pseudomonas aeruginosa se presenta frecuentemente en pequeña proporción en la flora intestinal habitual. Es patógena sólo cuando se introduce en zonas que carecen de las defensas normales o cuando participan en enfermedades mixtas. Produce daño de las heridas y que maduras, dando lugar a pus verde azulado; meningitis, cuando es introducida por punción lumbar; enfermedades de las vías urinarias, cuando es acarreada por catéteres o instrumentos o por irrigación con soluciones. En ocasiones es responsable de lesiones inflamatorias de las vías auditivas, (16,19,30), en todos los casos puede dar como complicación un cuadro septicémico

Su comportamiento predecible frente a ciertos antimicrobianos es:

Sensible frente a : Gentamicina, Polimixina, Carbenicilina, Cloramfenicol, Colistina y Estreptomina.

Resistente frente a : Penicilina, Ampicilina, Bacitracina, Cefaloridina, Cloxacilina, Eritromicina, Kanamicina, Lincomicina, Meticilina, Nafcilina, Novobiocina y Oxacilina.

Olexy, Vera M., et. al. en sus estudios realizados en 1982 (41), también observaron que las especies de Serratia marcescens con un plásmido-R de 89 Mdal, lo transmiten por conjugación a Pseudomonas aeruginosa y así presentan resistencia a carbenicilina, estreptomina, Kanamicina, gentamicina, tobramicina y sisomicina.

Brucella ( Brucella abortus ):

El género Brucella pertenece a la Familia Brucellaceae. Son cocobacilos Gram negativos, aerobios, inmóviles, no esporulados y con rela



tiva inactividad metabólica. Se presentan aislados, en pares, cadenas cortas, miden 0.4 micras por 1 micra, puede demostrarse la presencia de cápsulas en las variantes lisas y mucoides. Son parásitos estrictos y patógenos para animales de sangre caliente, caracterizados por su existencia intracelular y capaces de invadir los tejidos animales, en los que causan diversas manifestaciones de la brucelosis, incluyendo el aborto contagioso de las cabras, vacas y cerdos, así como la fiebre ondulante o fiebre de Malta en el hombre, que se caracteriza por una fase septicémica aguda, seguida por un estadio crónico que pueden prolongarse muchos años y llegar a afectar diversos tejidos. Su hábitat es la leche de vaca, de allí que el hombre adquiere la enfermedad más comúnmente bebiendo leche no pasteurizada procedente de animales infectados, (6,14,16,30).

Su comportamiento predecible frente a ciertos antimicrobianos es:

Sensible frente a : Tetraciclina, Ampicilina, Rifampicina, Colistina  
Cloramfenicol, Eritromicina, Gentamicina, Kanamicina, Polimixina B y Sulfamidas.

Resistente frente a : Bacitracina, Cefaloridina, Cefalotina, Cloxacilina, Lincomicina, Meticilina, Nafcilina, Nofloxacina, Novobiocina, Oxacilina, Penicilina y Estreptomina.

#### B) Levaduras:

Las levaduras son hongos unicelulares que se diferencian de las bacterias por su gran tamaño y por sus formas ovales, alargadas, elípticas o esféricas, así como por la producción de gemaciones durante el proceso de división y, bajo ciertas condiciones, forman esporas y as

ascosporas que germinan por ruptura a través de la pared celular. Las levaduras pueden desarrollar dentro de amplios márgenes de pH, en presencia de sacarosa al 55% o a concentraciones superiores, se desarrollan mejor a una temperatura de 25° - 28° C.

Estos microorganismos producen pigmentos de muchos colores, siendo los más comunes los rojos y negros. La observación microscópica de las levaduras en crecimiento permite ver formas en diversos estados, algunas de ellas con varias gemaciones.

Las levaduras destacan por su alto poder de fermentación, producen principalmente alcohol y bióxido de carbono del azúcar, en condiciones anaerobias. Se utilizan en la fabricación de vinos y cerveza y en la producción comercial del alcohol. En la industria de la panadería, las levaduras se utilizan para hacer subir el pan por la formación de burbujas de CO<sub>2</sub>.

Algunas levaduras sintetizan vitaminas, como la riboflavina.

#### Rhodotorula ( Rhodotorula sp.):

Son levaduras asporógenas que algunas veces producen un pseudomicelio de tipo primitivo. Se reproducen por gemación multipolar. Están ampliamente distribuidas en la naturaleza y, con frecuencia, se encuentran en el aire y el polvo.

Las especies de este género forman colonias color de rosa, rojas o anaranjadas, con células independientes que se reproducen por gemación, sin filamentos, con presencia eventual de ascosporas en su interior. Son levaduras no patógenas saprofitas de la piel, a menudo se les halla como microorganismos contaminantes en el laboratorio microbiológico, (54).

Saccharomyces ( Saccharomyces sp., Saccharomyces cerevisiae, Saccharomyces fructum, Saccharomyces uvarum, Saccharomyces boyanus, Saccharomyces cidri):

Son levaduras ascospórogenas que producen células alargadas, ovoides o esféricas, con micelio escaso o ausente. Se reproducen por gemación multipolar y por formación de ascas, en las que se encuentran de 1 a 8 esporas. Este grupo representan a las levaduras de mayor importancia industrial, entre las que se halla Saccharomyces cerevisiae, empleada en la elaboración de la cerveza, del pan y en las industrias de la destilación. Estos microorganismos están muy ampliamente extendidos en las frutas (especialmente las uvas) y en las verduras, en las que producen la fermentación de los azúcares con desprendimiento de  $\text{CO}_2$  y liberación de etanol, (54).

Los estudios realizados por Rodríguez R.J., Parks L.W. en 1981 (44), demostraron que el compuesto 5 azasterol inhibe biosíntesis de esteroides en hongos y plantas, causando la acumulación de  $\Delta^{8,14}$  esteroides.

En Saccharomyces cerevisiae esta inhibición ocurre rápidamente después de que se expuso a la droga, resultando en la síntesis de igitosterol antes que ergosterol, el cual se encuentra normalmente en esta levadura.

Candida ( Candida albicans, Candida parapsilosis y Candida tropicalis):

Microorganismo levaduriforme oval y gemante, mide de 2 a 3 por 4 a 6 micras, produce pseudomicelio.

En sabouraud se desarrollan colonias blandas, color crema, que tienen olor a levaduras, se desarrollan en 24-48 horas a  $25^\circ \text{C}$ . Unas

pocas especies tienen importancia industrial y médica.

Es miembro de la flora normal de las mucosas de los sistemas respiratorio, digestivo y genital femenino. A veces se presenta enfermedad general progresiva en pacientes debilitados, con supresión inmunitaria, en otras ocasiones candidiasis de las membranas mucosas, candidiasis cutánea (una infección de la piel, uñas, etc.) candidiasis broncopulmonar y candidiasis pulmonar que es probablemente la más seria de todas; puede producir septicemia, tromboflebitis y daño ocular y de otros órganos, cuando se introduce intravenosamente. También puede producir el algodoncillo en la boca de los niños, (2, 14, 30).

### C) Hongos

A diferencia de las bacterias verdaderas y de la mayoría de las levaduras, los hongos crecen formando una masa enmarañada que se extiende rápidamente y puede llegar a cubrir una superficie de varias pulgadas en 2-3 días. Una gran parte de esta masa, o su totalidad, se denomina micelio, y está compuesto de filamentos o ramificaciones llamadas hifas.

Los hongos tienen importancia en la industria de alimentos (del pan y el queso) en la industria farmacéutica (productores de poderosos antibióticos) y también en la salud humana, ya que causan infecciones micóticas en el hombre como son las micosis superficiales de la piel, el pelo y uñas; las micosis profundas que producen complicaciones generalizadas y en ocasiones mortales, (30).

Aspergillus ( Aspergillus niger, Aspergillus soyae, Aspergillus sp):

Descomponen una amplia variedad de materias de desecho, también causan la descomposición de alimentos, madera, papel u otros artículos orgánicos debido a la gran cantidad de enzimas que producen, los pacientes con leucemia o linfoma, individuos con inmunidad deprimida o especialmente después del trasplante de órganos y aquellos que están recibiendo terapéutica intensa con corticoesteroides, se hallan particularmente susceptibles a la aspergilosis, cientos de especies de este género producen aflatoxinas carcinogénicas.

Por su potente actividad enzimática se emplean en varios procesos industriales: Aspergillus niger comercialmente produce del 87 al 100% del ácido cítrico comercial y también ácido glucónico, aunque es un contaminante de los laboratorios bacteriológicos y micológicos. Aspergillus orizae es uno de los fermentadores industriales más importantes, en Japón se usa para hacer sake, una bebida alcohólica derivada del arroz, (14).

Penicillium ( Penicillium sp.):

Sobre los alimentos producen colores típicos como azul o verde azulado. Estos mohos son importantes en la elaboración de ciertos quesos y en la producción de ácidos orgánicos tales como cítrico, fumárico, oxálico, glucónico y gálico. Otros tienen interés en la producción de antibióticos ( por ejemplo, penicilina). Se encuentran distribuidos en el suelo, aire, polvo y otros muchos lugares, y se pueden hallar en alimentos como el pan, pasteles, frutas y compotas. Algunas especies producen la " podredumbre blanda de las frutas maduras" - aunque también se presenta en verduras y otros alimentos, (14).

Rhizopus ( Rhizopus sp.):

Al igual que penicillium, se encuentran ampliamente difundidos en la naturaleza y se pueden hallar en alimentos como las frutas, pasteles, compotas y pan, a la especie Rhizopus stolonifer frecuentemente se le conoce con el nombre de "moho de pan". Ciertas especies se han empleado en la fermentación alcohólica del almidón. Rhizopus nigricans, el moho que comunmente también crece sobre el pan se utiliza comercialmente en la manufactura del ácido fumárico y en algunos pasos en la manufactura de la cortisona. Rhizopus oryzae -- puede producir considerables cantidades de ácido láctico, así como de ácido cítrico, succínico, oxálico y otros productos químicos importantes.

Es un ficomiceto saprofito que invade ocasionalmente los tejidos -- del huésped que tiene comprometidas sus defensas, como en diabetes-mellitus con acidosis, quemaduras externas, tuberculosis, leucemia, linfoma, otras enfermedades crónicas, o en los individuos a quienes se les está administrando médicamente supresores de la inmunidad, - proliferando dentro de la pared de los vasos sanguíneos, produciendo trombosis.

Agentes frente a los cuales los hongos y levaduras son:

Sensibles frente a: Polienos, Griseofulvina (dermatofitos), Anfotericina B, Nistatina, 5 Fluorcitocina, Cicloheximida, Piramicina, Fulcina, Actidione y Rimocidina.

Resistente frente a: Sulfamidas, Penicilinas, Tetraciclinas, Cloramfenicol y Estreptomicina.

En la actualidad es un campo que se está trabajando intensamente debido al incremento de enfermedades producidas por estos microorganismos y la todavía poca información que existe referente a los antibióticos que actúan sobre los mismos, la terapia corriente para las dermatomycosis depende principalmente de agentes antifúngicos que pertenecen a 4 diferentes grupos químico: imidazoles, tiocarbamatos, polienos y griseofulvinas; así por ejemplo tenemos el trabajo de Georgopoulos A., Petranyi G., Mieth H. y Drews Jürgen, en 1981 (26), quienes observaron que Naftifine presenta un interesante espectro de actividad in vitro contra dermatofitos, aspergilos, Sporothrix schenckii y levaduras del género Candida.

## MATERIAL Y METODOS

## 1) Esponjas

En las costas de México se lleva a cabo la colecta de las esponjas marinas utilizadas, por medio de buceo libre y buceo autónomo, a profundidades entre 3 y 15 metros. Las esponjas son inmediatamente congeladas en hielo seco y transportadas al laboratorio para su estudio donde se conservan en congelación (-8°C) en bolsas de polietileno y sin la adición de alguna sustancia química o conservador.

Las esponjas Ianthella ardis, Haliclona rubens y Verongia fistularis ( V-I-25, V-I-27 y V-I-31 respectivamente) provienen del arrecife La Blanquilla Veracruz, con temperatura anual promedio de 28°C, y la esponja Haliclona sp.(Z-29) de Bahía Zihuatanejo, Guerrero, con temperatura anual promedio de 26°C.

Las esponjas estudiadas son objeto de investigación taxonómica en el Laboratorio de Farmacología Marina del Instituto de Ciencias del Mar y Limnología y para fácil manejo de los datos de la esponja se asigna una clave con letra ( indica el lugar de donde proviene la esponja) y un número ( para diferenciar una de otra).

## 2) Extractos Crudos de las Esponjas

Las sustancias solubles obtenidas en la lixiviación de la esponja -- descongelada con un solvente determinado será el extracto crudo de la esponja.

La lixiviación consiste en tratar una sustancia compleja, con el disolvente adecuado ( alcohol, éter, etc.) para obtener la parte soluble de ellas. Para elegir el solvente a usar en la lixiviación, se -



hicieron extractos preliminares con solvente de diferente polaridad: agua destilada, metanol, etanol, acetona y una mezcla de metanol-etanol con cada una de las esponjas. A estos extractos se les hicieron pruebas de antibiosis, utilizando a Staphylococcus aureus y Shigella flexneri como los microorganismos de prueba.

Con los datos anteriores se eligió al metanol como el solvente a usar en la lixiviación, por ser el que mejores resultados reportó.

El proceso de lixiviación se realiza de la siguiente manera:

Se pesa un vaso de precipitados y se colocan aproximadamente 150 ml. de esponja descongelada y se pesa para obtener su peso húmedo, se coloca el vaso en la estufa a una temperatura de 40°C durante 48 horas; transcurrido este tiempo se pesan los vasos para obtener el peso seco. Se añade el solvente (metanol) hasta tapar la esponja y se deja en reposo 48 horas, después de este lapso se vacía el solvente en otro vaso de precipitado y se le vuelve a agregar nuevo solvente a la esponja. Esta operación se realiza cuantas veces sea necesario para obtener un volumen total de 500 ml. los cuales se concentran evaporando el solvente con ayuda de luz infrarroja hasta un volumen de 100 ml. el cual se representará el extracto crudo de cada una de las esponjas tratadas.

### 3) Determinación de la Antibiosis In Vitro

El método de desarrollo empleado, está basado en el de Kirby y Bauer (20) comúnmente utilizado para pruebas de antibiosis y que consiste en los siguiente:

a) Preparación del inóculo: Se inoculan las diferentes bacterias en caldo nutritivo y se incuban a 37°C durante 24 horas. Las levaduras y hongos se siembran en tubos con Sabouraud inclinado y se incuban a 28°C durante una semana.

b) Preparación de las placas: Se preparan las cajas Petri con los medios de Agar Nutritivo y Hinton Mueller que se utilizan puesto que permiten un buen crecimiento de los microorganismos aerobios y facultativos de crecimiento rápido, que se encuentran más usualmente y el Sabouraud que se utiliza para las levaduras y hongos. Para bacterias y levaduras se vierten aproximadamente 20 ml de medio en cada una de las cajas Petri de 95 X 15 mm con una profundidad de 5 a 6 mm las placas se secan durante 30 minutos previamente a la inoculación, por que la humedad sobre la superficie del medio debe ser evitada y puede ser completamente eliminada si al verter el medio dentro de las placas la temperatura del mismo no sobrepasa los 50°C. Para eliminar las gotas de humedad que estén presentes, se incuban las placas a 35-37°C durante 30 minutos o a la temperatura ambiente durante 1 hora y se pueden emplear dentro de los 4 días siguientes a su preparación, conservadas en refrigeración (2-8°C)

c) Preparación de los discos: Los sensidiscos se obtuvieron de papel-filtro Whatman # 42 con un diámetro de 5.5. mm se esterilizan en el autoclave a 121°C, 15 lb de presión durante 15 minutos.

En los discos de papel filtro se concentraron 3,5,10 y 15 gotas de cada uno de los extractos crudos de las esponjas y se dejaron secar con ayuda de luz infrarroja evitando el sobrecalentamiento.

d) Inoculación de las placas: La suspensión del caldo bacteriano se -

siembra sobre la superficie del medio en estría cerrada en 3 direcciones, empleando un hisopo estéril. Las levaduras también se siembran en la misma forma con la ayuda del asa de platino.

Después que se haya secado el inóculo (3 a 5 minutos), se colocan los discos sobre la superficie del medio, separados a una distancia tal que en caso de haber inhibición, ésta fuera percibida claramente y no se presente sobreposición de los halos. Se usa un testigo que contiene el mismo número de gotas, pero el solvente (metanol), las cuales se dejan evaporar. Al poner los discos que presiona ligeramente para asegurar el contacto, si fuese necesario, usando pinzas estériles, previamente flameadas y enfriadas para cada disco. Se refrigeran las cajas durante 4 horas para obtener una máxima difusión del antibiótico, posteriormente se incuban 24 horas a 37°C las bacterias y a 28°C las levaduras.

Para los hongos: Una vez preparado el medio de Sabouraud, se esteriliza y se deja enfriar hasta una temperatura de 45°C antes de inocularlo, para no matar las esporas. Mientras se esteriliza el medio se hace una suspensión de esporas con solución salina, con una pipeta estéril se toma 0.1 ml de la suspensión de esporas y se pone en cajas Petri, posteriormente se añade el medio de Sabouraud, se homogeniza y se deja solidificar. Al igual que con las bacterias y levaduras, se ponen los discos, se refrigeran las cajas durante 4 horas y se incuban a 28°C durante una semana aproximadamente, realizando observaciones cada 16 horas.

e) Lectura de los resultados: Se mide el diámetro de la zona de inhibición en milímetros, lo más exactamente posible y por la base de la caja.

### Interpretación de los halos:

La presencia de un halo de inhibición alrededor del disco con la menor concentración, indica que el microorganismo es muy sensible a la droga.

La presencia de halos de inhibición alrededor de los discos de concentración media y alta, y la ausencia de halo alrededor de los de menor concentración, indica que el microorganismo es sensible o moderadamente sensible a la droga.

La ausencia de halos de inhibición alrededor de todas las concentraciones o la presencia de un halo sólo alrededor del disco de concentración alta, indica que el microorganismo es ligeramente sensible o resistente a la droga.

La presencia o ausencia de un halo, o zona de inhibición, y no el diámetro ó área del halo, es la que indica la sensibilidad del microorganismo a la droga.

### f) Posibles errores y limitaciones de la prueba:

El tamaño del halo de inhibición varía inversamente al tamaño del inóculo ( inóculos más densos producen zonas o halos más pequeños e inóculos poco densos, halos mayores).

Las variaciones pueden ser lo suficientemente grandes como para cambiar la clasificación de sensibilidad del microorganismo, si sólo se desarrollan colonias aisladas en la placa de prueba, el inóculo era poco denso y la prueba debe ser repetida.

1.- Esponja Haliclona sp. (Z-29) proveniente de la Bahía Zihuatanejo - Guerrero:

CUADRO I

Microorganismos Gram positivos	Medios de Cultivo	Medida de los halos de inhibición (cm)- a una concentración dada de extracto -- crudo de esponja:			
		3 gotas	5 gotas	10 gotas	15 gotas.
<u>Staphylococcus</u>	AN	3.0	3.0	3.1	3.6
<u>aureus</u>	HM	2.6	3.2	3.5	4.2
<u>Micrococcus</u>	AN	4.3	4.3	4.4	4.6
<u>luteus</u>	HM	4.0	4.4	4.6	5.0
<u>Streptococcus</u>	AN	-	-	-	-
<u>faecalis</u>	HM	-	-	-	-
<u>Bacillus</u>	AN	1.5	1.6	2.0	2.4
<u>subtilis</u>	HM	1.0	1.3	2.1	2.7
<u>Bacillus</u>	AN	1.5	1.6	1.9	2.2
<u>cereus</u>	HM	1.0	1.1	2.0	3.0

AN= Agar nutritivo

HM= Hinton Mueller

El número de pruebas corridas con cada concentración fueron dos, dando un total de ocho por microorganismo en cada uno de los medios de cultivo utilizados.

La inhibición está medida en centímetros de diámetro, tomando en cuenta que el diámetro de los discos es de (0.6) seis milímetros.

Microorganismos Gram negativos	Medios de cultivos	Medida de los halos de inhibición - (cm) a una concentración dada de - extracto crudo de esponja:			
		3 gotas	5 gotas	10 gotas	15 gotas
<u>Escherichia</u>	AN	-	-	-	-
<u>coli</u>	HM	-	-	-	-
<u>Shigella</u>	AN	-	-	-	-
<u>flexneri</u>	HM	-	-	-	-
<u>Salmonella</u>	AN	-	-	-	-
<u>typhi</u>	HM	-	-	-	-
<u>Klebsiella</u>	AN	-	-	-	-
<u>pneumoniae</u>	HM	-	-	-	-
<u>Enterobacter sp.</u>	AN	-	-	-	-
	HM	-	-	-	-
<u>Enterobacter</u>	AN	-	-	-	-
<u>hafniae</u>	HN	-	-	-	-
<u>Serratia</u>	AN	-	-	0.9	1.2
<u>marcescens</u>	HM	-	-	-	0.7
<u>Proteus sp.</u>	AN	-	-	-	-
	HM	-	-	-	-
<u>Pseudomonas</u>	AN	-	-	0.9	1.7
<u>aeruginosa</u>	HM	-	0.9	1.2	1.3
<u>Brucella</u>	AN	-	-	-	-
<u>abortus</u>	HM	-	-	-	-

Levaduras y Hongos

Medidas de los halos de inhibición  
(cm) a una concentración dada de -  
extracto crudo de esponja:

3 gotas    5 gotas    10 gotas    15 gotas

	3 gotas	5 gotas	10 gotas	15 gotas
<u>Rhodotorula sp.</u>	2.2	2.3	2.5	2.8
<u>Saccharomyces sp.</u>	-	-	0.7	0.9
<u>Sacch. cerevisiae</u>	-	-	-	-
<u>Sacch. fructum</u>	-	-	-	-
<u>Sacch. uvarum</u>	1.0	1.0	1.5	1.5
<u>Sacch. boyanus</u>	1.0	1.3	1.8	2.2
<u>Sacch. cidri</u>	-	-	-	-
<u>Candida albicans</u>	-	-	-	-
<u>Candida parapsilosis</u>	-	-	-	-
<u>Candida tropicalis</u>	-	-	-	-
<u>Aspergillus niger</u>	1.8	2.1	2.1	2.7
<u>Aspergillus soyae</u>	1.3	1.6	1.6	1.6
<u>Aspergillus sp.</u>	2.3	2.5	2.0	2.7
<u>Penicillium sp.</u>	-	-	-	-
<u>Rhizopus sp.</u>	-	-	-	-

2.- Esponja Ianthella ardis ( V-I-25) proveniente del Arrecife -  
" La Blanquilla" , Veracruz.

C U A D R O IV

Microorganismos Gram positivos	Medios de	Medida de los halos de inhibición - (cm) a una concentración dada de ex tracto crudo de esponja:			
		3 gotas	5 gotas	10 gotas	15 gotas
<u>Staphylococcus</u>	AN	2.0	2.4	2.8	3.2
<u>aureus</u>	HM	2.3	2.9	3.1	3.2
<u>Micrococcus</u>	AN	0.7	2.3	2.4	2.4
<u>luteus</u>	HM	1.3	1.6	1.6	2.6
<u>Streptococcus</u>	AN	1.5	1.5	2.0	2.3
<u>faecalis</u>	HM*	1.5	1.6	2.1	2.3
<u>Bacillus</u>	AN	1.5	2.2	2.9	3.0
<u>subtilis</u>	HM	1.3	2.5	2.8	3.0
<u>Bacillus</u>	AN	2.3	2.7	2.8	3.0
<u>cereus</u>	HM	1.8	2.3	2.8	3.0

\* Esponjas que presentaron doble halo de inhibición.



## CUADRO V

Microorganismos Gram negativos	Medios de cultivo	Medidad de los halos de inhibición - (cm) a una concentración dada de ex- tracto crudo de esponja:			
		3 gotas	5 gotas	10 gotas	15 gotas
<u>Escherichia</u>	AN	1.7	2.0	2.6	2.7
<u>Coli</u>	HM	1.2	1.5	1.8	2.0
<u>Shigella</u>	AN	1.5	1.9	2.2	2.5
<u>flexneri</u>	HM	2.4	2.7	3.0	3.2
<u>Salmonella</u>	AN	2.5	3.0	3.2	3.4
<u>typhi</u>	HM	2.3	2.7	2.9	2.9
<u>Klebsiella</u>	AN*	1.9	2.2	2.3	2.5
<u>pneumoniae</u>	HM*	1.9	2.3	2.4	2.5
<u>Enterobacter sp.</u>	AN*	1.5	1.8	2.3	2.4
	HM*	2.1	2.3	2.7	2.9
<u>Enterobacter</u>	AN	-	0.7	0.9	1.1
<u>Hafniae</u>	HM*	1.6	2.0	2.3	2.4
<u>Serratia</u>	AN	2.3	2.5	2.7	3.0
<u>marcescens</u>	HM	2.3	2.3	2.4	2.6
<u>Proteus sp.</u>	AN*	2.3	2.5	2.7	2.8
	HM	2.4	2.7	2.8	3.2
<u>Pseudomonas</u>	AN	-	-	0.8	1.1
<u>aeruginosa</u>	HM	-	0.9	1.0	1.1
<u>Brucella</u>	AN	1.3	1.5	1.6	1.6
<u>abortus</u>	HM	1.2	1.4	1.7	1.7

\* Doble halo de inhibición

Medida de los halos de inhibición-  
(cm) a una concentración dada de -  
extracto crudo de esponja:

Levaduras y Hongos	3 gotas	5 gotas	10 gotas	15 gotas
<u>Rhodotorula sp.</u>	-	-	1.0	1.4
<u>Saccharomyces sp.</u>	-	-	1.0	1.3
<u>Saccharomyces cerevisiae</u>	-	-	-	-
<u>Saccharomyces fructum</u>	-	-	-	-
<u>Saccharomyces uvarum</u>	-	-	-	-
<u>Saccharomyces boyanus</u>	-	-	-	-
<u>Saccharomyces cidri</u>	-	-	-	-
<u>Candida albicans</u>	-	-	-	-
<u>Candida parapsilosis</u>	-	-	-	-
<u>Candida tropicalis</u>	-	-	-	-
<u>Aspergillus niger</u>	-	-	-	-
<u>Aspergillus soyae</u>	-	-	-	-
<u>Aspergillus sp.</u>	-	-	-	-
<u>Penicillium sp.</u>	-	-	-	-
<u>Rhizopus sp.</u>	-	-	-	-

3.- Esponja Haliclona rubens (V-I-27) proveniente del Arrecife " La Blanquilla ", Veracruz: (72)

C U A D R O VII

Microorganismos Gram positivos	Medios de cultivo	Medida de los halos de inhibición - (cm) a una concentración dada de -- extracto crudo de esponja:			
		3 gotas	5 gotas	10 gotas	15 gotas
<u>Staphylococcus</u>	AN	1.3	1.4	1.9	2.0
<u>aureus</u>	HM	0.8	1.0	1.0	1.1
<u>Micrococcus</u>	AN	1.2	1.2	1.4	1.7
<u>luteus</u>	HM	1.0	1.1	1.2	1.2
<u>Streptococcus</u>	AN	-	-	0.8	0.9
<u>faecalis</u>	HM	-	0.8	1.0	1.1
<u>Bacillus</u>	AN	0.9	1.1	1.4	1.5
<u>subtilis</u>	HM	1.2	1.4	1.9	2.1
<u>Bacillus</u>	AN	0.8	0.9	1.0	1.1
<u>cereus</u>	HM	1.0	1.1	1.3	1.3



Levaduras y Hongos	Medida de los halos de inhibición - (cm) a una concentración dada de ex tracto crudo de esponja:			
	3 gotas	5 gotas	10 gotas	15 gotas
<u>Rhodotorula sp.</u>	0.8	0.9	1.0	1.1
<u>Saccharomyces sp.</u>	-	-	-	-
<u>Sacch. cerevisiae</u>	-	-	-	-
<u>Sacch. fructum</u>	-	-	-	-
<u>Sacch. uvarum</u>	-	-	-	-
<u>Sacch. boyanus</u>	-	-	-	-
<u>Sacch. cidri</u>	0.65	0.7	0.9	1.1
<u>Candida albicans</u>	-	-	-	-
<u>Candida parapsilosis</u>	-	-	-	-
<u>Candida tropicalis</u>	-	-	-	-
<u>Aspergillus niger</u>	-	-	-	-
<u>Aspergillus soyae</u>	-	-	-	-
<u>Aspergillus sp.</u>	1.0	1.2	1.1	1.4
<u>Penicillium sp.</u>	-	-	-	-
<u>Rhizopus sp.</u>	-	-	-	-

4.- Esponja Verongia fistularis (V-I-31) proveniente del Arrecife -  
" La Blanquilla ", Veracruz:

CUADRO X

Microorganismos Gram positivos	Medios de Cultivo	Medida de los halos de inhibición - (cm) a una concentración dada de ex tracto crudo de esponja:			
		3 gotas	5 gotas	10 gotas	15 gotas
<u>Staphylococcus</u> <u>aureus</u>	AN	-	-	1.6	1.8
	HM	-	-	1.1	1.3
<u>Micrococcus</u> <u>luteus</u>	AN	0.9	1.1	1.8	2.1
	HM	-	-	1.0	1.2
<u>Streptococcus</u> <u>faecalis</u>	AN	1.0	1.2	1.4	1.8
	HM	0.65	0.7	0.8	0.8
<u>Bacillus</u> <u>subtilis</u>	AN	1.5	1.8	2.3	2.9
	HM	1.3	1.8	2.0	2.5
<u>Bacillus</u> <u>cereus</u>	AN	1.1	1.4	1.7	2.0
	HM*	1.4	1.5	1.8	1.8

\* Doble halo de inhibición.

## CUADRO XI

Microorganismos Gram negativos	Medios de Cultivo	Medida de los halos de inhibición - (cm) a una concentración dada de ex tracto crudo de esponja:			
		3 gotas	5 gotas	10 gotas	15 gotas
<u>Escherichia coli</u>	AN	1.8	2.1	2.2	2.5
	HM	0.9	1.0	1.1	1.3
<u>Shigella flexneri</u>	AN*	1.0	1.3	1.6	2.4
	HM	-	0.6	0.8	0.9
<u>Salmonella typhi</u>	AN	1.0	1.8	2.0	2.2
	HM	-	-	-	-
<u>Klebsiella pneumoniae</u>	AN	1.0	1.2	1.5	1.7
	HM	-	1.0	1.2	1.5
<u>Enterobacter sp.</u>	AN	-	-	-	0.9
	HM	-	-	0.8	0.9
<u>Enterobacter hafniae</u>	AN	-	-	1.0	1.2
	HM	-	-	-	1.0
<u>Serratia marcescens</u>	AN	1.0	1.3	1.5	1.9
	HM	0.8	0.8	0.9	1.0
<u>Proteus sp.</u>	AN	1.2	1.8	2.2	2.5
	HM	-	-	-	-
<u>Pseudomonas aeruginosa</u>	AN	-	-	-	-
	HM	-	-	-	-
<u>Brucella abortus</u>	AN	1.3	1.5	1.7	2.1
	HM	0.9	0.9	1.0	1.7

## CUADRO XII

Levaduras y Hongos

Medida de los halos de inhibición (cm)  
a una concentración dada de extracto -  
crudo de esponja

3 gotas    5 gotas    10 gotas    15 gotas

---

<u>Rhodotorula sp.</u>	-	-	-	2.0
<u>Saccharomyces sp.</u>	-	-	-	-
<u>Sacch. cerevisiae</u>	-	-	-	-
<u>Sacch. fructum</u>	-	-	-	-
<u>Sacch. uvarum</u>	-	-	-	-
<u>Sacch. boyanus</u>	-	-	-	-
<u>Sacch. cidri</u>	-	-	-	-
<u>Candida albicans</u>	-	-	-	-
<u>Candida parapsilosis</u>	-	-	-	-
<u>Candida tropicalis</u>	-	-	-	-
<u>Aspergillus niger</u>	-	-	-	-
<u>Aspergillus soyae</u>	-	-	-	-
<u>Aspergillus sp.</u>	-	-	-	-
<u>Penicillium sp.</u>	-	-	-	-
<u>Rhizopus sp.</u>	-	-	-	-

---



Microorganismos	Número de esponjas que presentan actividad contra uno de los microorganismos , según el medio de cultivo utilizado:	
	Agar nutritivo	Hinton Mueller
<u>Staphylococcus aureus</u>	4	4
<u>Micrococcus luteus</u>	4	4
<u>Streptococcus faecalis</u>	3	3
<u>Bacillus subtilis</u>	4	4
<u>Bacillus cereus</u>	4	4
Microorganismos Gram negativos		
<u>Escherichia coli</u>	3	3
<u>Shigella flexneri</u>	3	3
<u>Salmonella typhi</u>	2	1
<u>Klebsiella pneumoniae</u>	3	3
<u>Enterobacter sp.</u>	2	3
<u>Enterobacter hafniae</u>	3	3
<u>Serratia marcescens</u>	4	4
<u>Proteus sp.</u>	2	1
<u>Pseudomonas aeruginosa</u>	2	3
<u>Brucella abortus</u>	2	2

CUADRO XIII  
(Continuación)

(79)

Levaduras y Hongos	Número de esponjas que presentan - actividad contra cada uno de los- microorganismos: Saboraud
<u>Rhodotorula sp.</u>	4
<u>Saccharomyces sp.</u>	2
<u>Saccharomyces cerevisiae</u>	0
<u>Saccharomyces fructum</u>	0
<u>Saccharomyces uvarum</u>	1
<u>Saccharomyces boyanus</u>	1
<u>Saccharomyces cidri</u>	1
<u>Candida albicans</u>	0
<u>Candida parapsilosis</u>	0
<u>Candida tropicalis</u>	0
<u>Aspergillus niger</u>	1
<u>Aspergillus soyae</u>	1
<u>Aspergillus sp.</u>	2
<u>Penicilium sp.</u>	0
<u>Rhizopus sp.</u>	0

Tomando el tamaño del diámetro de inhibición ( en 15 gotas ) con referencia a la actividad antimicrobiana de la esponja, se tiene:

Poca actividad (+) = 1.0 cm.  
 Actividad (++) = 1.1 a 3.0 cm.  
 Mucha actividad (+++) = 3.1 cm.

Microorganismos	Medios de cultivo	Medios de cultivo			
		Z-29	V-I-25	V-I-27	V-I-31
<u>Staphylococcus aureus</u>	AN	+++	+++	++	++
	HM	+++	+++	++	++
<u>Micrococcus luteus</u>	AN	+++	++	++	++
	HM	+++	++	++	++
<u>Streptococcus faecalis</u>	AN	-	++	+	++
	HM	-	++	++	+
<u>Bacillus subtilis</u>	AN	++	+++	++	++
	HM	++	+++	++	++
<u>Bacillus cereus</u>	AN	++	+++	++	++
	HM	+++	+++	++	++
<hr/>					
Microorganismos Gram negativos					
<u>Escherichia coli</u>	AN	-	++	+	++
	HM	-	++	++	++
<u>Shigella flexneri</u>	AN	-	++	+	++
	HM	-	+++	++	+

CUADRO XIV  
(Continuación)

(81)

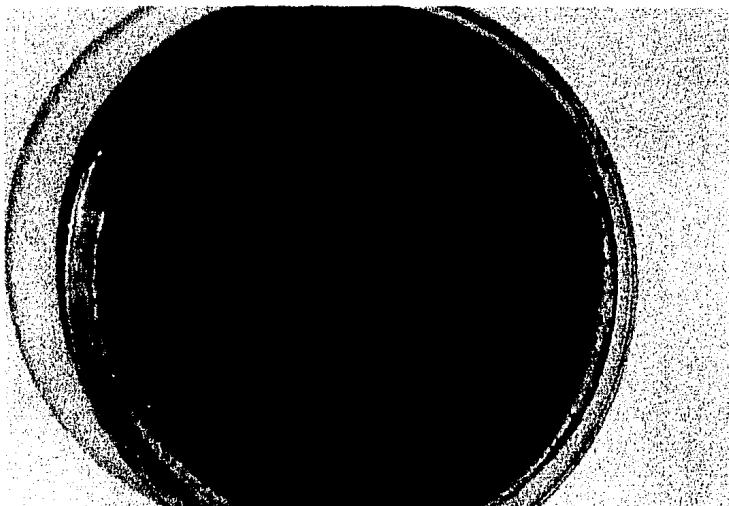
Microorganismos	Medios de cultivo	Z-29	V-I-25	V-I-27	V-I-31
<u>Salmonella typhi</u>	AN	-	+++	-	++
	HM	-	++	-	-
<u>Klebsiella pneumoniae</u>	AN	-	++	+	++
	HM	-	++	+	++
<u>Enterobacter sp.</u>	AN	-	++	-	+
	HM	-	++	+	+
<u>Enterobacter hafniae</u>	AN	-	++	+	++
	HM	-	++	+	+
<u>Serratia marcescens</u>	AN	++	+++	+	++
	HM	+	++	++	+
<u>Proteus sp.</u>	AN	-	++	-	++
	HM	-	+++	-	-
<u>Pseudomonas aeruginosa</u>	AN	++	++	-	-
	HM	++	++	++	-
<u>Brucella abortus</u>	AN	-	++	-	++
	HM	-	++	-	++
<hr/>					
Levaduras y Hongos					
<u>Rhodotorula sp.</u>		++	++	-	-
<u>Saccharomyces sp.</u>		+	++	-	-
<u>Saccharomyces cerevisiae</u>		-	-	-	-

C U A D R O XIV  
(Continuación)

(82)

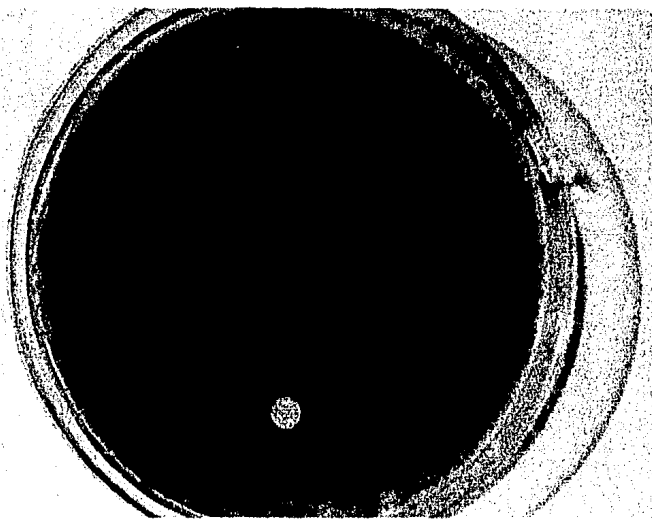
Levaduras y Hongos	Z-29	V-I-25	V-I-27	V-I-31
<u>Saccharomyces fructum</u>	-	-	-	-
<u>Saccharomyces uvarum</u>	++	-	-	-
<u>Saccharomyces boyanus</u>	++	-	-	-
<u>Saccharomyces cidri</u>	-	-	++	-
<u>Candida albicans</u>	-	-	-	-
<u>Candida parapsilosis</u>	-	-	-	-
<u>Candida tropicalis</u>	-	-	-	-
<u>Aspergillus niger</u>	++	-	-	-
<u>Aspergillus soyae</u>	++	-	-	-
<u>Aspergillus sp.</u>	++	-	++	-
<u>Penicillium sp.</u>	-	-	-	-
<u>Rhizopus sp.</u>	-	-	-	-

Inhibición presentada por la esponja Haliclona sp. (Z-29):



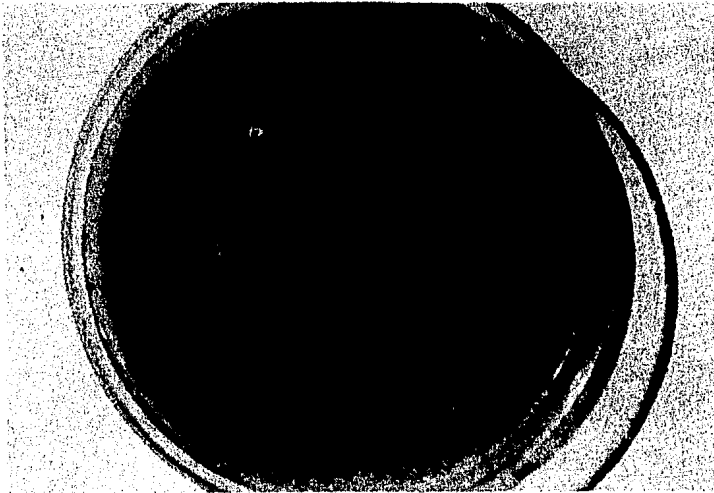
Micrococcus luteus en Agar Nutritivo

Sensidiscos con 3 y 5 gotas del extracto crudo de la esponja



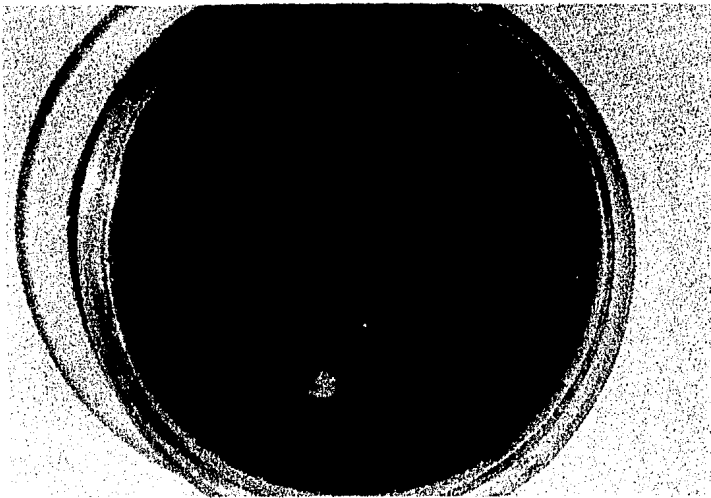
Micrococcus luteus en Hinton Mueller

Sensidiscos con 3 y 10 gotas de extracto crudo de la esponja



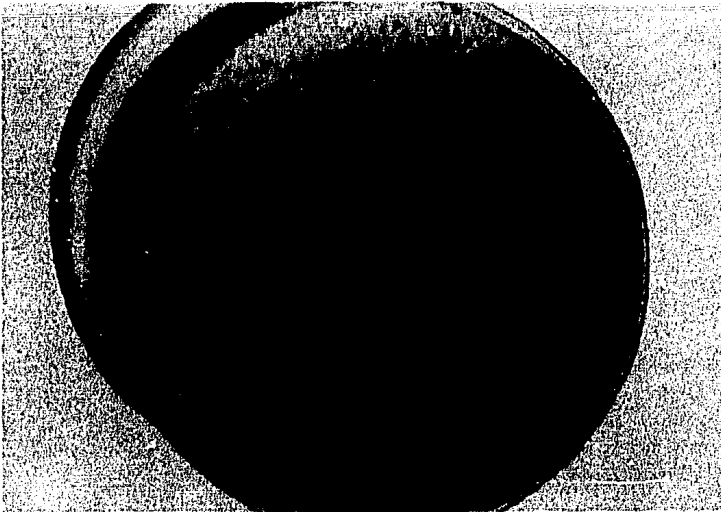
Bacillus cereus en Agar Nutritivo

Sensidiscos con 3,5,10 y 15 gotas del extracto crudo de la esponja



Staphylococcus aureus en Agar Nutritivo

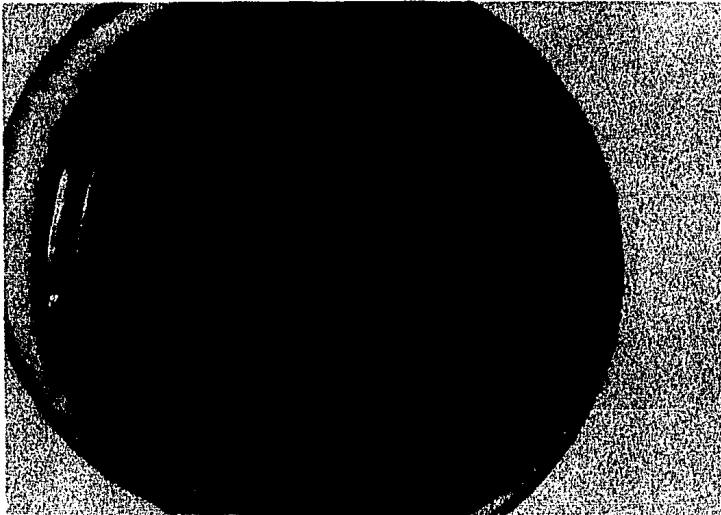
Sensidiscos con 5 y 10 gotas del extracto crudo de la esponja



Aspergillus sp. en Sabouraud

Sensidiscos con 3,5,10 y 15 gotas del extracto crudo de la esponja

Inhibición presentada por la esponja *Lanthella ardis* (V-I-25):

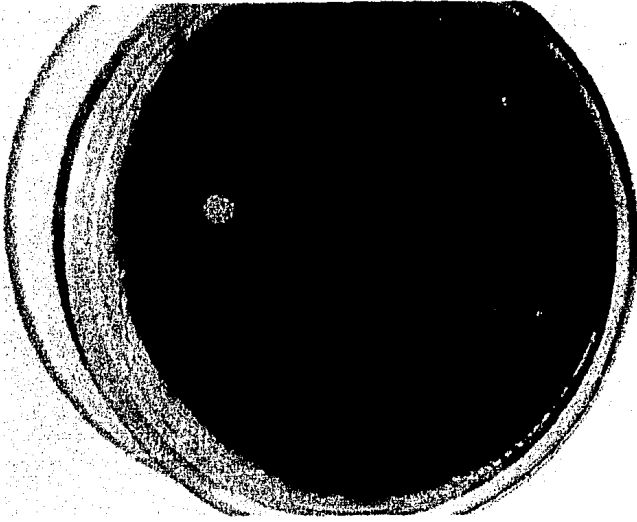


Escherichia coli en Agar Nutritivo

Sensidiscos con 10 y 15 gotas del extracto crudo de la esponja

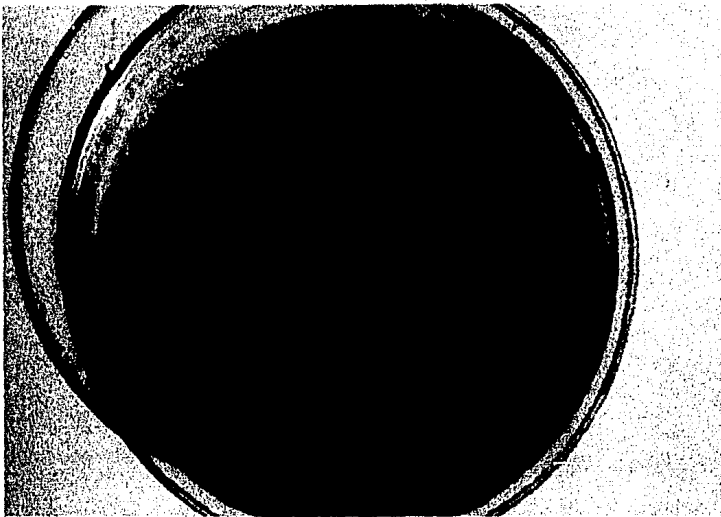


Inhibición presentada por la esponja Verongia fistularis (7-1-31):



Serratia marcescens en Agar Nutritivo

Sensidiscos con 10 y 15 gotas del extracto crudo de la esponja



Rhodotorula sp. en Sabouraud

Sensidiscos con 10 y 15 gotas del extracto crudo de la esponja

## D I S C U S I O N

Se ha propuesto que la existencia de sustancias antibióticas en esponjas marinas, es un mecanismo ofensivo de ayuda en la nutrición ( inactivando microorganismos antes de ser ingeridos ), así como un mecanismo defensivo, en el control de infecciones microbianas.

La actividad antimicrobiana observada en referencia a la cantidad de gotas del extracto crudo de las esponjas depositadas en los discos -- fué en todos los casos directamente proporcional, es decir, a mayor número de gotas mayor inhibición.

De las cuatro esponjas con que se trabajó, sólo una, la V-I-25 ( Ianthella ardis) mostró actividad antibiótica frente a todos los microorganismos tanto Gram positivos como Gram negativos y esta actividad antibiótica, en la mayoría de los casos, fué bastante fuerte por lo que se puede decir que estos microorganismos ensayados son sensibles al extracto crudo de esta esponja con una sola excepción, ya que -- Pseudomonas aeruginosa sólo es moderadamente sensible al extracto de esta esponja ( Cuadro V ).

Tanto en el cuadro IV como en el cuadro V, el asterisco (\*) nos indica que cinco microorganismos ( Uno Gram positivo: Streptococcus faecalis y cuatro Gram negativos: Klebsiella pneumoniae, Enterobacter sp., Enterobacter hafniae y Proteus sp.) presentaron un doble halo -- de inhibición, que probablemente nos indique que el extracto de esta esponja contenga dos sustancias con diferente actividad antibiótica y diferente poder de difusión para el mismo microorganismo, donde el halo interior, probablemente sea el de la sustancia con actividad antibiótica frente a la cual el microorganismo es menos sensible; -- ( los datos reportados en los cuadros, en este caso, pertenecen al diámetro del halo de inhibición exterior).

Con respecto a los hongos y levaduras se observó muy poca actividad antibiótica, pues sólo frente a dos levaduras: Rhodotorula sp. y Saccharomyces sp. hubo inhibición ( Cuadro VI ).

Las esponjas V-I-31 ( Verongia fistularis) y V-I-27 ( Haliclona rubens) mostraron actividad antibiótica sobre microorganismos Gram positivos y Gram negativos pero en menor número de géneros de bacilos-Gram negativos. En el caso de Verongia fistularis no tuvo actividad sobre Pseudomonas aeruginosa y poca frente a Enterobacter sp. y Enterobacter hafniae ( Cuadro XI ). Bacillus cereus y Shigella flexneri con el extracto crudo de esta esponja también desarrollaron un doble halo de inhibición. Haliclona rubens no mostró actividad antibiótica frente a Salmonella typhi, Proteus sp. y Brucella abortus y frente a los demás microorganismos Gram negativos en realidad fué poca la inhibición observada en esta esponja.

Frente a hongos y levaduras Verongia fistularis sólo mostró actividad frente a Rhodotorula sp.; en cambio Haliclona rubens tuvo inhibición frente a dos levaduras; Rhodotorula sp. y Saccharomyces cidri y un hongo: Aspergillus sp. ( Cuadro XII y IX ).

Un caso interesante lo muestra el extracto de la esponja Z-29 ( Haliclona sp.) ya que su actividad antimicrobiana es preferentemente sobre los microorganismos Gram positivos aunque no hubo actividad frente a Streptococcus faecalis, además de que los halos de inhibición fueron los de mayor tamaño ( Cuadro I ). De los microorganismos Gram negativos sólo actuó frente a Serratia mercescens y Pseudomonas aeruginosa ( Cuadro II ). De su acción sobre hongos y levaduras sólo esta esponja tuvo verdadera significación ya que su actividad se manifestó sobre tres especies del género Saccharomyces ( Saccharomy-

ces sp., Saccharomyces uvarum y Saccharomyces boyanus): sobre Rhodotorula sp., y sobre las tres especies del género Aspergillus (Aspergillus niger, Aspergillus soyae y Aspergillus sp.)(Cuadro III ).

De acuerdo a los resultados obtenidos en las pruebas preliminares hechas con agua, metanol, acetona y metanol-etanol podemos darnos cuenta de que las sustancias antibióticas, son de naturaleza polar, ya que son fácilmente extraídas por los disolventes antes mencionados. Además, una esponja puede producir dos o más antibióticos con diferente afinidad por los solventes. Respecto a esto, Sharma G.M., Vig-B. y Bukholder P.R. en 1968 (46), hacen una división de las sustancias antimicrobianas de acuerdo a su extractabilidad en solventes orgánicos como sigue:

- 1) Sustancias antimicrobianas que son extraídas con metanol, también como solventes no miscibles en agua, tales como etil acetato, éter , cloroformo , etc.
- 2) Sustancias activas que son extraídas con metanol, pero que no pueden ser con solventes no miscibles en agua.
- 3) La actividad es extraída solo parcialmente en metanol.
- 4) Las sustancias antimicrobianas con actividad, sólo pueden extraerse parcialmente con el metanol.

De los resultados obtenidos en el presente trabajo, se concluye que:

- (1) La naturaleza de las sustancias antibióticas en los cuatro géneros de esponjas es polar, ya que presentan afinidad por los disolventes polares.
- (2) Las sustancias antibióticas de estas esponjas se conservan estables en refrigeración, al menos durante 3 meses.
- (3) Los cuatro géneros de esponjas que se estudiaron, presentaron actividad antibiótica contra microorganismos Gram positivos y Gram negativos.
- (4) Las cuatro esponjas presentaron actividad frente a la levadura: Rhodotorula sp.
- (5) La esponja Ianthella ardis fué la única que mostró actividad antibiótica contra todos los microorganismos Gram positivos y Gram negativos del panel experimental.
- (6) La esponja Haliclona sp. mostró una actividad antibiótica selectiva contra los microorganismos Gram positivos y fué la única que mostró una actividad significativa frente a hongos y levaduras ( frente a Rhodotorula sp., tres especies de Saccharomyces y tres especies de Aspergillus).
- (7) Las esponjas Ianthella ardis y Verongia fistularis mostraron dobles halos de inhibición por lo que es de suponerse que contienen dos sustancias con actividad antibiótica pero con diferente poder de difusión.

Día a día los investigadores en todo el mundo reportan la aparición de nuevas cepas de microorganismos que han logrado desarrollar resistencia a la acción de los antibióticos comerciales que existen en el mercado actual.

Este hecho es significativo de la importancia que tiene el continuar y fomentar trabajos de investigación para la búsqueda de nuevas sustancias antibióticas.

Es evidente que con los grandes recursos marinos con que cuenta México, la investigación se amplíe a más géneros de esponjas, así como a determinar la naturaleza química de las sustancias antibióticas que se detecten, realizando los bioensayos necesarios para descubrir su utilidad potencial en los aspectos comercial, y ante todo clínico.

- (1) Aharonowitz Yair and Cohen Gerald.- 1981 " The Microbiological - Production of Pharmaceuticals".- Scientific American, Vol. 245 - Núm. 3.- p.p. 140-152.
- (2) Alexopoulos Constantine John.- 1977 " Introducción a la Micología" .- Ed. Universitaria de Buenos Aires, Argentina.- p.p. 417-250.
- (3) Andersen Raymond J. and Faulkner D. John.- 1973.- " A Novel Antibiotic from a Sponge of the Genus Verongia " Tetrahedron Letters No. 14.- p.p. 1175-1178.
- (4) Avery O.T., MacLeod and McCarty M.- 1944.- " Studies on the - Chemical Nature of the Substance Inducing Transformation of Pneumococcal Types. Introduction of Transformation by a Deoxyribonucleic Acid Fraction Isolated from Pneumococcus types III",- J. - Exp. Med. 79: 137-158.
- (5) Baer J.G., et, al.- 1970.- " Enfermedades Infecciosas y sus -- Agentes Patógenos".- J.R. Geigy S.A., Basilea ( Suiza).- p.p. - 139.
- (6) Bailey W.R.. and Scott E.G..- 1973.- " Diagnóstico Microbiológico".- Editorial Médica Panamericana S.A.,- Buenos Aires, Argentina.
- (7) Barnes Robert D..- 1977.- " Zoología de los Invertebrados".- Nueva Editorial Interamericana , S.A. de C.V., México D.F.- Tercera Edición.- p.p. 69-81 .

- (8) Bayard, H.Mc. Connaughey.- 1974.- " Introducción a la Biología - Marina".- Editorial Acriba; Zaragoza España.- p.p. 206-207.
- (9) Bergoglio Remo M.- 1977.- " Antibióticos ".- Ed. Médica Panamericana.- Tercera Edición.- Buenos Aires, Argentina.- p.p. 17, 18 , y 19.
- (10) Bhatia, Rajesh; Vaze S.; Agarwal, D.S.- 1981.- " Transferable-Multiple Drug Resistance in Salmonella typhimurium ".-( Dep. - Microbiol., Maulana Azad Med. Coll., New Delhi, 110002 India).- Indian J. Med. Res. 74 (Nov).- p.p. 642-7
- (11) Bodcy G.P., Fainsteen V. and Hinkle A.M.- 1981.- " Comparative In Vitro Study of New Cephalosporin" .- AAC.- Vol. 2 No. 2 p.p. 226-230.
- (12) Brock Thomas D.- 1979.- " Biology of Microorganisms" 3rd. edition.- Prentice- Hall. Inc., Englewool Cliffs New Jersey.
- (13) Broen R.E., Stancato F.A. and Wolfe A.D.- 1981.- " Preferential Inhibition of Ribonucleic Acid Synthesis by a New Thiosemi - carbazone Possessing Antibacterial and Antiparasitic Properties" AAC.- Vol. 19, No. 2.- p.p. 234-237.
- (14) Bryan A.H., Bryan CH.A. y Bryan CH.G.- 1976.- " Bacteriología - Compañía Editorial Continental S.A.- 3a. impresión.- México - D.F.



- (15) Bryant M.C..- 1976.- " Antibióticos y su Control Mediante le La boratorio" .- Editorial El Manual Moderno, S.A.- México D.F..- p.p. 9
- (16) Buchanan R.E. & Gibbons N.E..- 1974.- " Bergey's Manuel of De- terminative Bacteriology ".- The Williams & Wilkins Company.- - 8th Edition.- Baltimore, U.S.A.
- (17) Carlone N.A. Marca G., Cattaneo O., Belluco G., Cuffini A.M..- 1980.- " Observations on the Mechanism of Bacterial Resistance- to an Amoxixillin- Fosfomycinmixture ".- Inst. Microbiol., Univ. Torino, Turin, Italy).- Ann Microbiol. Enzimol. 30: 51 -7.
- (18) Consulich D.B. and Lovell F.M..- 1971.- " An X-Ray Determina- tion of the Structure of an Antibacterial Compound from the - Sponge, Ianthella ardis ".- Chemical Communications.- p.p. - 397-398.
- (19) Davis B.D., et. al.- 1977 " Tratado de Microbiología ".- Salvat Editores, S.A.- Primera Edición.- Barcelona España.
- (20) Difco información Técnica.- Junio 1973.- " El antibiograma: Sus técnicas y el Sistema Dispens-o Disc ".- p.p. 6-14.
- (21) Eschols H.- 1971.- " Lysoseny: Viral Represion and Site Speci - fic Recombination ".- Ann. Rev. Biochem: 40: 827 -854.
- (22) Eschols H..- 1972.- " Developmental pathways for the Temperate- Phage: Lysis vs. Lysogeny" .- Ann Rev. Gen 6: 157-190.

- (23) Fattorusso E., Minale L. and Sodano G..- 1972.- " Aeroplysinin 1, an Antibacterial Bromo-compound from the Sponge Verongia aëro-phoba" J.C.S. Chem Comm.- p.p. 16 y 17.
- (24) Faulkner John D.- 1973.- " Variabilin, an Antibiotic from the Sponge, Ircinia variabilis ".- Tetrahedron Letters No. 39.- p.p. 3821 - 3822.
- (25) Fulmor W., Van Lear G.E. Morton G.O. and Mills R.D..- 1970.- " Isolation and Absolute Configuration of the Aeroplysi I, Enantiomorphic Pair from Ianthella ardis " Tetrahedron Letters No. 52.- p.p. 4551 - 4552.
- (26) Georgopoulos A., Petranyi G., Mieth H. and Drews Jürgen.- 1981.- " In Vitro Activity of Naftifine, a New Antifungal Agent ".- A.A.C. Vol. 19 No. 3.- p.p. 386 - 389
- (27) Griffith F..- 1928.- " The Significance of Pneumococcal Types" - J. Hygiene 27: 113 - 159
- (28) Hansson H.B., Walder M. and Juhlin I.- 1981.- " Susceptibility of Shigellae to Mecillinam, Nalidixic Acid, Trimethoprim and Five Other Antimicrobial Agents".-AAC .Vol. 19 No. 2.- p.p. 271 -- 273.
- (29) Hotchkiss R.D..- 1949.- " Cyclical Behavior in Pneumococcal -- Growth and Transformability Occasioned by Environmental Changes" Proc. Natl. Acad. Sci. USA 40: 49

- (30) Jawetz Ernest, Melnick Joseph L. y Adalberg Edward A.- 1977.- "Manual de Microbiología Médica" .- Editorial el Manual Moderno S.A.- Séptima Edición.- México D.F.
- (31) Kenji O., Mitsuzo K., Makoto K. and Susumu M.- 1981.- "  $\beta$ -Lactamase Stability and Antibacterial Activity of Cefmeroxime - (SEC-1365), a Novel Cephalosporin ".- Antimicrobial Agents and Chemotherapy, Vol. 20 No. 2.- p.p. 171-175
- (32) Koltsida K., Paraskevopoulou P., Kontomichalou P.- 1979.- Salmonella heidelberg Penicillinase Plasmids Found During a Nosocomial Epidemic ".- ( Sch. Med. Univ. Athens, Greece).- Antibiot. Resist. : Transposition Other Mech., Int. Symp., 4th.- p.p. 371-5
- (33) Larsen, Jens Laurits; Soegaard, Henry.- 1981.- " The Susceptibility of Enteropathogenic and Non-enteropathogenic Porcine Escherichia coli Strains to Polymyxins and other Antibiotics ".- ( Inst. Vet. Microbiol Hyg., R. Vet. Agric. Univ., Copenhagen, Den.) .- Nord Veterinaer Med, 33 ( 9 - 11 ).- p.p. 393-402
- (34) Mago M.L. Saxena S.N. and Ahuja S.- 1982.- " Incidence of -- Transferable Drug Resistance in Salmonella Species Other Than - Salmonella typhi and Salmonella paratyphi A in India During - 1979 " .- ( Natl. Salmonella Escherichia Cent., Cent. Res. Inst. Kasauli, 173205 India ) Indian J. Med Res 75 (jan).- p.p 7-15

- (35) Miller Marcia A., Lefrock Jack L. and Verder Mary J.- 1981.- Comparative Activity of N-Formimidoyl Thienamycin With Third-Generation Cephalosporins and Ureido Penicillins Against Multiple Resistant Serratia marcescens" .- ( Peoria Sch. Med. Univ.- Illinois, Peoria, IL, 61656 USA) .- Microbiol Immunol. 25 (11) p.p. 1119-27
- (36) Minale L., Sodano G., Chan W.R. and Chen A.M., .- 1972.- " Aeropylsinin 2, a Dibromolactone from Marine Sponges Aplysina (Verongia) aerophoba and Ianthella sp.".- J.C.S. Chem. Comm.- p.p. 674-675
- (37) Minale L.- 1976.- " Natural Product Chemistry of the Marine Sponges ".- Pure & Appl. Chem., Vol. 48.- Pergamon Press.- p.p.7-23
- (38) Moody K., Thomson R.H., Fattorusso E., Minale L. and Sodano G.- 1972.- " Aerothionin and Homoaerothionin: Two Tetrabromo Spirocyclohexadienylisoxazoles from Verongia Sponges " .- J.C.S. Perkins I.- p.p. 18-24
- (39) Murray N.- 1977.- " Application of Bacteriophage Lambda in Recombinant DNA Research" .- Miami Winter Symposia. Molecular -- Cloning of Recombinant DNA. Ed. Scott WA, Werner R.- Academic Press, New York.- p.p 135-154

- (40) Nigrelli Ross F., Jakowska Sophie & Calventi Idelisa.- 1959.- -  
" Ectyonin, an Antimicrobial Agent from Sponge, Microcinia pro-  
lífera Verrill" .- Zoologica : New York, Zoological Society 44:  
13.- p.p. 173-176
- (41) Olexy, Vera M., Kelly Debra, Bird Thomas J., Griebble Hans G. -  
and Ferrand Stephen K..- 1982.- " An R-Plasmid of Serratia mar-  
cescens Transferable to Pseudomonas aeruginosa ".- ( Infect. -  
Dis. Lab., Hines VA Hosp., Hines IL 60153 USA).- Chemotherapy -  
(Basel) 28 (1).- p.p. 6-17
- (42) Pohl P., Lintermans p., Conbion B., CledeJ J., Le Minor L., -  
Chasseur M.L. and Ghysels G..- 1981.- " Plasmids of Incompati-  
bility Group H Multiply Drug-Resistant Strains of Salmonella"-  
( Inst. Natl. Rech. Vet., 1180 Brussels. Belg).- Ann Microbiol.  
( Paris), 132 B (3).- p.p. 399-404
- (43) Riley J.P. and Skirrow G.- 1975.- " Chemical Oacenography".- -  
Academic Press. Inc. (London) L.T.D..- 2dn Edition, Vol. 4.- -  
Great Britain .- p.p. 295-298
- (44) Rodriguez R.J. and Parks L.W..- 1981.- " Physiological Respon-  
se of Saccharomyces cerevisiae to 15-Azasterol Mediated Growth  
Inhibition ".- AAC Vol. 20. 2.- p.p. 184-189

- (45) Schmidt F., Van Treck V. and Wiedemann B..- 1979.- " Reassortment and Gene Amplification of R-Factor R 1767 from Salmonella typhimurium ".- ( Inst. Med. Microbiol. Immunol., Univ. Bonn, - 5300 Bonn, Fed. Resp. Ger) Antibiotic Resist,: Trasposition -- Other Mech., Int Symp., 4th .- p.p. 157-63
- (46) Sharma G.M., Vig B. y Burkholder P.R..- 1968.- " Studies on the Antimicrobial Substances of Sponges. - III. Chemical Properties of Some Antibacterial Compounds from Marine Sponges ".- Transactions of Drug from the Sea Symposium" ( Rhode Island) .- p.p.- 119-126
- (47) Sharma G.M. and Burkholder P.R..- 1971.- " Structure of Dibromophakellin, a New Bromine-Containing Alkaloid from the Marine -- Sponges Phakellia flabellata ".- Chemical Communications.- p.p. 151-152
- (48) Stanier R.Y., Douroff M. y Adalberg E.A..- 1970.- " El Mundo de los Microbios" .- Aguilar, S.A. de Ediciones .- Primera edición.- Madrid ( España)
- (49) Stent Gunther S. and Calendar Richard .- 1978.- " Molecular Genetic an Introductory Narrative ".- W.H. Freeman and Company.- - Second Edition.- San Francisco

- (50) Takata N., Suginaka H., Kotani S., Ogawa M. and Kosaki C.- 1981-  
"  $\beta$  - Lactam Resistance in *Serratia marcescens*: Comparison of -  
Action of Benzyl Penicillium Apalcillin, Cefazolin and ceftizoxi-  
me ".- AAC Vol. 19. No. 3.- p.p. 397-401
- (51) Tatulavanich S., Olexy Vera M., Prasad T.R., Bird T. J., Talanda  
Fath Camille, Griebler H.G., and Farrand S.K.- 1981.- " An R -  
Plasmid of Broad Host-Range, Coding for Resistance to Nine --  
Antimicrobial Agents Endemic in Gram negative Nosocomial Isola-  
tes ".- ( Infect.Dis. Lab., Hines VA Hosp. Hines, IL 60141 USA)  
J.Med. Microbiol. 14 (4) .- p.p. 371-80
- (52) Trejo y Pérez J., Ortíz O., García P., Guiscafren G.H., Camez E.  
J., y Muñoz H.O., .- 1981.- " Sensitivity of *Staphylococcus au-*  
*reus* to Penicillin, Dicloxacillin, Gentamicin, Erythromycin and  
Rifampicin" .- ( Hosp. Pediatr. Inst. Mex. Seguro Soc., México,  
México.) Bol. Med. Hosp. Infant. Mex. 38 (6) p.p. 873-80.
- (53) Tsuji Hikoji, Ohashi Yasuhiro, Okumura Kazuo, Tsuji Akiyoshi, -  
Muto Yumiko and Goto Sachiko.- 1982.- "Quantitative Analysis -  
of  $\beta$  - Lactamase Production and Multiple Resistance to  $\beta$  -Lac-  
tam Antibiotics in Clinical Isolates of *Escherichia coli* ".-  
( sch. Med.Toho Univ. Tokyo Japan 100 ) .- Chemotherapy ( Basel)  
28 (1).- p.p. 26-39
- (54) Ulloa M. Hawlin T.- 1978.- " Atlas de Micología Básica ".- Ed.  
Concepto S.A.- México, D.F.- p.p. 52 y 60 a 62

- (55) Vakulenko S.B., Bodunkova L.E., Garaev M.M., Fomina I.P. and Navashin S.M.- 1979.- " Genetic and Physicochemical Analysis of Antibiotic Resistance Plasmids of Clinical Strains ".- - (Natl. Res. Inst. Antibiot.- Moscow, USSR) Antibiot.- Resist.; Transposition Other Mech., Int. Symp., 4th. p.p. 125-30
- (56) Van Lear G.E., Morton G.O. and Fulmon W.- 1973.- " New Antibacterial Bromoindole Metabolites from the Marine Sponge Polyfibrospongia maynardii ".- Tetrahedron Letters No. 4.- p.p - 299-230
- (57) Van Leeuwen W.J., Voogd C.E., Guinee P.A.M. and Marten A.- 1982.- " Incidence of Resistance to Ampicillin, Chloramphenicol, Kanamycin, Tetracycline and Trimethoprim of Salmone - lla Strains Isolated in the Netherlands During 1975-1980 ".- ( Natl. Inst.Public Health, 3720 BA Bilthoven, Neth). 48 (1)- p.p. 85-96
- (58) V.B.D. Skerman, Vicky Mc. Goman and P.H.A. Sneath 1980.- -- " Approved Lists of Bacterial Names ".- American Society for Microbiology.- Washington D.C.
- (59) Watanabe T.- 1963.- " Infective Heredity of Multiple Drug - Resistance in Bacteria " .- Bact. Rev. , 27: 87