

Escuela de Q. de la U. N. A. M.
Examen profesional

576.564

OBTENCION DEL PRINCIPIO ANTIBIOTICO DE TRES ESPECIES
DE ACTINOMICETOS.



TESIS

QUE PARA EXAMEN PROFESIONAL DE QUIMICO PRESENTA LA ALUMNA

Ma. Cecilia Rico Ramírez



QUIMICA

MEXICO, D. F.

1950

2381



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

A mis adorados padres
con todo cariño y gratitud.

**A mis Maestros del
Colegio Hijas de Allende de Pachuca:**

**A mis Maestros del Instituto
Científico y Literario del Estado de Hidalgo:**

**A mis Maestros de la Escuela
Nacional de Ciencias Químicas**

**Mi eterno agradecimiento al Maestro ALFREDO SANCHEZ
MARROQUIN, bajo cuya dirección fué posible el desarrollo del
presente trabajo.**

A mis estimados compañeros y amigos.

A los H. Miembros de mi Jurado

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Microbiología Química, de la Escuela Nacional de Ciencias Químicas.

CAPITULO I

INTRODUCCION

Debido a que los Actinomicetos comprenden un gran número de organismos que tienen la propiedad de inhibir el crecimiento de bacterias, hongos, y aún de algunas especies de los mismos Actinomicetos; así como por poder obtenerse de ellos substancias aprovechables terapéuticamente y por encontrarse ampliamente distribuidos en la naturaleza, se ha tratado de aislar algunas especies de ellos y de éstas, los correspondientes principios antibióticos.

Se considera que el efecto inhibitorio, sobre el desarrollo de bacterias y de hongos, está íntimamente relacionado con la producción de agentes tóxicos, a los cuales se les conoce con el nombre de "antibióticos"; entendiéndose por antibiótico, toda substancia producida por organismos vivos, capaz de desarrollar una acción tóxica que puede manifestarse por la inhibición o muerte del organismo contra el cual actúa.

Los antibióticos conocidos hasta la fecha, se pueden clasificar en dos grupos de acuerdo con su origen: El primero comprende aquellos que proceden de bacterias, levaduras u hongos y el segundo los que se obtienen a partir de Actinomicetos.

Aunque no se puede seguir hablando de antibióticos, sin hacer un poco de historia del antagonismo y poder así comprender mejor, la clasificación de los antibióticos de acuerdo con su origen.

Aún cuando el antagonismo bacteriano se conoce des-

de 1877, solo hasta últimas fechas ha sido ampliamente estudiado. Pasteur y Joubert en ese año describieron el efecto antagónico de ciertos organismos sobre el desarrollo de *B. anthracis* o sea que la enfermedad producida por esta bacteria podía ser reprimida por la presencia de ciertos organismos, acción que podría tener aplicaciones terapéuticas.

De Bary en 1879 (33), enfatizó el significado de las relaciones antagónicas que se verifican entre los microorganismos, notando que cuando dos crecen en el mismo substrato, uno anula el desarrollo del otro.

En 1889 Bouchard (33) descubría que *P. pioceanea* era antagonista a algunas especies bacterianas, no dando nombre para dicha substancia antibacteriana.

Un año más tarde Gasperini (34) demostraba la acción antagónica de los Actinomicetos, observando que estos organismos se desarrollan sobre el micelio de los hongos en los cuales viven bajo una limitada vida de parásitos, como consecuencia de la facultad que poseen de digerir la membrana de los hongos inferiores.

Duchesne (34), en 1897 notó que ciertos hongos del género *Penicillium* eran capaces de inhibir el crecimiento de varias bacterias.

Las posibilidades terapéuticas, que se encontraron a la acción antagónica, pronto fueron aprovechados por Enmerich y Loew, en 1899 para combatir algunas infecciones, empleando para ello lo que creían era una enzima: la pociánasa.

Frost en 1904 (34) estableció que al suelo se le podía considerar como una fuente de antagonistas del grupo de los Actinomicetos y que el enriquecimiento del suelo con bacterias específicas patógenas tales como *M. tuberculosis* no traía como consecuencia el desarrollo de un antagónico específico a dicho bacilo.

En 1913, Alsberg y Black (35) obtuvieron el Acido penicílico, producido por *Penicillium puberulum*. De acuerdo con estos investigadores, esta substancia es específica contra patógenos gram positivos y gram negativos. En este mismo año Voudremer (33) establece que el *Aspergillus fumigatus* atenúa el desarrollo del *Mycobacterium tuberculosis*.

Greig y Smith (34) observaron en 1917, que cuando una muestra de suelo se siembra en una placa de agar nutritivo, el crecimiento de ciertas colonias de *B. Mycooides* y

B. vulgatus se inhibe por otras colonias existentes en la placa. Por el examen de las colonias que provocan el efecto tóxico, se encontró que estaban formadas por Actinomicetos.

En el año de 1921, se probaron un gran número de Actinomicetos por su acción antibacteriana, siendo Lieske el que estableció que el proceso antagonico en la naturaleza puede considerarse como selectivo, o sea que dicha acción varía de acuerdo con la especie de Actinomiceto.

Un nuevo agente antibiótico fué descrito en 1924 por Gratia y Dath (33), obtenido a partir de Actinomicetos, al cual se le dió el nombre de Actinomicetina.

Rosenthal (34) introduce en 1925 varios métodos para la medición de la actividad bacteriostática y bactericida de los Actinomicetos; aislando además del polvo, un organismo antagonico para *C. diphtheriae*.

Puede decirse que con el descubrimiento de Fleming, en 1929 de la Penicilina, se inicia la época de los antibióticos. Al examinar, dicho investigador, durante su trabajo unas placas de estafilococos, ~~notó que un *Penicillium* contaminante, había formado una colonia y que las colonias bacterianas habían sido lisadas; este hongo fué identificado por él erróneamente, como *Penicillium rubrum* y posteriormente clasificado como *Penicillium notatum*, el que, cultivado en caldo imparte a este propiedades antibacterianas.~~

En 1921 se reportó el descubrimiento de una nueva sustancia antibiótica, a la cual se le dió el nombre de Citrinina, obtenida a partir de *P. citrinum*, descubierta por Hetherington y Raistrick (33).

De acuerdo con Borulina, en 1935 los Actinomicetos presentan antagonismo contra varias formas de bacterias esporuladas, y son capaces de provocar la lisis de las células vivas, produciendo además una sustancia termoestable cuando se cultivan sobre medios de agar.

Nakhimovskaia (34) encontró que los Actinomicetos se encuentran ampliamente distribuidos en la naturaleza y que la mayoría de los aislados, de una gran variedad de suelos, presentan propiedades antagonicas; aunque el principio antibiótico solamente en un pequeño número de casos ha sido aislado del medio. Estas propiedades antibacterianas no sólo se presentan en los medios de cultivo artificiales, sino que también en el mismo suelo; estando además relacionadas con la mayor o menor cantidad de materia orgánica.

El siguiente agente antibiótico descrito en 1936, fué la Gliotoxina de Weindling y Emerson (33), siendo el productor de dicha substancia el *Tricoderma Lignorum*; esta substancia es efectiva contra organismos gram positivos y gram negativos.

La substancia producida por el organismo *A. albus* se consideró en un principio como de la naturaleza de una endo y exo bacteriolisina. Más tarde fué designada por Welsch (33) 1937-1939 como Actinomicetina. La lisis de las bacterias vivas se considera que ocurren en dos fases: en la primera se hace sentir el efecto bactericida de la substancia sobre la bacteria viviente y en la segunda se hace notoria la acción bacteriolítica sobre la bacteria muerta.

En 1938 Anslow y Raistrick (33) descubrieron otra substancia antibiótica, la Fumigatina; una substancia derivada del metabolismo del *Aspergillus fumigatus* y con una marcada acción contra patógenos.

A la gran lista de los antibióticos enumerados, en el año de 1939 se suma uno más: la Gramicidina, debida a los trabajos de Dubos y producida por un organismo esporulado, el *B. brevis* que posee propiedades líticas.

A esta substancia más tarde se le llamó Tirotricina, estudios posteriores llevaron a considerar que la Tirotricina es una mezcla de dos substancias conocidas como Gramicidina y Tirocidina.

En este mismo año Krassilnikov y Koreniako (34) en contraron un gran número de Actinomicetos del género *Streptomyces* que tienen propiedades fuertemente bactericidas para una gran variedad de organismos; las substancias obtenidas tienen la propiedad de lisar completamente a las células o bien matarlas, sin una lisis posterior.

Los Actinomicetos que poseen propiedades antagónicas contra hongos y bacterias están ampliamente distribuidos; observándose que las formas antagónicas que se presentan con mucha mayor frecuencia, son del género *Streptomyces*, aún cuando esto no es una regla.

Día a día se descubren nuevos antibióticos, así es como en 1940 Waksman y Woodruff (33) encuentran la Actinomicina, obtenida a partir del *S. antibioticus*, este organismo está caracterizado por la producción de pigmentos negros cuando se desarrolla sobre un medio conteniendo proteína y peptona. Está formada por la mezcla de dos substancias: la Actinomicina A y la Actinomicina B. La primera es soluble

en éter, alcohol y agua, la segunda es soluble en éter de petróleo, parcialmente en alcohol, dando una suspensión turbia en agua.

En 1942 se descubren nuevos principios antibióticos, durante este año se encuentra la Estreptotricina producida por el *S. Lavendulae*; que actúa contra organismos gram positivos y gram negativos, siendo dicha acción más marcada contra bacterias gram negativas.

En este mismo año se obtienen otros dos principios antibióticos: la Fumigacina derivada del *Aspergillus fumigatus* y la Clavacina derivada del *Aspergillus clavatus*.

En 1943 se descubre el ácido Aspergílico obtenido del *Aspergillus flavus* que ya había sido descrito antes por White en 1940 (33). También en este año Bush y Goth (33) describen la Flavacina, obtenida igualmente del *A. flavus*.

En enero de 1944 se descubre una nueva substancia antibiótica, tal vez la de mayor importancia descrita hasta entonces, debida a Schatz, Bugie y Waksman (25), y descrita con el nombre de Estreptomocina, debido a que es producida por una especie de Actinomicetos que presentan tanto micelio aéreo, como grupos esporulantes. A este grupo de Actinomicetos Waksman y Henrici le han dado el nombre de *Streptomyces*.

La Estreptomocina se obtiene de cepas de *Streptomyces griseus*.

La Estreptomocina posee gran actividad contra varios organismos gram negativos, y pequeña o ninguna toxicidad para los animales. En este mismo año se encontró otro antibiótico la Flavacidina, aislada por McKee, Rake y Hoock del *A. flavus* (33).

El *B. subtilis*, produce varios principios antibióticos: la Subtilina, la Bacilina, la Bacitracina y otros.

La primera fué descrita por Jansen y Hirschmann en 1944, ejerce una fuerte acción antibiótica contra gran número de organismos gram positivos y algunos cocos gram negativos; en altas concentraciones actúa como bactericida y diluido, como bacteriostático.

La Bacilina tiene una notable acción sobre organismos del grupo "*Coli*", siendo esta acción más notable en los líquidos de cultivo ya que su extracción resulta casi imposible. La Bacitracina es una substancia antibacteriana descubierta por Johnson, Anker y Meloney en 1945 (7); ejerce

acción antagónica contra el *Treponema pallidum*.

Durante esta última década, el número de antibióticos ha aumentado considerablemente, entre los descubiertos más recientemente tenemos: Eumicina, Colistatina, Grifolina, Griseína, Micromonosporina, Cloromicetina, etc., sin embargo, puesto que el objeto del presente trabajo es la obtención del principio antibiótico de especies de Actinomycetos, únicamente se enumerarán aquellos obtenidos a partir de estos organismos.

Con el nombre de Lavendulina y Actinorubina se designa a dos antibióticos obtenidos por Kelner y Morton (17), de dos especies de Actinomycetos, la primera producida por un organismo semejante al *S. lavendulae* y conocido con el nombre de A-10; la segunda tiene grandes semejanzas con el *S. erythreus* (A-105); estas dos cepas bajo condiciones semejantes de crecimiento, producen las sustancias antibacterianas antes mencionadas, que son activas contra organismos gram positivos y gram negativos.

~~Se ha establecido, que la propiedad de producir es~~ treptomícina, únicamente está limitada a algunas cepas de *S. griseus*, pero se ha encontrado que existen variantes a dicha cepa que producen otros antibióticos, siendo uno de ellos la Griseína, descrita por Reynolds y Waksman (22) en 1947. La Griseína tiene un gran poder selectivo contra algunas bacterias gram negativas y gram positivas.

Con el nombre de Sulfactina, se designa a la substancia antibiótica obtenida por Kelner y Kocholaty (5) de una especie de *Actinomyceto*, (15), semejante al *S. roseus*. Se le designa con este nombre por tener azufre en su molécula; es activa contra organismos gram positivos e inactiva contra gram negativos.

La Neomicina y la Borrelidina igualmente corresponden a este grupo de antibióticos, la primera pertenece al grupo de Actinomycetos no cromógenos (en líquidos); actúan contra bacterias gram positivas y gram negativas, la segunda contra especies del género *Borrelia*, de ahí su nombre.

Sin duda las dos últimas substancias antibióticas de mayor importancia son: la Cloromicetina y la Aureomicina.

La Cloromicetina se obtiene del *S. venezuelae*. Fue aislada por Burkholder (23) y cristalizada por Enrich, (6) posee fuerte efecto antibacteriano contra organismos gram

negativos, incluyendo a algunos miembros del género *Bruce-lla*; la Aureomicina deriva del *S. aurefaciens* y tiene gran acción terapéutica contra bacterias, rikettsias y virus patógenos.

Terramicina es el nombre dado a la substancia anti-biótica descubierta en el laboratorio experimental de Chas. Pfizer & Co. de Brooklyn, N. Y. Se extrae de una Actinomiceto recientemente descrito y designado con el nombre de *Streptomyces-rimosus*.

La Terramicina actúa sobre bacterias, rikettsias y protozoarios, sin embargo su acción terapéutica, estará bien cimentada hasta que se terminen los trabajos clínicos que al respecto se están realizando.

De acuerdo con la clasificación, que por su origen se hace de los antibióticos, y tomando en consideración únicamente los obtenidos de los Actinomicetos, incluyo el siguiente cuadro en el cual se reúnen los más importantes:

ANTIBIOTICOS DERIVADOS DE ACTINOMICETOS.

Antibiótico	Org. del que deriva.	Autor que lo descubrió y fecha de reporte.	Org. sensible.
Actinomicetina	A. antibioticus.	Grathia y Dath. 1924.	Gram (P). Gram (N).
Actinomicina A.	A. antibioticus.	Waksman y Woodruff. 1940.	Gram (P).
Actinomicina B.	A. antibioticus.	Waksman y Woodruff. 1940.	Gram (N).
Estreptotricina.	S. lavendulae.	Waksman y Woodruff. 1942.	Gram (P). Gram (N).
Estreptomici- na.	S. griseus.	Schatz, Bugie y Waksman. 1944.	Gram (P). Gram (N).
Lavendulina.	A-10.	Kelner y Morton. 1947.	Gram (P). Gram (N).
Actinorubina.	A-105.	Kelner y Morton. 1947.	Gram (P). Gram (N).
Griseína.	S. griseus	Reynolds y Waksman. 1947.	Gram (P). Gram (N).
Sulfactina.	R-30.	Kelner y Kocholaty. 1947.	Gram (P).
Cloromicetina.	S. venezuelae.	Enrlich 1948.	Gram (N). Brucelas.
Aureomicina.	S. aurefaciens.		Virus, rikettsias.
Terramicina.	S. rimosus.		Rikettsias y protozoarios.

CAPITULO II

PARTE EXPERIMENTAL Y RESULTADOS

I. *MATERIALES Y METODOS.*

- A) CURVA DE ACTIVIDAD.
- B) SELECCION DEL MEDIO DE CULTIVO.
 - a) FUENTES DE CARBONO.
 - b) FUENTES DE NITROGENO.

II. *EXPERIENCIAS Y RESULTADOS.*

- A) INOCULACION.
- B) EXTRACCION.
- C) PURIFICACION.
 - a) Método del Acido Pírico.
 - b) Método del Heliantato.
- D) OTROS METODOS DE PURIFICACION.
- E) RESUMEN DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS.

I. MATERIALES Y METODOS

A) *CURVA DE ACTIVIDAD*. El punto de partida en el desarrollo de este trabajo, fué la determinación de la curva de actividad de un antibiótico conocido, Estreptomycin en este caso, con el objeto de tomarla como referencia y poder saber así la concentración del líquido por ensayar.

Para este objeto creímos más práctico expresar la concentración en grs/lit que en unidades por ese mismo volumen.

Existen actualmente varios métodos para la medición del poder antibiótico de una substancia, los más empleados hasta ahora debido a su fácil manipulación son: el de discos de papel y el de las copas de Oxford.

El primero consiste en preparar cajas con gelosa nutritiva y sobre estas colocar aproximadamente 0.5 ml de una suspensión de gérmenes de prueba, por ejemplo *Bacillus subtilis* de 24 horas de sembrado, el cual se distribuye uniformemente en la superficie de la gelosa, se colocan las cajas en la estufa hasta que el líquido de la suspensión haya casi secado, se sacan y sobre su superficie se colocan discos de papel filtro estériles de dimensiones standard, embebidos en la substancia cuya actividad se trata de determinar.

Se incuban a 37°C y se hace la lectura a las seis y a las catorce horas con objeto de medir el "halo" de inhibición y ver si este ha aumentado con el tiempo.

El segundo método o sea el debido a Fleming y modificado por Foster y Woodruff se conoce también con el nombre de "Método de los cilindros en placas" ó de las

“copas de Oxford”. En este método se dispone de pequeños cilindros de porcelana, de acero inoxidable, nicromo o bien de vidrio, cuyas dimensiones deben ser de 8 mm de diámetro interior y 12 mm de longitud; se esterilizan a la flama y cuando ya se han enfriado, se colocan sobre la superficie de la gelosa, la cual ha sido previamente sembrada con la suspensión de *Bacillus subtilis* o de *S. aureus*. La solución por comprobar se coloca en el interior del cilindro y ésta al difundirse, revelará su potencia debido a la mayor o menor amplitud del campo inhibitorio.

Existe una modificación a estos métodos (28) y así, en vez de verter un volumen determinado de la suspensión de *B. subtilis* o *S. aureus* sobre la superficie del agar, la inculación se efectúa por medio de un “hisopo” estéril, el cual está formado por un palillo bastante largo en uno de cuyos extremos se ha colocado un algodón perfectamente envuelto; esta variante ofrece la ventaja de hacer la distribución de la suspensión más homogénea, así como de facilitar el secado de la misma.

Es importante hacer notar una de las condiciones indispensables para que se obtengan resultados satisfactorios en cualquiera de las pruebas efectuadas por los métodos antes mencionados.

Si la superficie de gelosa nutritiva ya inoculada tiene cantidad de líquido suficiente, el cual puede verse al inclinar la caja que lo contiene, el contenido de la copa se extiende por una superficie que no corresponde a la que ocuparía al difundirse en ausencia de aquél, debido a las corrientes del líquido en exceso. Se obtienen pues, “halos” no bien definidos con bordes irregulares que ocupan una superficie menor a la que presentarían los formados sobre una superficie lo suficientemente seca, ya que la concentración del problema ha disminuído al mezclarse con el exceso de suspensión.

La solución tipo se preparó a partir de sulfato de estreptomomicina, cuyo contenido era equivalente a un gramo de estreptomomicina básica pura, se disolvió en 10 ml de suero fisiológico y de ahí se hizo una serie de diluciones.

Para la primera dilución se tomaron 0.1 ml de solución inicial, para la segunda 0.2 ml, la tercera 0.4 ml, la cuarta 0.6 ml y la quinta 0.8 ml. A cada uno de los tubos se agregaron 10 ml de suero fisiológico.

Para hacer posible la comparación entre las concentraciones del medio ya cultivado con Actinomicetos y las

de la serie de diluciones, se investigó entre la literatura de los diferentes autores consultados, para saber de qué orden era la máxima concentración obtenida al cultivar algunas de las cepas por ellos estudiadas, encontrándose que era de 0.1 gr/lit.

Así pues se prepararon dos gráficas: una para concentraciones altas y otra para bajas, la última está comprendida entre aquellos límites que nos parecieron más amplios para el rango de concentraciones a obtener con las cepas que se estudiaron.

Así, se tomaron los siguientes volúmenes del tubo que contenía 0.1 ml de la solución original:

0.1 ml, 0.2 ml, 0.4 ml, 0.6 ml y 0.8 ml y se les agregó 10 ml de suero fisiológico a cada uno.

Las relaciones que nos dan el contenido de estreptomina en cada una de las diluciones son las siguientes:

ALTAS CONCENTRACIONES

<i>Tubo N°</i>	<i>Relación</i>	<i>Grs. Estreptomina</i>
1	$\frac{0.1}{10.1}$	0.0099
2	$\frac{0.2}{10.2}$	0.00196
3	$\frac{0.4}{10.4}$	0.00385
4	$\frac{0.6}{10.6}$	0.00566
5	$\frac{0.8}{10.8}$	0.00741

BAJAS CONCENTRACIONES

<i>Tubo N°</i>	<i>Relación</i>	<i>Grs. Estreptomicina</i>
1	0.00099 10.1	0.000098
2	<u>0.00198</u> 10.2	0.000194
3	0.00396 10.4	0.000381
4	<u>0.00594</u> 10.6	0.00056
5	<u>0.00792</u> 10.8	0.00073

Parecería a simple vista que el sistema adoptado para obtener la serie de diluciones es del todo inadecuado, pero aunque los números que expresan la concentración de cada uno, son algunas veces inconmensurables, el error volumétrico se encuentra reducido al mínimo, pues cabe recordar que las pipetas de 10 ml no están graduadas con gran precisión, lo cual dificulta medir volúmenes del orden de los décimos de ml.

Las cajas de Petri se prepararon poniéndoles una capa uniforme de agar nutritivo, sobre cuya superficie se distribuyó una suspensión de *Bacillus subtilis* empleando el método del "hisopo".

Sabemos que el *B. subtilis* es gram Positivo, sin embargo presenta una gran sensibilidad a las soluciones de estreptomicina, es la causa de su empleo en los trabajos de Waxman como organismo de prueba para la actividad, no sólo de la estreptomicina sino en general para otros muchos antibióticos.

Una vez colocados dentro de las cajas los cilindros de Oxford, se pusieron en estos 0.1 ml de cada una de las diluciones, incubándose en la estufa a 37° C. Después de ca-

torce horas se hizo un examen, encontrándose en todas ellas "halos inhibitorios", perfectamente definidos y cuyas dimensiones variaban de acuerdo con la mayor o menor concentración de estreptomycinina puesta en cada copa.

Las lecturas de los "halos" expresados en milímetros fueron los siguientes:

ALTAS CONCENTRACIONES

<i>Caja No.</i>	<i>Dm. en mm.</i>	<i>Promedio mm.</i>	<i>Estreptomycinina</i>
1	37, 38, 38	38	0.0099
2	32, 36, 38	36	0.0196
3	39, 40, 42	40.3	0.0385
4	44, 41, 41	42	0.0565
5	40, 45, 45	43	0.0741

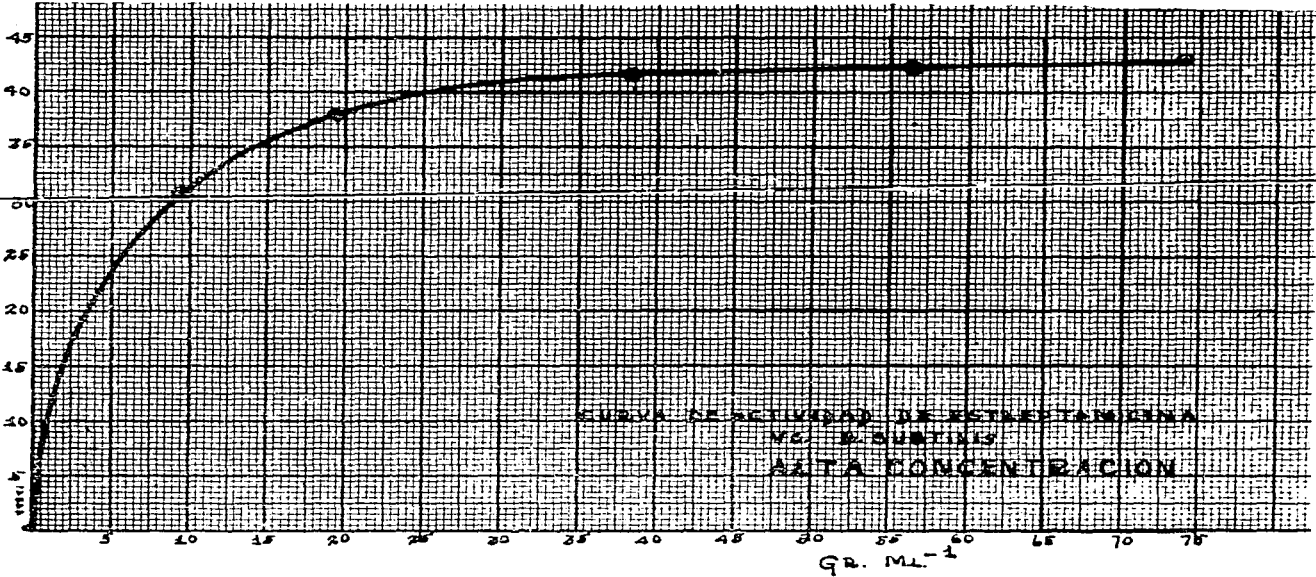
BAJAS CONCENTRACIONES

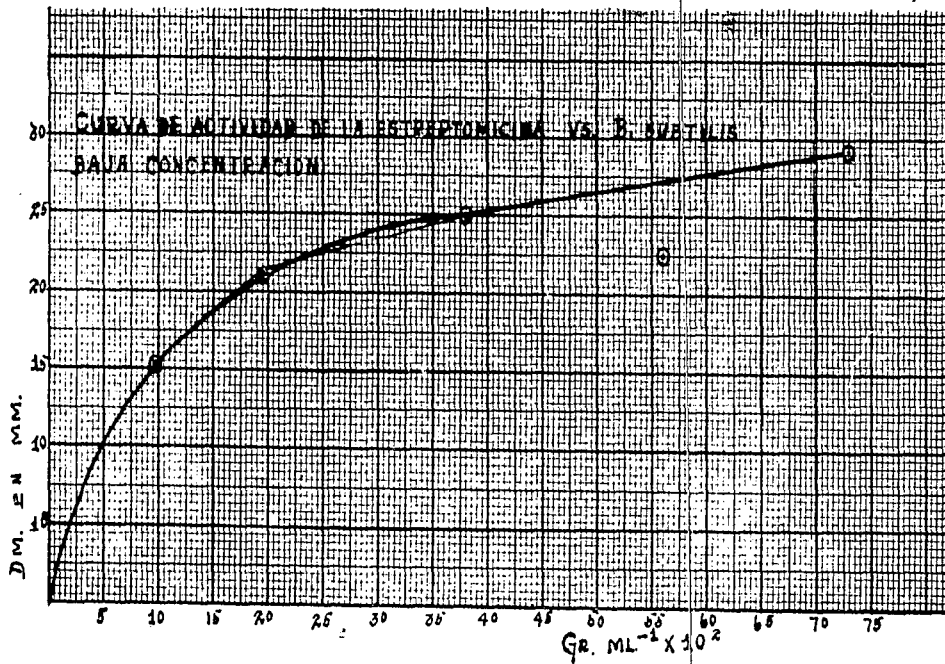
<i>Caja No.</i>	<i>Dm. en mm.</i>	<i>Promedio mm.</i>	<i>Estreptomycinina</i>
1	16, 14, 16	15.3	0.000098
2	21, 21, 22	21.3	0.000194
3	25, 26, 24	25	0.000381
4	21, 24, 23	22.6	0.00056
5	28, 30, 30	29.3	0.00073

NOTA.—En la segunda columna están anotadas las tres medidas tomadas aproximadamente siguiendo diámetros inclinados uno respecto de otro 60°, en la tercera aparece el promedio de esas tres lecturas y en la cuarta la concentración en gramos de la solución empleada.



UNIVERSIDAD NACIONAL DE MEXICO. FACULTAD DE QUIMICA.





B).—SELECCION DEL MEDIO DE CULTIVO

Tomando en consideración que los Actinomicetos varían grandemente de acuerdo con las condiciones nutritivas del medio, así como que muchas de sus características únicamente llegan a hacerse palpables con el empleo de un medio sintético y como concomitante la producción de ciertas sustancias, producto de su metabolismo, es de vital importancia la selección del medio de cultivo.

Cuando únicamente se trata de determinar la morfología y propiedades características de cultivo, se emplean comúnmente los medios sintéticos; sin embargo para otros propósitos se hace necesario el uso de medios orgánicos. Cabe hacer notar que un organismo que habitualmente se desarrolla a expensas de un medio nutritivo formado por sustancias orgánicas complejas, puede adaptarse fácilmente a otros medios, aun cuando las condiciones nutritivas de estos sean muy diversas.

Citaremos algunas de las sustancias orgánicas complejas, las cuales al agregarse a un medio de cultivo, hacen que la producción de la sustancia activa sea muy rápida: extracto de carne, extracto de levadura, agua de cocimiento de maíz, harina de soya, etc. Si el medio de cultivo que se emplea es sintético simple, el desarrollo de la sustancia activa, es muy lento y en consecuencia el rendimiento bajo.

En la selección de un medio de cultivo para Actinomicetos, se debe considerar, en primer lugar, que este proporcione una fuente de carbono y de nitrógeno completas y que a la vez facilite la producción de la sustancia activa.

a) FUENTES DE CARBONO.—Beijerinck fué el primero en determinar que ciertos Actinomicetos son capaces de obtener el carbono y energía necesarios, a partir de compuestos simples. Asimismo, son capaces de utilizar una gran variedad de compuestos orgánicos simples y complejos como fuentes de carbono; entre estos podemos citar a los ácidos orgánicos, azúcares, almidones, hemi celulosas y celulosas, proteínas, polipéptidos, aminoácidos, etc.; pueden también estos organismos atacar a un grupo limitado de grasas, hidrocarburos, compuestos de benceno y algunas sustancias resistentes como ligninas, taninos y hule.

Entre las principales fuentes de carbono que son a la vez las mejores, se encuentran: glucosa, maltosa, dextrina, almidón, glicerol, ácidos orgánicos y proteínas.

Los carbohidratos como la glucosa favorecen el crecimiento del organismo y la utilización de proteínas y aminoácidos; pero después de múltiples estudios, se ha llegado a la conclusión que las concentraciones considerables de glucosa, ciertamente aumentan la formación de la substancia antibiótica, pero esta tendrá una actividad muy inferior a la que tendría uno obtenido con bajas concentraciones de glucosa; o sea, que la glucosa nos puede servir de "buffer" a bajas concentraciones, ya que la acidez inicial del medio debida al ácido producido por ella, tiende a neutralizarse con el amonio en exceso producido por el Actinomiceto al desarrollarse; llegándose pronto a un máximo debido al rápido cambio del pH del medio, ya que este llega a ser de 8.6 y aún de 9.0.

D).—FUENTES DE NITRÓGENO.—Los Actinomicetos son incapaces por sí mismos de fijar el nitrógeno atmosférico, pero en cambio, son capaces de utilizar tanto formas orgánicas como inorgánicas del mismo.

Entre los compuestos de nitrógeno empleados para tal fin, cabe citar los siguientes: glicocola, alanina, ácido aspártico, aminoácidos, etc. Asimismo, los Actinomicetos pueden obtener su fuente de nitrógeno a partir de nitratos.

Se encuentran además otros elementos que son de vital importancia para un buen desarrollo: entre estos tenemos el Fe, S, Mn, P, K, y Mg.

Los medios más comunmente empleados por reunir las dos condiciones antes mencionadas son los siguientes:

Medio de extracto de levadura (Waksman):

Ext. de levadura	10	gr
Glucosa	10	"
NaCl	5	"
Sulfato de magnesio	0.25	"
FeSO ₄ .7H ₂ O	0.01	"
Agua destilada	1000	ml
pH	6.8	

Medio de Emerson:

Ext. de carne	4.0	gr.
Peptona	4.0	"
NaCl	2.5	"

Ext. de levadura	1.0	„
Glucosa	10.0	„
Agua destilada	1000	ml
<i>Medio de Extracto de carne:</i>		
Peptona	5.0	gr.
Ext. de carne	5.0	„
NaCl	5.0	„
Agua de la llave	1000	ml
pH	7.2 a 7.4	
<i>Medio de Glucosa:</i>		
Glucosa	10	gr
Peptona	5	„
Ext. de carne	5	„
Cloruro de sodio	5	„
Agua de la llave	1000	ml
pH	7.1	

II. EXPERIENCIAS Y RESULTADOS

Los principios antibióticos obtenidos se lograron, a partir de las siguientes cepas:

No. 1 *Streptomyces griseus*.

No. 2 Cepa X-1 (*Streptomyces* sp.)

No. 3 Cepa X-97 (*Streptomyces* sp.)

La primera procedente de la American Type Culture Collection N. y las otras dos proporcionadas por el Profesor A. Sánchez Marroquín.

Se escogió el *S. griseus*, para que sirviera de guía en el proceso de obtención y purificación, ya que es uno de los mejor estudiados hasta ahora, y en segundo lugar para que sirviese de referencia al establecer tanto semejanzas como diferencias posibles entre el principio antibiótico de las dos nuevas cepas con respecto a la estreptomycin.

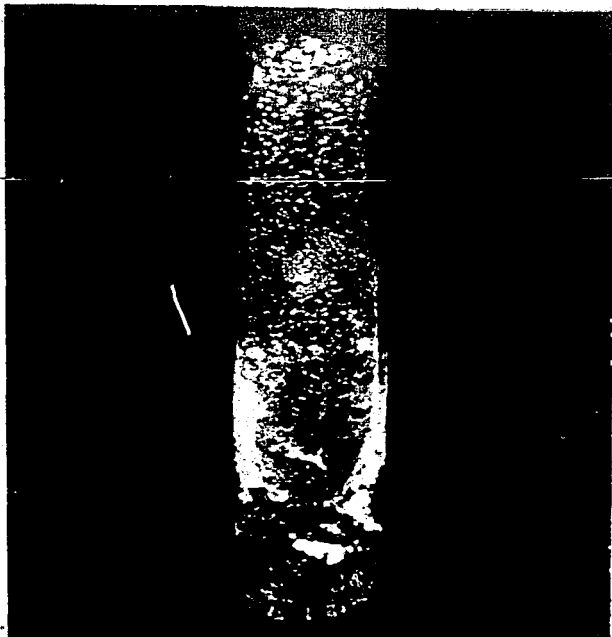


CULTIVO S. GRISEUS



CULTIVO CEPA X-1





CULTIVO CEPA X-97

A).—Inoculación. Inoculación.

Cada una de las cepas antes mencionadas, fué sembrada en un medio en el cual los componentes no reuniesen las características enumeradas anteriormente, o sea en un medio muy pobre, con objeto de que cada uno de los cultivos esporulara, y una vez estando en esas condiciones, al hacer la siembra a un medio rico la multiplicación fuera óptima.

El medio escogido para tal objeto fué el de papa, el cual tiene la siguiente composición:

Medio de papa

Papas peladas	300 gr
Agar	20 „
Glucosa	5 „
Agua de la llave	1000 ml
pH	6.8

La esporulación completa se efectúa 7 ó 10 días después de haberse hecho la siembra, teniendo las esporas una superficie brillante de color amarillento o bien rosado; la forma de esporulación depende de la naturaleza específica de cada organismo, así como de las condiciones de cultivo.

De este cultivo, se suspenden las esporas en suero fisiológico, con el objeto de que sirvan para inocular frascos de gran superficie, en los cuales se ha puesto medio de Waxman adicionado de agar en un 2%; las esporas así inoculadas en un medio reciente, germinan con rapidez, generalmente después de 2 a 6 horas.

Los frascos de gran superficie con el cultivo, nos servirán como nuevas fuentes para obtener esporas y hacer de ahí las siembras en el medio líquido para la producción de cada uno de los antibióticos.

Los frascos de gran superficie son de forma plana, con capacidad de un litro, en ellos se pusieron 100 ml del medio sólido, se agregó esta pequeña cantidad para formar una capa delgada que permitiera la obtención de esporas en el menor tiempo posible. Se colocan en la estufa a incubar a una temperatura menor de 28° C.

Una vez que el desarrollo de los micelios aéreos ha llegado a su máximo, lo cual se comprueba porque en to-

da la superficie del medio hay una película uniforme, producida por el desarrollo de las cepas, el medio de Waksman al igual que la superficie del cultivo han tomado una pigmentación muy variada; en el caso del *S. griseus* el medio adquirió un tinte ligeramente rosado, la cepa X-1 café verdoso y en cambio el medio conteniendo la cepa X-97 tomó tintes violáceos; estas distintas coloraciones del mismo medio, son debidas a la propiedad que tienen los Actinomicetos de producir una gran diversidad de pigmentos cuando se desarrollan tanto en medios sintéticos como orgánicos.

Estas pigmentaciones pueden variar en intensidad según la composición del medio, (fuentes de carbono y nitrógeno) y la influencia de algunas condiciones de crecimiento tales como aereación y temperatura, llegando a considerarse algunos de naturaleza sintética cuando son el resultado de transformaciones de los constituyentes del medio.

La producción de pigmentos por Actinomicetos ha sido utilizada como una característica importante de cultivo al describir dichos organismos, designándoseles con el nombre de formas cromógenas.

La naturaleza y la formación de estos pigmentos ha sido ampliamente investigada por Beijerinck; de acuerdo con este autor, el proceso de producción de pigmentos de los Actinomicetos, cuando estos se desarrollan en medios conteniendo gelosa, está íntimamente relacionado con la formación de una forma quinónica, la cual se vuelve café en un medio alcalino o en presencia de oxígeno; además dicha forma quinónica, ejerce en presencia del hierro contenido en el medio una acción enzimática, derivando dicha forma de la peptona del medio.

Para cada una de las cepas se prepararon 20 frascos de medio de Waksman líquido, conteniendo cada uno de ellos 160 ml., con objeto de que el volumen final del medio con la substancia activa después de haberse hecho el control de actividad, fuese de 3 litros.

Al preparar el medio, debe tenerse especial cuidado en ajustar el pH a 6,8, ya que los Actinomicetos requieren para su desarrollo un medio neutro o ligeramente alcalino.

De la fuente de esporas preparada con anticipación, se hizo una suspensión en suero fisiológico, procurando que éste arrastre consigo la mayor cantidad de esporas y así la inoculación de los frascos sea abundante.

La superficie de las tres cepas al ponerse en contacto con el suero, presentó una superficie brillante y una gran resistencia a mojarse, ya que en su composición entran algunos lípidos.

La obtención del principio antibiótico, puede hacerse por medio de cultivos estacionarios en gran superficie o por cultivo sumergido con aereación y agitación.

El primer método consiste en sembrar, en el medio seleccionado, una suspensión de esporas de la cepa en estudio, hecho esto, se incubaba a 28° C. Las colonias al desarrollarse pueden formar una película uniforme sobre la superficie del medio, un anillo alrededor de las paredes o bien colonias aisladas.

Se puede presentar otra variación en el modo del desarrollo del Actinomiceto, la cual consiste en que tanto en el fondo del medio de cultivo como en la superficie del mismo, se agrupan una serie de colonias las cuales tienen el aspecto de copos; este último modo de desarrollo está grandemente influenciado por la naturaleza de las esporas, la cantidad de aire que poseen, así como por la agitación del medio, lo cual trae consigo el rompimiento del micelio al iniciarse el nuevo desarrollo.

El método de cultivo sumergido se emplea sobre todo en aquellos casos en que la producción de la substancia activa se hace en grande escala; en este caso las colonias de Actinomicetos toman el aspecto de laminillas y el mayor o menor desarrollo se aprecia por el aumento de turbidez del medio de cultivo.

Para obtener un buen desarrollo por este método, se necesita la concurrencia de dos factores: agitación y aereación; estas tienen por objeto evitar el crecimiento en la superficie.

La agitación se hace por medio de un agitador de aspas y la aereación por medio de una bomba. En los grandes laboratorios, estos dos requisitos se cumplen con el empleo de tambores fermentadores rotativos equipados con aeradores y agitadores; la eficiencia en estos casos es máxima.

En nuestro caso empleamos el primer método por ser más accesible.

Cada uno de los frascos fué inoculado con 3 ml. de la suspensión de esporas, incubándose a la estufa, colocan-

do los frascos en dos niveles, siempre en forma horizontal con objeto de que la superficie de desarrollo fuese mayor, se debe además procurar que los tapones de los frascos no se mojen para evitar cualquier contaminación.

Se hacen observaciones periódicas de los frascos para ver el desarrollo alcanzado. La primera determinación de actividad (contra *B. subtilis*) se hizo al tercer día de la siembra, habiendo resultado positiva para el *S. griseus* y negativa para las otras cepas.

La segunda determinación se hizo al sexto día de la siembra resultando igualmente positiva para el *S. griseus* y el X-1, y negativa para la cepa X-97.

La tercera determinación se practicó al noveno día resultando activas las cepas *S. griseus* y la X-1, la primera fué la que dió halos de inhibición de mayores divisiones, en cambio la segunda dió halos muy pequeños pero perfectamente definidos. La cepa X-97 no mostró actividad.

De acuerdo con la magnitud de los halos, se construyó la siguiente tabla, calculándose además la concentración probable en gramos por litro, relacionado las dimensiones de los halos con la gráfica de actividad.

Cepa	Dm. en mm.	Tiempo en días	Con. grs/lt.
<i>S. griseus</i>	12	3	0.07
	14	6	0.09
	17	9	0.12
X-1	—	3	—
	13	6	0.08
	20	9	0.16

En vista de que la cepa X-97 no dió actividad alguna, se pensó que ésa tal vez fuera más tardía en producir en principio antibiótico por lo que nuevamente se le determinó su actividad a los 12 días, habiendo resultado positiva en algunas de las cajas y en cambio en otras no se obtuvo halo inhibitorio definido, si no más bien, una especie de halo difuso de color café.

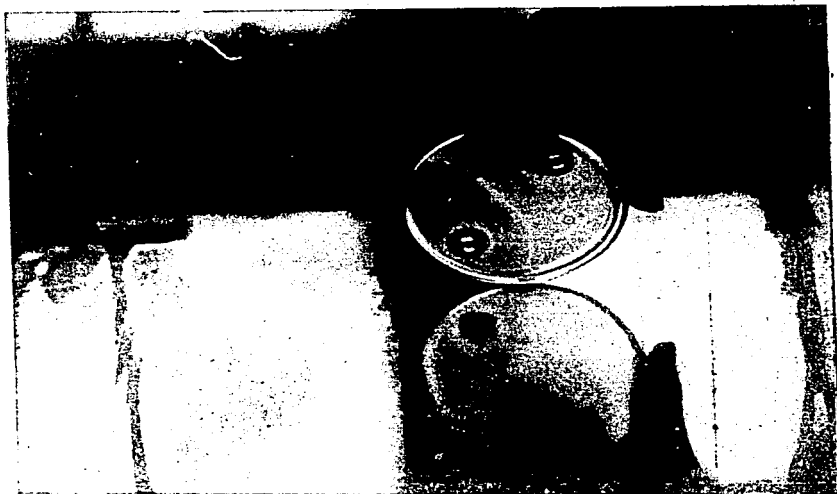
Al *S. griseus* y al X-1 se les determinó también actividad con objeto de ver si esta había aumentado, pero como las dimensiones de los halos resultaron iguales a las de la vez anterior se concluyó que la concentración del antibió-

tico no había aumentado si no que permaneció constante, lo que quiere decir que el cultivo ha alcanzado su desarrollo máximo y está en condiciones de extraerse.

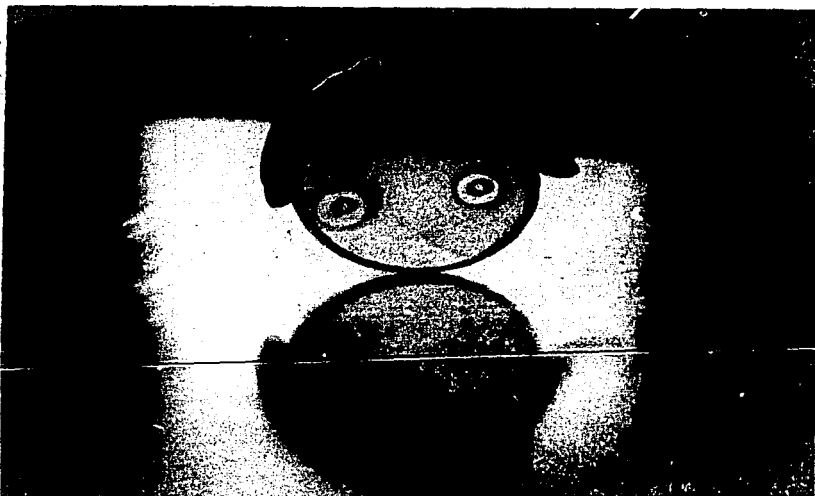
Después de dos semanas de incubación volvió a probarse la actividad de la cepa X-97 encontrándose que el tamaño de los halos había aumentado, siendo positivo para todos los frascos, aun cuando las dimensiones no fueron constantes, o sea que en algunos la concentración del antibiótico fué mayor que en otros.

Haciendo una tabla semejante a la anterior se determinó la concentración en gramos por litro.

<i>Cepa</i>	<i>Dm. en mm.</i>	<i>Tiempo en días</i>	<i>Con. grs/lt.</i>
X-97	11	9	0.06
	15	15	0.10



HALO DE INHIBICION OBTENIDO CON LA CEPA X-97



HALO DE INHIBICION OBTENIDO CON LA CEPA X-1

Tomando en cuenta las observaciones hechas periódicamente se puede acentar lo siguiente:

1.—Habiendo colocado los frascos en la estufa en dos niveles, los de la parte superior presentaron un mejor desarrollo, que los de la parte inferior, debido a que la temperatura en estos últimos fué de 32° C. y en los de la superior de menos 28° C. o sea que a esta temperatura las 3 cepas probadas dieron mejor desarrollo.

2.—La presencia de olor intenso después de dos días de desarrollo. Este olor es característico de todos los Actinomicetos aerobios productores de esperas esféricas.

3.—Estos organismos se desarrollan formando un anillo alrededor de la superficie del medio.

4.—La coloración tomada por el medio de Waksman fué muy variada, en algunos casos presentó un color café obscuro y en otros uno café muy claro. Esto es debido pro-

bablemente, a que los actinomicetos al formar los pigmentos pueden retenerlos en los micelios o bien disolverlos en el medio.

5.—El medio al utilizarse debe ser tyndalizado, para evitar la caramelización de la glucosa. En vías de experiencia, parte del medio se esterilizó a una y media atmósfera, por lo cual tomó un color más oscuro; tratando de ver si aún este medio reunía las características necesarias para el desarrollo, se inoculó como de ordinario, encontrándose que el crecimiento en este caso es muy superior al que se obtiene cuando únicamente se tyndaliza.

B) EXTRACCION.—El contenido de todos los frascos, correspondientes a cada cepa, se filtra a través de un Buchner, con objeto de eliminar todos los sólidos en suspensión.

Se ajusta el pH a ocho y se adsorbe con Norita A al 1%, agitando a la temperatura ambiente durante una hora.

Además de la Norita A se empleó otro carbón activo, la Norita G; no dió ningún resultado satisfactorio, ya que su pH no reúne las condiciones necesarias por ser neutro.

Después de agitar durante una hora, se considera que la adsorción ha sido completa, procediéndose entonces a la filtración.

El adsorbente se lava con un volumen de agua igual a 4 ó 5 veces el peso de la Norita empleada. Algunos autores recomiendan que el lavado se haga con alcohol etílico, empleando un volumen 10 veces mayor que el del peso de la Norita A. El adsorbente se suspende en alcohol metílico ácido, que contenga 0.5 ml. de HCL concentrado por cada 100 ml. de alcohol metílico. La cantidad de alcohol ácido agregado, debe ser igual a la décima parte del volumen adsorbido.

En vez del empleo del metanol ácido, se recomienda el del ácido clorhídrico anhidro en metanol, lo cual facilita grandemente la precipitación ya que en este caso se ha eliminado el agua que es la que hace que el precipitado resultante tenga un aspecto gomoso y muy adherente a las superficies de los recipientes en los cuales se coloca el líquido.

La elución se facilita agitando con energía el adsorbente y el eluyente con un agitador durante una hora; se filtra y lava con pequeños volúmenes de metanol, procediéndose a la concentración, misma que se hace al vacío a una temperatura máxima de 25° C. Antes de principiar la concentración, el extracto que contiene toda la potencia del antibiótico, se neutraliza con NaHCO_3 , hasta un pH de 6.

La concentración se prolonga hasta que el volumen se reduce a un décimo del inicial, una vez en estas condiciones se trata con siete volúmenes de acetona, obteniéndose un precipitado muy fino de color café, el cual se separa por centrifugación. La precipitación con acetona debe ser completa, obteniéndose, algunas veces varias fracciones, ya que entre mayor cantidad de acetona se agrega, mayor es la cantidad de precipitado que se obtiene, aún cuando cada vez más fino y escaso.

Hasta aquí no se ha hecho ninguna distinción respecto a cada una de las cepas, ya que hasta este paso las tres no dieron ninguna divergencia con respecto a los trabajos que sobre estreptomycina efectuó Waksman y sus colaboradores; además es ya perfectamente conocido que la cepa de *S. griseus* es una de las mejores productoras de este antibiótico. Para esta cepa se siguieron las indicaciones de Waksman, purificando la substancia cruda, por el método del picrato, hasta obtener el cloruro correspondiente.

OBSERVACIONES

1.—El carbón empleado como adsorbente, debe ser uno que tenga un pH neutro o ligeramente alcalino, de preferencia el primero ya que este facilitará la adsorción de la estreptomycina o de cualquier otro antibiótico con propiedades básicas.

2.—Los eluyentes deben estar excentos de agua para que tanto la concentración como la precipitación sean más fáciles y efectivas.

C).—PURIFICACION.

CEPA X-7.—El precipitado obtenido con acetona se separó por centrifugación, obteniéndose un producto viscoso de color café que se adhiere firmemente a las paredes de los tubos de centrifuga. Al líquido ya centrifugado se le agregó más acetona, obteniéndose un nuevo precipitado de cristales amarillentos muy finos, los cuales al centrifugarse

formaron una película muy fina en las paredes del tubo de centrifugación y observados al microscopio presentaron el aspecto de finas agujas alargadas.

Haciendo una solución en agua de cada una de estas fracciones se les determinó su actividad, resultando positiva. Considerando que aún cuando el aspecto era distinto, las dos fracciones procedían de la misma cepa y teniendo actividad, no presentaba ninguna ventaja el purificarlas por separado, de ahí que las dos se unieron.

a).—PURIFICACION DEL ANTIBIOTICO X-1 POR EL METODO DEL ACIDO PICRICO.

Se disolvió el concentrado activo en agua destilada y se trató con una solución de ácido Pírico al cuatro por ciento. En el caso en que queden partículas sólidas, se calienta ligeramente. Se deja en reposo durante varias horas a 5° C., al cabo de las cuales en la parte inferior del tubo se han formado unos cristales de color amarillo; estos se separarán por decantación de la solución, disolviéndose en metanol caliente, el cual contiene un exceso de HCl. 2.5 N. Esta solución se vierte en 10 volúmenes de éter, precipitando un polvo blanco cristalino correspondiente al cloruro del antibiótico X-1. Este precipitado se puede disolver en metanol y reprecipitar con éter.

Se secó al vacío y se pesó con objeto de calcular el rendimiento aproximado con respecto a los datos obtenidos en el caso de la estreptomícina. El rendimiento fué de 45%.

OBSERVACIONES

1.—Los concentrados de las dos cepas dan un persistente olor a amoníaco.

2.—Este proceso se repitió dos veces, en la primera el volumen del que se partió fué muy pequeño, por lo cual la cantidad de cristales obtenidos fué muy limitada; estos cristales se secaron perfectamente al vacío y observados al microscopio tienen la forma de agujas alargadas. Siguiendo el mismo método, pero empleando mayor volumen, se obtuvo una mayor cantidad de cristales, altamente higroscópicos, llegando a licuarse casi completamente.

3.—El rendimiento del cloruro del antibiótico X-1 fué de 45%.

CEPA X-97.—Del precipitado con acetona, se tomó una fracción y se disolvió en agua. Se agregó una solución de ácido pícrico, estandarizó a 5° C. durante una hora, no produciéndose ningún precipitado, de ahí que se halla escogido el método de purificación del heliantato.

b).—PURIFICACION POR EL METODO HELIANTATO.—Se disuelve el precipitado en metanol caliente, procurando que la temperatura no exceda de 55° C., se precipita adicionándole una solución de anaranjado de metilo al 10%.

Esta precipitación se puede efectuar con soluciones más diluidas de anaranjado de metilo, pero el volumen requerido para que la precipitación sea completa es muy grande, y el precipitado así obtenido muy fino; esto trae como consecuencia dificultad al centrifugar.

El empleo de soluciones concentradas tiene el inconveniente de que el anaranjado de metilo puede precipitar junto con el heliantato del antibiótico, pero esta desventaja se anula con los lavados posteriores a que se somete el heliantato, este es insoluble en agua, disolviéndose únicamente el colorante.

El precipitado se conserva durante una noche a 10° C. centrifugándose finalmente y el producto cristalino se lava con agua destilada.

La recrystalización se efectúa disolviendo el heliantato en metanol acuoso al 33% y estandarizando a 10° C. Se centrifuga nuevamente y se lava, secándose al vacío con acetona o éter.

CONVERSION DEL HELIANTATO AL CLORURO CORRESPONDIENTE. — El heliantato obtenido, se trata con metanol ácido preparado en la proporción de 1:25 en volumen. La mezcla se agita cuidadosamente adquiriendo el heliantato una coloración intensamente violeta, teniendo además un pH de 4. La agitación se prolonga por 30 minutos después de los cuales se filtra a través de una delgada capa de Darco G-60; esta filtración tiene por objeto eliminar el color, pero en nuestro caso aún después de haber pasado varias veces la solución a través del Darco, conservó un ligero tinte rosado.

El Darco G-60 se lava con pequeñas porciones de metanol, quedando el filtrado en condiciones de ser precipitado; se tomó una pequeña fracción a la cual se agregó acetona, con objeto de ver si ésta era el precipitante adecuado, al no obtenerse precipitación, se tomó otra muestra a la que se agregó éter, obteniéndose un precipitado abundante, de ahí que se halla escogido este último como precipitante.

Se secó y pesó el cloruro del antibiótico X-97, con objeto de calcular el rendimiento, siendo este de 37%.

OBSERVACIONES

1.—El empleo de soluciones concentradas de anaranjado de metilo dá muy buenos resultados.

2.—El pH del antibiótico disuelto en metanol caliente debe ser neutro para obtenerse una buena precipitación, ya que en caso contrario en que el pH sea ácido, el anaranjado de metilo pasa a su forma quinónica, no produciéndose ningún precipitado.

3.—El decolorante empleado debe ser precisamente Darco G-60, pues al experimentar con carbón animal activado, el cual tiene un gran poder decolorante, la solución obtenida carece por completo del antibiótico, es decir que este al mismo tiempo que decolora adsorve el principio activo.

4.—El precipitante adecuado resultó ser el éter.

D) OTROS METODOS DE PURIFICACION.

Además de los dos métodos antes descritos, son de gran importancia los de: Purificación cromatográfica con óxido de aluminio y el de purificación cromatográfica con Darco G-60.

PURIFICACION CROMATOGRAFICA CON OXIDO DE AL.—Este método se lleva a cabo en columnas llenas del adsorbente (Al_2O_3 , en este caso), haciendo fluir el metanol con el solvente a través de dichas columnas, hasta que la capa del disolvente depositada sobre el adsorbente tenga un espesor de 1 ó 2 mm.

La solución del antibiótico se hace fluir a través de la columna por gravedad o bien por presión, siendo esta última de 10 a 20 mm. de Hg.

Una vez que toda la solución se encuentra en la capa adsorbente, se agrega metanol dejándolo fluir por gravedad o por presión. De igual manera se inyecta el eluyente y se van tomando muestras de las fracciones de la parte inferior de la columna a las cuales se les va agregando acetona o éter como precipitante.

La recolección de estas fracciones empieza cuando al agregar los precipitantes, estos indican la presencia del antibiótico.

Las fracciones del eluyente con el antibiótico se concentran hasta un décimo del volumen original, estando listas para precipitarse, secando al precipitado al vacío.

PURIFICACION CROMATOGRAFICA CON DARCO G-60. El método es semejante al anterior, las columnas se llenan con ~~Darco G-60~~ y pulpa de papel o bien papel filtro. El solvente se introduce por presión y cuando la capa formada por el solvente sobre el adsorbente es de 1 a 2 mm., la columna está lista para funcionar.

Cuando toda la solución está en la capa adsorbente, se agrega metanol a presión el cual actuará como disolvente. Los eluyentes que van saliendo de la columna se van analizando hasta que la prueba para la substancia activa sea positiva.

Además de estos métodos la purificación de los principios activos se puede lograr por el método de la sal de Reinecke, del ácido picronólico y del fosfo-tungstato de sodio.

E).—RESUMEN DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS.

1.—Se probaron tres cepas de Actinomicetos antagonicos, aplicándoles el método de extracción empleado para la estreptomicina.

2.—El carácter de los principios de las cepas X-1 y X-97 es básico.

3.—Los mejores crecimientos se obtuvieron cuando el medio empleado, que fué el de Waksman, se esterilizó a 1.5 atmósferas.

4.—El pH más indicado para el medio de cultivo es el de 6.8.

- 5.—La temperatura óptima de desarrollo fué la de 28° C.
- 6.—La presencia de concentraciones altas de glucosa disminuyó considerablemente la actividad del antibiótico.
- 7.—Los principios de las cepas X-1 y X-97 tienen una forma de cristalización semejante a la de la estreptomycina.
- 8.—Los cristales obtenidos de la cepa X-1 resultaron muy higroscópicos.
- 9.—El adsorbente empleado debe ser un carbón neutro.
- 10.—El método de purificación más indicado para la cepa X-1 fué el del ácido picrico, y en cambio el de la cepa X-97 fué el del heliantato.
- 11.—El precipitante específico para el antibiótico de la cepa X-97 fué el éter.
- 12.—En la purificación del antibiótico X-97, el decolorante empleado en el caso del heliantato, debe ser precisamente Darco G-60.

CAPITULO III

DISCUSION Y CONCLUSIONES

DISCUSION

1.—La dificultad que se presenta en la obtención de los principios antibióticos, en el proceso de purificación y concentración, referente a la formación de un precipitado gomoso de color café oscuro, puede eliminarse con el empleo de HCL gaseoso disuelto en metanol, en vez de HCL en solución, ya que el agua contenida en el ácido es la que hace que el precipitado presente esa consistencia.

2.—El precipitado gomoso se adhiere como ya se dijo anteriormente firmemente a las paredes de los recipientes que lo contienen, lo cual trae como consecuencia una disminución considerable en los rendimientos, para evitar en lo posible esta pérdida, considero que la precipitación debe hacerse en un recipiente tarado, secando ahí mismo el precipitado obtenido.

3.—La precipitación del heliantato correspondiente a la cepa X-97 debe hacerse en soluciones que presenten un pH superior a 5. Esto tiene como base el hecho de que a valores de pH superiores 4.4 el anaranjado de metilo se presenta en su forma normal: como puede verse en la fórmula, hay un hidrógeno ácido, el cual puede ser neutralizado por los grupos básicos del antibiótico.

Cuando el pH de las soluciones, es inferior a 4.4, la heliantina sufre una tautomerización y se presenta bajo la forma quinónica.

CONCLUSIONES

1.—Tomando en cuenta que un gran porcentaje de los Actinomicetos aislados del suelo presentan propiedades antagónicas, se trató de obtener substancias antibióticas que fuesen susceptibles de aislarse del medio de cultivo, pues éste ha sido el más grande obstáculo con el que se ha tropezado, ya que muchas especies de Actinomicetos aún cuando presentan antagonismo, no liberan en el medio su principio activo.

2.—La acción antagónica se encuentra sobre todo representada por el género *Streptomyces*, de ahí que se hallan escogidos tres cepas correspondientes a dicho género: *S. griseus*, X-1 y X-97.

3.—El rendimiento o sea el mayor o menos desarrollo de Actinomicetos, está relacionado con el aprovechamiento que dicho organismo hace de la fuente de carbono y de nitrógeno; la eficiencia de aprovechamiento de la fuente de carbono, es mayor en el método de cultivo sumergido, de ahí que se le prefiera al de superficie.

4.—Algunos Actinomicetos son capaces de producir frecuentemente más de un antibiótico lo cual tiende a hacer difícil el reconocimiento de la identidad de cualquier constituyente simple.

5.—Por las características que presentan los dos antibióticos obtenidos, puede decirse que pertenecen al grupo de la estreptomycin, pues como ésta es posible obtenerlos siguiendo los métodos e indicaciones elaborados por Waksman; presentan marcada basicidad, son solubles en los mismos solventes y cristalizan de modo semejante.

CAPITULO IV

BIBLIOGRAFIA

- 1.—BERKMAN, S. HENRY, J. R. y HOUSEWRIGTH, D. R., 1917: Studies on Streptomycin. *J. Bact.*, 53: 567-574.
- 2.—CARTER, H. E., CLARK, Jr., DICKMAN, S. R., LOO, Y. H., 1945: Isolation and purification of streptomycin. *J. Bact. Chem.* 160: 337-342.
- 3.—CARTER, H. E., GOTTLIEB, D., y ANDERSON, H. W., 1948: Chloromycetin and streptothricin. *Science*, 107: 113.
- 4.—~~COCHRANE, V. W., CONN, J. E., 1947: The growth and pigmentation of Actinomyces coelicolor as affected by cultural conditions. *J. Bact.* 54: 213-218.~~
- 5.—De BEER, E. J., SHERWOOD, M. B., 1945: The paper-disc-agar-plate method for the assay of antibiotic substances. *J. Bact.*, 50: 458-467.
- 6.—ENRICH, J., BARTZ, Q. R., SMITH, R. M., JOSLYN, D. A., 1947: Chloromicetyn a new antibiotic from a soil actinomycete. *Sci.* 106: 417.
- 7.—EAGLE, H., MUSSELMAN, A. D., FLEISCHMAN, R., 1948: The action of bacitracin and subtilin in vitro and in vivo on *Treponema palidum*. *J. Bact.* 55: 347.
- 8.—SMITH, R. M., JOSLYN, D. A., 1948: Chloromycetin. Biological studies. *J. Bact.* 55: 425-447.
- 8.—EMERSON, R. L., WHIFFEN, J. A., BOHONOS y DeBEER, 1946: Studies on the production of antibiotics by Actinomycetes and molds. *J. Bact.* 52: 357-366.
- 9.—FOLEY, E. G. L., 1947: Resistencia "in vivo" de el género Bacteriológico a la Estreptomicina. *Sci.*, 106: 423.
J. Bact., 55: 409-417.
- 10.—FRIED y WINTERSTEINER, 1945: Crystalline reinekates of streptomycin and streptothricin. *Science*, 101: 613.

- 11.—GOTTLIEB, D., BHATTACHARYYA, P. K., ANDERSON y CARTER, H. E., 1948: Some properties of an antibiotic obtained from a specie of *Streptomyces*.
- 12.—HORNE, R. E. y POLLARD, A. I., 1948: The identification of streptomycin on paper strip chromatograms. *J. Bact.* 55: 231-234.
- 13.—JOHNSTON, D. B. y WAKSMAN, S. A., 1948: The production of streptomycin by *Streptomyces bikiniensis*. *J. Bact.*, 55: 317-326.
produced by two strains of actinomyces. II Purifica-
- 14.—JUNOWICZ, R. KOCHOLATY v KOCHOLATY, W., 1947: Two antibiotics (lavendulin and actinorubin) tion and Isolation. *Jour. Biol. Chem.* 168: 757-764.
- 15.—~~JUNOWICZ KOCHOLATY, R., KOCHOLATY, W., y KELNER, A., 1947: Sulfactin, a new antibiotic substance produced by a soil actinomyces. *Jour. Biol. Chem.*, 168: 765-769.~~
- 16.—JOSLYN, D. A., GALBRAITH, M., 1947: A turbidimetric method for the assay of antibiotics. *J. Bact.* 54: 26.
- 17.—KELNER, A., MORTON, E. H., 1947: Two antibiotics (lavendulin and actinorubin) produced by actinomyces. *J. Bact.*, 55: 695-704.
- 18.—KUEHL, F. A., PECK, R. L., WALTI, A., FOLKERS, K., 1945: *Streptomyces* antibiotics. I.—Crystalline salts of streptomycin and streptothricin. *Science*, 101: 34-35.
- 19.—KUEHL, F. A., 1946: *Streptomyces* antibiotics. Isolation of streptomycine. *J. Amer. Chem. Soc.* 68: 1460-1462.
- 20.—KUEHL, F. A., 1946: *Streptomyces* antibiotics. Isolation of streptothricine. *J. Amer. Chem. Soc.* 68: 772.
- 21.—LOO, Y. H., SKELL, P. S., y THONRNBERY, H. H., 1945: Assay of streptomycin by the paper disc-plate method. *J. Bact.*, 50: 703-709.
- 22.—REYNOLDS, D. M. WAKSMAN, S. A., 1948: Grisein, an antibiotic produced by certain strains of *Streptomyces griseus*. *J. Bact.* 55: 739-752.
- 23.—SMITH, R. M., JOSLYN, D. A., 1948: Chloromycetin: biological studies. *J. Bact.*, 55: 425-447.

- 24.—SALLE, A. J., JANN, J. G., 1948: Studies on subtilin fastness in vitro. *J. Bact.*, 55: 463.
- 25.—SCHATZ, A., BUGIE, E., WAKSMAN, S. A., 1944: Streptomycin, a substance-exhibiting antibiotic activity against gram positive and gram negative bacteria. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 55: 66-69.
- 26.—SCHATZ, A., WAKSMAN, S. A., 1944: Effect of streptomycin and other antibiotic substances upon *M. tuberculosis* and related organisms. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 57: 244-248.
- 27.—TRUSSEL, P. C., FULTON, C. O., GRANT, G. A., 1947: Two antibiotics produced by a *Streptomyces*. *J. Bact.*, 53: 769-780.
- 28.—VINCENT, J. G., VINCENT, H. W., 1944: Filter paper-disc modification of the Oxford cup penicillin determination. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 55: 162-169.
- 29.—WHIFFEN, J. A., BOHONOS, N., EMERSON, L., 1946: The production of antifungal antibiotic by *Streptomyces griseus*. *J. Bact.*, 52: 610-611.
- 30.—WAKSMAN, S. A., WOODRUFF, H. B., 1940: Bacteriostatic and bactericidal substances produced by a soil actinomyces. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 45: 609-614.
- 31.—WAKSMAN, S. A., WOODRUFF, H. B., 1942: Streptothricin, a new selective bacteriostatic and bactericidal agent, particularly active against gram negative bacteria. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 49: 207-210.
- 32.—WAKSMAN, S. A., REILLY, H. C., y JOHNSTONE, D. E., 1948: Isolation of streptomycin producing strains of *Streptomyces griseus*. *J. Bact.*, 52: 393-398.
- 33.—WAKSMAN, S. A., 1947: Microbial antagonism and antibiotic substances. Third edition. The Commonwealth Fund, New York.
- 34.—WAKSMAN, S. A., 1950: The Actinomycetes. Published by the Chronica. Bot. Co. Waltham, Mass., U. S. A.
- 35.—PENICILLIN.—1945: Brouchure with annotated bibliography. Merk. & Co. manufacturing Chem. Kanway, N. J.