

Jurado Asignado:

Presidente:	Sara Manrique Regil
Vocal:	Oscar Amor Dodero
Secretario:	Guadalupe Vélez Prat
Primer suplente:	Carmen Reyna Bordes
Segundo suplente:	Alicia Negrón Mendoza

Sitio donde se desarrolla el tema: Fermic, S.A. de C.V.

Sustentante: Eugenia Margarita Ramírez Aldrett

Asesor del tema: Q.F.B. Guadalupe Vélez Pratt

286



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 padres

a mi esposo

a mis hijos.

Hago patente mi agradecimiento a Fermic S. A. de C.V. por las facilidades que me brindaron para la elaboración de la parte práctica de esta tesis, a la Profa. Q.F.B. Guadalupe Velez Pratt y al Dr. Eugenio Tisselli, que con su dirección y ayuda moral, hicieron posible la realización de este trabajo.

CAPITULOS:

I.- Introducción:

- A. Antecedentes
- B. Tetraciclinas
- ✓ C. Los Actinomycetos
- D. Selección de microorganismos
para producción industrial.

II.- Parte Experimental:

- A. Material y Equipo
- ✓ B. Medios de cultivo
- C. Técnicas de inoculación
- D. Determinaciones a los cultivos

III. Resultados

IV. Discusión y conclusiones

Resumen

Bibliografía.

Capitulo I.

INTRODUCCION

El propósito de esta tesis es el de contribuir con la revisión de ciertos aspectos bioquímicos y técnicos, al complejo proceso de una industria de fermentación. Esta como todas las industrias bioquímicas, representa una serie de problemas tanto bioquímicos como tecnológicos que es necesario coordinar, basandose en amplios conocimientos en es todos los campos, para lograr los mejores resultados en cada industria.

Esta tesis se ocupa de algunos problemas inherentes a la producción de oxitetraciclina por medio de una cepa de Streptomyces rimosus y su mejoramiento para la producción del antibiótico.

ANTECEDENTES

Definición.- Se denomina antibiótico ⁽¹⁹⁾ (del griego anti = contra y bios = vida) a las sustancias producidas por algunos microorganismos que son capaces de inhibir el crecimiento y desarrollo de otros microorganismos. La palabra antibiótico literalmente significa nocivo a la vida, pero convencionalmente se ha aceptado para designar a dicho grupo de sustancias.

Historia.- Charles Darwin ⁽¹⁹⁾ sentó las bases para la investigación científica del problema de la selección natural y la lucha contra las especies. Las relaciones antagónicas que existen entre microorganismos de diferentes especies, fueron observadas, por primera vez por Luid Pasteur en 1887, quien demostró que las bacterias de la pustula maligna sucumbían rápidamente cuando se encontraban en cultivos mixtos con microbios de la putrefacción, caracterizando a este fenómeno como una lucha por la existencia ⁽¹⁸⁾.

En 1871 e 1872 V. Manassein y A. Polotebnov ⁽¹⁹⁾ explicaron por primera vez las propiedades de un moho del género Penicillium. El primer antibiótico de origen bacteriano, que se utilizó en calidad de remedio antiséptico fué obtenido de las bacterias del género Pyocyanum por R. Emmerich y O. Low quienes la denominaron plocianasa.

⁽¹¹⁾ Alexander Fleming obtuvo el fermento lisozima, que posee

la propiedad de impedir el crecimiento a multitud de microrganismos. Sin embargo, puede decirse, que la era de los antibióticos se inició formalmente en 1918, cuando este mismo autor demostró que el filtrado de un cultivo en caldo del moho Penicillium notatum poseía propiedades antibacterianas con respecto a las bacterias gram positivas. En 1940 (5) E. Chain y G. Florey obtuvieron un preparado relativamente estable de penicilina.

El desarrollo ulterior de este problema estuvo ligado a los trabajos de P. Dubos (6,7) quien obtuvo gramicidina y tirocidina del cultivo de B. brevis; de S. Waksman y sus colaboradores quienes elaboraron el método de obtención de la estreptomicina, y de muchos otros investigadores que han enriquecido la medicina con otros preparados.

Clasificación.- Atendiendo a su origen los antibióticos se pueden clasificar en:

- a) Antibióticos de origen animal.
- b) Antibióticos de origen vegetal.
- c) Antibióticos de origen sintético ó semisintético.

Otros autores los caracterizan de acuerdo a los tipos de seres de los cuales son antagonicos y así se tiene:

- a) Antibióticos antibactericos.
- b) Antibióticos antifungicos.
- c) Antibióticos antivirales.

Otra clasificación los refiere al campo de acción de los

mismos, considerándose por lo tanto como:

- a) Antibióticos de amplio espectro.
- b) Antibióticos de espectro reducido.

En las tablas 1 y 2 se encuentran ejemplos de cada uno de ellos.

Espectro antimicrobiano.- La actividad antimicrobiana varía cualitativa y cuantitativamente. El rango de actividad de un antibiótico dado, se designa como su "espectro antimicrobiano". En determinadas condiciones tipo y con un microorganismo testigo, dicho espectro es característico para cada antibiótico. También es variable el grado de actividad del antibiótico, con respecto de las diferentes especies de microorganismos y aún de cepas.

Algunos antibióticos poseen espectro reducido, la Isoniazida es activa sobre M. smegmatis y otras mycobacterias. Otros antibióticos poseen amplio espectro, las tetraciclinas son activas no sólo sobre bacterias gram positivas y gram negativas, sino también sobre rickettsias y algunos protozoarios.

CARACTERISTICAS QUE DEBE REUNIR UN ANTIBIOTICO
PARA QUE SEA APLICABLE EN MEDICINA. (19)

- a) Ser relativamente no tóxico.
- b) No precipitar las proteínas séricas.
- c) No causar hemólisis.
- d) No provocar efectos adversos sobre los fagocitos.
- e) Estar libre de pirógenos.
- f) No causar respuesta como la histamina.
- g) Ser tolerada por el individuo a la dosis requerida.
- h) Provocar el mínimo de efectos secundarios.

TETRACICLINAS.

Generalidades.- Las tetraciclinas comprenden a una familia de compuestos biosintéticos, y a sus derivados semi-sintéticos que poseen un amplio espectro antimicrobiano -- que incluye bacterias gram positivas y gram negativas, rickettsias, algunos virus, ciertos protozoarios y actinomicetos. Se ha reportado que la oxitetraciclina ataca también algunos helmintos y es favorable en el tratamiento de algunas fases de la malaria (20). Esto no implica que todos los miembros de la familia de las tetraciclinas posean la misma actividad sobre todas las especies y todas las clases de organismos mencionados.

La primera en ser descubierta fue la clortetraciclina, más propiamente llamada 7-clortetraciclina ⁽⁸⁾ (Aureomicina, Lederle), fue reportada en 1948, año siguiente al descubrimiento del cloranfenicol. Este 7-cloranfenicol, fue el segundo antibiótico de amplio espectro conocido. Este ⁽¹⁰⁾ fue seguido del descubrimiento de la oxitetraciclina dos años más tarde, más propiamente llamada 5-oxitetraciclina (Terramicina, Pfizer) y ésta fue seguida por la tetraciclina base en 1953. Cuatro años más tarde (1957) la Demetilclortetraciclina, más propiamente llamada 6-demetil 7-clortetraciclina (Declomicin, Lederle). Estas cuatro tetraciclinas son biosintéticas y pueden ser extraídas por medios apropiados, fermentados por cepas especiales de es-

treptomicetos.

Subsecuentemente se han obtenido derivados semisintéticos de los cuales no se sabe que puedan ser elaborados por microorganismos. Algunos de estos derivados semisintéticos son: N-(pirrolidinometil)tetraciclina, conocida como Rolite tetraciclina; tetraciclina-L-metilen glicina, conocida como Limeciclina; la 6-metilen-5-hidroxitetraciclina, a la que se ha nombrado Metaciclina (Rondomicina-Pfizer).

Actualmente el termino genérico de Tetraciclinas agrupa a siete antibióticos que son: clortetraciclina, oxitetraciclina, tetraciclina, demetilclortetraciclina y rolitetraciclina, recientemente a la metaciclina y a la metilenciclina. Los tres últimos compuestos son derivados semisintéticos y no se sabe hasta la fecha que puedan ser producidos por microorganismos. Los cuatro primeros pueden ser obtenidos mediante microorganismos apropiados en medios específicos. La tetraciclina y la demetilclortetraciclina también pueden ser obtenidas en forma semisintética a partir de clortetraciclina.

Biosíntesis del núcleo tetraciclina.- Se ha comprobado que el ácido acético, el ácido propiónico y sus derivados son frecuentemente utilizados como unidades en la biosíntesis de productos orgánicos por lo que no es sorprendente encontrar antibióticos que deriven de ellos.

Las Tetraciclinas que poseen como esqueleto común el hidronaftaceno se ha comprobado que se forman mediante la

union de unidades acetato.

Características químicas.- Todas las tetraciclinas son sales cristalinas y anfotéricas , las cuales poseen tres grupos ionizables con un pK_a entre 3.3 y 9.7. Todos los miembros de la familia tienen color amarillo debido a su grupo cromofórico común que absorbe en la región visible.

Los distintos sustituyentes específicos son los que les proporcionan características diferentes de estabilidad y solubilidad. Las sales de ácidos son generalmente más estables que las formadas con bases, de ahí que sean los clorhidratos los que tienen mayor aplicación.

CLASIFICACION DE LOS ANTIBIOTICOS POR SU ORIGEN (18)

Tablas 1 y 2

Antibióticos de origen animal	Ecmolina	
	Eritrina	
	Interferon	
	Lisozima	
	Plaquina	
	Otros.	
	De plantas superiores	Allicina Imanina Rafanina Otros
	De hongos	Penicillina y semejantes
Antibióticos de origen vegetal		Albomicina
		Cloromicetina
		Clortetraciclina
		Eritromicina
	De Actinomicetos	Oxitetraciclina
		Estreptomicina
		Neomicina
		Nistatina
		Tetraciclina
		Otros
	De bacterias	Bacitracina Gramicidina Polimixinas A y B Tirotricina, otras.
Antibióticos de origen sintético y semisintético.	Levomicetina	
	Meticiclina	
	Pembritin	
	Sanasina	
	Sintomicina	
	7-Bromo Tetraciclina	
	6-Demetil Tetraciclina	
	Otros.	

C.- LOS ACTINOMICETOS.

Los Actinomicetos taxonómicamente se encuentran como un grupo separado situado entre las bacterias verdaderas y los hongos verdaderos, debido a que presentan características - en común con ambos. El género *Nocardia* está estrechamente relacionado con *Mycobacteria* y *Corynebacteria*. Otros géneros *Streptomyces* y *Micromonospora* se relacionan más con los hongos.

Son atacados por fagos como las bacterias, estos no atacan a los hongos. Los actinomicetos son sensibles a los antibióticos a los que son sensibles las bacterias y no a los que son sensibles los hongos. Difieren también de los hongos en que no poseen quitina o celulosa en su micelio o en sus esporas como estos lo presentan.

Características generales.-Se definen como microorganismos unicelulares filamentosos, que se caracterizan por la forma del micelio unicelular ramificado. Sus hifas son largas y de 0.5 a 0.8 μ de diámetro. No poseen un núcleo verdadero como la mayoría de las bacterias, si no que la cromatina se encuentra en forma de granulos dispersos en la hifa.

Todos los actinomicetos principalmente en cultivos jóvenes son gram positivos.

El micelio se desarrolla tanto en el sustrato como en la superficie como micelio aéreo; éste puede ser: blanco, gris, rojo, amarillo, café, verde o con otro tipo de pig-

mento. Algunos cultivos presentan pigmentos solubles que varían en intensidad y color de acuerdo al medio de cultivo empleado.

En medios líquidos estacionarios no produce nunca turbidez; crecen en la superficie ^{de} en forma de hojuelas sobrenadantes, o bien como pequeñas motas adheridas a las paredes del matraz en que se cultivan.

La conidia reproductiva característica del género Streptomyces se producen por división del protoplasma en la hifa esporógena, progresando de la cima a la base. Las esporas son más resistentes que el micelio vegetativo y nos recuerdan a las bacterias en talla, forma y características de tinción, su forma es oval o redonda y miden entre 0.5 a 1.5 μ de diámetro y de 1 a 2 μ de largo.

Las colonias de Actinomycetos se pueden distinguir de las colonias de hongos por su aspecto compacto, flexibles y con apariencia cónica. Su superficie es seca y cubierta de micelio aéreo.

Todas las especies de Actinomycetos licuan la gelatina con mayor o menor rapidez dependiendo del organismo empleado. Algunos producen enzimas diastásicas, otras producen invertasa o tirosina.

ORGANISMOS PRODUCTORES DE TETRACICLINAS.

<u>Micrororganismo</u>	<u>Antibiótico que produce.</u>
<u>Streptomyces aureofaciens</u>	Clortetraciclina.
<u>Streptomyces rimosus</u>	Oxitetraciclina.

Streptomyces viridifaciens . Tetraciclina.

Streptomyces viridifaciens var. Demetilclortetraciclina.

CLASIFICACION DE ACTINOMYCETALES (28)

(WAKSMAN Y HENRICI 1943)

I Micelio rudimentario ausente. Familia MYCOBACTERIACEAE

Género Mycobacterium

II Micelio verdadero:

A. Micelio vegetativo dividido en segmentos dentro de elementos bacilares ó cocoides.

Familia ACTINOMYCETACEAE

a.- Anaerobios o microaerofilicos no ácido resistentes. Género Actinomyces.

b.- Anaerobios parcialmente ácido resistentes o no ácido resistentes. Género Nocardia.

B. Micelio vegetativo normalmente no dividido en artrosporas. La conidia se produce en el propio medio. Familia STREPTOMYCETACEAE.

a.- La conidia se encuentra en cadenas de hifas aéreas. Género Streptomyces.

b.- La conidia se encuentra terminalmente sólo o en conidióforos, no en cadenas.

Género Micromonospora.

DISTRIBUCION, AISLAMIENTO Y METODOS DE
ESTUDIO DE LOS ACTINOMICETOS.

Distribución.- Los Actinomicetos se encuentran abundantemente en sustratos naturales, como suelos; charcos de agua fresca; alimentos en descomposición y en la atmósfera. Los suelos alcalinos o neutros los tienen en mayor abundancia que los suelos ácidos.

Se ha observado que tiene gran influencia la vegetación del lugar y la época del año en que se colectan las muestras encontrándose que son más abundantes en los meses de marzo y abril, decreciendo para diciembre y enero.

Factores que regulan la cantidad de Actinomicetos en
el suelo.

- 1.- Abundancia de materia orgánica.
- 2.- Reacción del suelo (ácida o alcalina).
- 3.- Humedad relativa.
- 4.- Temperatura.
- 5.- Aireación o suministro de oxígeno.
- 6.- Vegetación del lugar.

Aislamiento.- Se aíslan del suelo mediante diluciones de éste sobre medios de agar nutritivo y se incuban a la temperatura apropiada para el desarrollo de bacterias (28° a 37°C) durante dos a siete días. Los organismos antagonísticos se reconocen por que producen una zona de inhibición del crecimiento, estos organismos se aíslan con el objeto

de obtener un cultivo puro de ellos y poder continuar con la investigación.

Otro método se efectúa inoculando directamente la muestra de tierra sobre placas de agar nutritivo que ya han sido inoculadas previamente con el microorganismo del cuál queremos encontrar un antagonico, se incuban en las mismas condiciones que en el método antes citado y por igual periodo de tiempo al término del cuál se observa cuál ó cuales son las colonias que han presentado una zona de inhibición y se aislan en cultivos puros para continuar con su estudio.

Frecuentemente se trata de encontrar otra cepa de la misma especie que produzca un antibiótico ya conocido para lo cual se sigue el siguiente procedimiento: sobre medios apropiados(Czapeck) se inoculan diluciones de suelo de una concentración de 1×10^{-1} , a 1×10^{-6} y se incuban de 5 a 10 días a una temperatura de 24 - 26°C al cabo de los cuales se escojen las colonias que morfológicamente se asemejan más a la cepa buscada. Las colonias seleccionadas se someten a nuevas resiembras hasta obtener una concentración por placa de 2 a 4 colonias; cuando ya se han identificado plenamente, se someten a pruebas de producción.

MÉTODOS DE ESTUDIO

Selección.- Debe considerarse bajo dos puntos de vista, la selección de un microorganismo para llevar a cabo un pro-

ceso conocido o la selección de un microorganismo para efectuar un proceso desconocido aún. En el primer caso se aconseja recurrir a las colecciones de cultivos existentes en el comercio y en el segundo, efectuar una serie de pruebas de un grupo amplio de microorganismos debidamente aislados.

ETAPAS EN EL AISLAMIENTO DE
UN NUEVO ANTIBIOTICO

Aislamiento del suelo.

A. Aislamiento

Desarrollo de los métodos de cultivo del microorganismo.

Probar propiedades antimicrobianas.

Observar el crecimiento en medio líquido. Probar filtrado.

B. Detección y selección

Extracción y purificación del Antibiótico.

Identificación de la sustancia aislada.

C. Evaluación del producto.

Estudio de su actividad y toxicidad en animales.

Su Aplicación en clínica.

D. Pruebas al antibiótico
purificado.

Potencia.
Esterilidad.
Pirogenicidad.
Histamina.
Humedad.
pH.
Estabilidad.
Cristalinidad.
Toxicidad.

E. Posteriormente se efectúan los estudios farmacológicos.

SELECCION DE MICROORGANISMOS PARA PRODUCCION
INDUSTRIAL.

MEJORAMIENTO DE LA CEPA.

Cuando ha sido debidamente aislado un microorganismo -- productor de antibiótico y se quiere que esa producción sea económicamente costeable para llevarse a escala industrial, es necesario someter a la Cepa a diversos procedimientos, con el objeto de provocar en ella cambios genéticos tales, que se traduzcan en una mayor capacidad productora para que justifiquen la inversión económica que se hará en esa industria.

Por selección directa.- Se ha observado que la mutación espontánea se presenta alrededor de una por cada 10^6 ó 10^8 células. Con el objeto de detectar estas mutantes se siguen métodos simples que es a los que llamamos "selección directa", esto se hace mediante siembras en placa de los cultivos puros, con objeto de obtener colonias aisladas las cuáles se prueban con respecto a productividad, escogiendo a las más capaces y continuando con ellas el proceso de selección.

Por selección de mutantes. Se define a la mutación como un cambio brusco y estable de un gene que se expresa en algún caracter fenotípico, frecuentemente como una modificación bioquímica.

El DNA, material genético primario, esta constituido -

por dos cadenas polinucleótidas largas, plegadas como una helice y que mantienen una configuración estable por apareamientos de bases mediante puentes de hidrógeno entre las dos helices, quedando una frente a otra. Algunas mutaciones pueden ser causadas por la inserción de un nuevo par de bases, supresión de uno ó más pares de bases, colocación diferente de las bases ó cambios químicos en ellas mismas.

Aunque los mecanismos que provocan estos cambios, son poco conocidos, se sabe que agentes como los rayos X y -- las radiaciones gamma pueden romper las uniones fosfoéster individuales, por acción de radicales libres como H^+ y OH^- que se producen cuando la radiación es absorbida por agua. Otros sitios de acción incluyen también la ruptura mediante radiaciones ionizantes de la unión del puente de hidrógeno.

Los agentes alquilantes como las mostazas nitrogenadas $RN(CH_2-CH_2-Cl)_2$ y las mostazas sulfuradas $S(CH_2-CH_2)_2$, provocan la mutación atacando a los átomos de nitrógeno de -- las bases, interalquilando bases alineadas y por tanto impidiendo la la separación de la estructura de doble hélice del DNA durante la replicación. Otro agente mutágeno es el ácido nitroso que transforma a la citosina en uracilo en el DNA y el 5-bromo uracilo que reemplaza a la base normal timina y da lugar a errores en la replicación ulterior del DNA.

El hongo del pan, Neurospora crasa, ha proporcionado material excelente para el estudio de la genética bioquímica. Las especies silvestres del hongo, crecen bien en medios de cultivo simples conteniendo compuestos de azúcar sales y biotina. Cuando exponemos estos cultivos a agentes mutagénicos encontramos mutantes que sólo crecen añadiendo al medio original ciertos metabolitos.

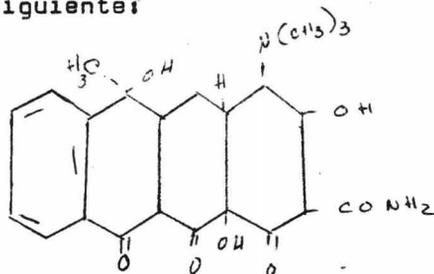
Aplicación de las técnicas anteriores para obtener mutantes de Streptomyces.- Es bien sabido que Streptomyces aureofaciens es un organismo productor de Tetraciclina y Clortetraciclina. La concentración de uno u otro antibiótico depende de la presencia del ión cloro. Por lo tanto la obtención de Clortetraciclina no presenta mayor problema pero cuando el producto deseado es la Tetraciclina, nos encontramos con el problema que es prácticamente imposible la ausencia del cloro el cual siempre se encuentra presente, lo que provoca que la Tetraciclina obtenida tenga rastros de Clortetraciclina. Aunque las especificaciones tipo para el producto terminado permiten una pequeña cantidad de Clortetraciclina como impureza en la Tetraciclina, esto no es deseable por que ocasiona problemas en la extracción y purificación.

Haciendo experimentos con Streptomyces aureofaciens, sometiénolo a agentes mutágenos que incluyen radiaciones ultravioleta, nicotina y mostazas nitrogenadas, se obtuvieron unas mutantes que son descendientes directos de Strept-

Streptomyces aureofaciens A-377, aislado del suelo⁽²⁴⁾. Estas mutantes tienen la capacidad de ignorar la existencia del ión cloro y han sido designadas por la American Type Culture Collection con los siguientes números: 13,908; 13,909; 13,910; 13,911.

Dichas mutantes tienen las mismas características que Streptomyces aureofaciens pero difieren en la pigmentación que imparten al medio.

Otros estudios sobre la misma cepa de Streptomyces aureofaciens 377 y tratándose con los mismos agentes mutagénicos del ejemplo anterior han llegado a una mutante que produce un nuevo tipo de Tetraciclina, cuya fórmula estructural es la siguiente:



Esta nueva cepa ha sido designada como la S-1308; esta mutante mantiene las características de la que le dio origen, pero difiere en la pigmentación que imparte al medio.

3.- Medios para mantenimiento.- Tienen por objeto disminuir al mínimo la variación y degeneración de la cepa.

MEDIOS PARA PRODUCCION.

Fuentes de carbono.- Industrialmente los más usados son glucosa y sacarosa, pero puede usarse glicerol o almidón. Se ha observado que la producción del Antibiótico disminuye cuando se utilizan oligosacáridos o polisacáridos como única fuente del elemento, en cambio aumenta cuando se utilizan en combinación con con monosacáridos.

Fuentes de nitrógeno.-En general requieren fuentes complejas de nitrógeno, como aminoácidos, harina de soya, harina de semilla de algodón, ó sales inorgánicas de amonio como sulfatos, hidróxidos, fosfatos, nitratos cloruros, aunque es indeseable el cambio en el pH que provocan estas sales. También es usada la urea y el agua de cocimiento de maíz, que es un subproducto en la elaboración de la glucosa y el almidón de maíz, el cual también es rico en fosfatos.

Otros elementos.-Hay que agregar al medio cierta cantidad de calcio ó magnesio por que el antibiótico produce efectos tóxico sobre el organismo productor, inhibiendo la formación del mismo; este efecto se atribuye al secuestro de iones metálicos esenciales, por parte del antibiótico. La adición de calcio ó magnesio satura el poder secuestran-

te y deja las trazas metálicas libres para llevar a efecto su función, además dichas sales también ayudan a regular el pH del medio.

También, el cultivo requiere un mínimo de los siguientes elementos: Mn, Zn, Fe, Cu y Co.

Es recomendable la adición de algún aceite que a la vez que actúa como nutriente ejerce un efecto antiespumante. Pueden ser aceites vegetales como: aceite de cacahuete, aceite de maíz, aceite de cártamo, aceite de soya, etc.

CARACTERIZACION

Es necesario un conocimiento a fondo de la cepa para su caracterización.

Entre los caracteres que deben de tomarse en cuenta para cumplir dicho objetivo se encuentran los siguientes:

- a) La pigmentación del medio de crecimiento.
- b) La capacidad para hidrolizar proteínas o almidones.
- c) La inversión de azúcares.
- d) La digestión de la celulosa.
- e) La formación de antibióticos específicos.
- f) Y otras características suplementarias como son las siguientes: reducción de nitratos, utilización de grasas, parafina ó fenol, y la sensibilidad del microorganismo hacia determinado fago.

CARACTERISTICAS DE LA CEPA.

Streptomyces rimosus tiene las siguientes características.

- a) Micelio aereo escaso.
- b) El micelio aereo sin ser totalmente de color blanco tiende a él.
- c) Cuando el crecimiento es vigoroso las colonias se fragmentan, al principio circunferencialmente y después en pequeñas piezas aisladas unas de otras,
- d) No crecen en agar sintético.

PRESERVACION DEL MICROORGANISMO

Con el gran incremento de la Microbiología Industrial y la formación de grandes colecciones de cepas, ha sido necesario conservar a los microorganismos por periodos de tiempo más o menos largos, para lo cual se han desarrollado varios métodos.

Una de las técnicas más simples de conservación, es por medio de subcultivos, los cuales causan variación de la cepa por lo que se han tenido que elaborar métodos más eficientes como los que se describen a continuación:

- 1.- En tubos inclinados o algún otro tipo de cultivo mantenido en refrigeración.
- 2.- Los organismos, ó sus esporas, se suspenden en fluidos como leche descremada o suero y se someten a el proceso de liofilización, que consiste

en un enfriamiento rápido seguido de una deshidratación mediante vacío. Las ampollitas que -- contienen el liofilizado, se conservan en atmósfera inerte de nitrógeno, de preferencia bajo refrigeración (14).

- 3.- Muestras de tierra previamente esterilizadas se inoculan con el cultivo que se quiere conservar, se incuban a temperatura apropiada durante dos o tres semanas para propiciar el desarrollo, al cabo de los cuales las muestras se conservan en ambiente seco bajo refrigeración (29).
- 4.- Los tubos inclinados se cubren con una capa de parafina estéril y se guardan bajo refrigeración.

CONDICIONES PARA LOS CULTIVOS

DE ACTINOMICETOS.

Los cultivos de Actinomicetos, muestran un marcado polimorfismo derivado de las características del medio de cultivo y las condiciones ambientales que favorezcan dicha variación. Esta se presenta en la talla, forma y color de las colonias, así como de las esporas, formación de pigmento soluble y características bioquímicas tales como: utilización de carbono; formación de ácido sulfhídrico y producción de enzimas o antibióticos.

Los cultivos degenerados muestran considerable variación en su afinidad tintórea.

Causas de variación:

- 1.-Composición química del medio.
- 2.-Estado físico (líquido-sólido, diluido -concentrado, cultivo continuo ó intermitente).
- 3.-Medio ambiente: temperatura, humedad, aireación.
- 4.-Naturaleza del inóculo.
- 5.-Presencia de contaminantes, especialmente organismos con efecto antagónico ó asociativo.
- 6.-Fenómeno lítico, incluyendo efectos del fago.

El grado de esporulación, el color de las esporas, la forma y superficie de las colonias, la presencia de exuda

do, la cantidad y color de pigmento soluble son las características más variables.

CONDICIONES DEL CULTIVO

Aireación y agitación.- Como son altamente aerobios, - la producción del antibiótico aumenta en relación directa a la agitación hasta un punto óptimo característico para cada especie.

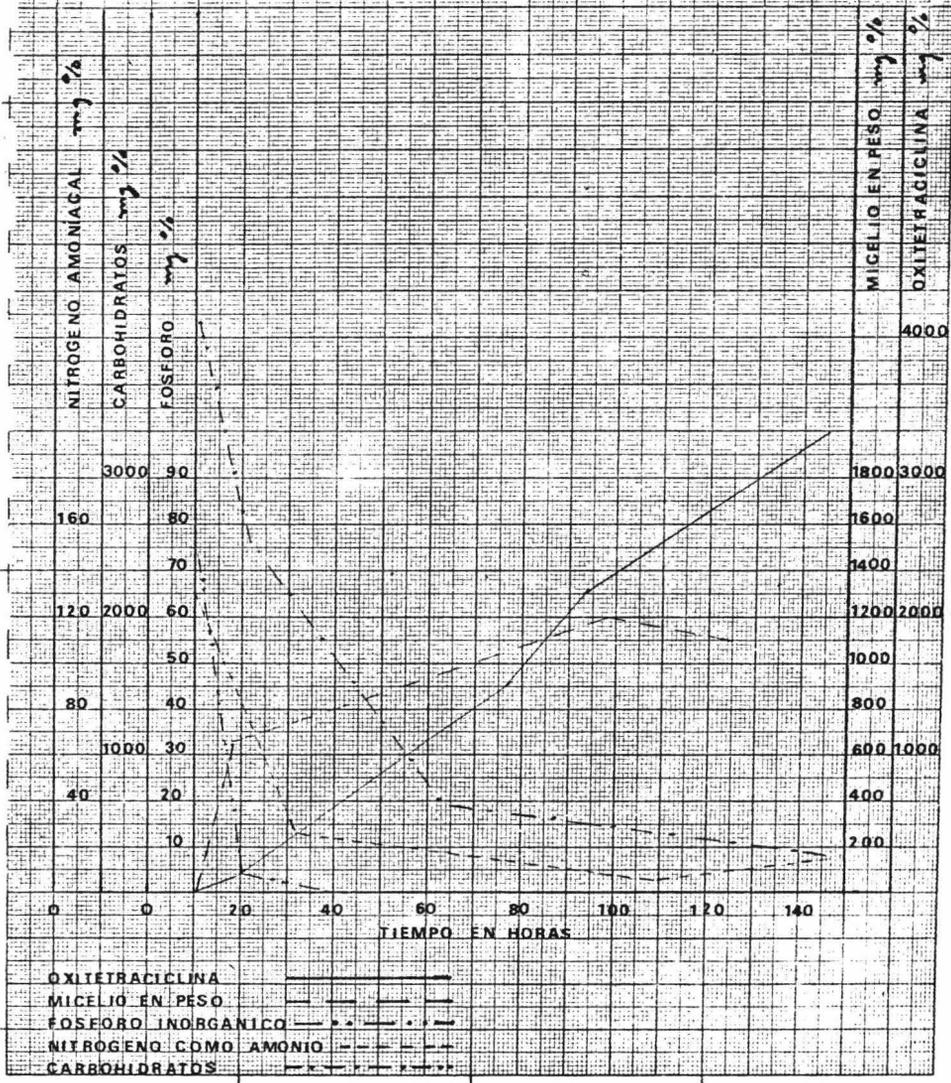
Temperatura.- Se considera que 28°C es la temperatura óptima para la producción. Pero puede considerarse entre - 24° y 31°C de acuerdo con la cepa usada.

pH.- La producción del antibiótico es mayor entre 7 y 8. Se acostumbra agregar al medio carbonato de Calcio o Magnesio como reguladores del pH, pero tienen el inconveniente de que dificultan la extracción y purificación del producto.

Medio de cultivo.- Los medios de crecimiento usados para la mayoría de los Actinomycetos comprenden varias categorías:

- 1.- Medios usados para la identificación y caracterización de especies. Son medios de composición tipo.
- 2.- Medios para obtener el máximo rendimiento en la producción de sustancias químicas. Tienen composición química compleja, utilizando derivados de vegetales (agua de cocimiento de maíz) y animales (caseína, extracto de carne, etc.).

CAMBIOS BIOQUIMICOS EFECTUADOS EN EL
CURSO DE LA PRODUCCION DE OXITETRACICLINA
POR STREPTOMYCES RIMOSUS LS - I - 118
(Tabla 2)



Cápítulo II.

PARTE EXPERIMENTAL.

A. MATERIAL Y EQUIPO.

Cepa productora.- Se eligió Streptomyces rimosus de la American Type Culture Collection, catalogado bajo el número 10,970. Es un microorganismo productor de Oxitetraciclina.

Equipo empleado.- Todo el material común en un laboratorio de microbiología para las determinaciones que se describen.

B. MEDIOS DE CULTIVO.

Los medios de cultivo empleados para este estudio, fueron tomados algunos directamente de la literatura, y otros fueron ideados especialmente, teniendo en cuenta las necesidades del género Streptomyces.

Por lo que se tienen cuatro series distintas de medios:

A. Medios líquidos: a) Para desarrollo. D₃

b) Para fermentación. F₂

B. Medios sólidos: a) Para esporulación. E₃

b) Para mantenimiento.

Todos ellos se prepararon usando agua destilada, el pH se ajustó entre 6.5 y 7.2 que son los límites recomendables. Todos se esterilizaron bajo las mismas condiciones: 121° durante 15 minutos.

Una vez preparados se procedió a esterilizarlos inmediatamente para no dar lugar al desarrollo de las bacterias

propias de los nutrientes usados.

Los medios una vez estériles, se conservan a temperatura ambiente por no más de siete días, al cabo de los cuales el medio puede considerarse envejecido por la pérdida de agua sufrida por evaporación, por lo que ya no corresponden a la fórmula original del medio. Cuando los medios se conservan bajo refrigeración el límite de envejecimiento puede prolongarse hasta dos semanas máximo.

Los medios estériles empleados para aislar las colonias en caja petri, se preparan y esterilizan en matraces de 500 ml con 300 ml de medio y una vez estériles se reparten en las cajas estériles también, aproximadamente 30 ml por caja. Las cajas se usan después de 24h de vaciado el medio y no más de 72 h después.

Antes de emplear cualquiera de los medios anteriores es necesario revisarlos con el objeto de descubrir alguna contaminación de los mismos.

MEDIOS DE CULTIVO ✓

Para desarrollo:

Los medios empleados para desarrollo se preparan siempre bajo la misma técnica; se disuelven todas las materias primas indicadas en la fórmula, una a una, y finalmente se ajusta el pH a 7.3 con NaOH 5N; si éste ya se encuentra inicialmente al valor deseado, se omite este paso. Una vez preparado el medio se coloca sobre un agitador magnético y se distribuye en matraces de 125 ml, colocando 25 ml por matraz.

Medio D₁

Sacarosa	30 g.
NaNO ₃	3 g.
KH ₂ PO ₄	1 g.
MgSO ₄	0.5 g.
FeSO ₄	0.01 g.
Agua destilada c.b.p.	1 l.

Medio D₂

Peptona	4 g.
Gelysate	4 g.
NaCl	2.5 g.
Extracto de levadura	1 g.
Glucosa	10 g.
Agua destilada c.b.p.	1 l.

Medio D₃

Agua de cocimiento de maíz	20 g.
Sacarosa	10 g.
CaCO ₃	3.5 g.
(NH ₄) ₂ SO ₄	1 g.
Agua destilada c.b.p.	1 litro.

Medio D₄

Lactosa	20 g.
Glucosa	1.2 g.
Agua de cocimiento de maíz	40 g.
NaNO ₃	3 g.
KH ₂ PO ₄	0.5 g.
MgSO ₄ .7H ₂ O	0.25 g.
Agua destilada c.b.p.	1 litro.

PARA ESPORULACION.

Medio E₁

Extracto de levadura	1 g.
Extracto de carne	1 g.
Triptosa	2 g.
FeSO ₄ .7H ₂ O	0.1 ppm
Agar	20 g.
Agua destilada c.b.p.	1 litro.

Se disuelven todas las materias primas y se ajusta el pH a 7.2 con NaOH 5N. Se calienta hasta disolver el agar - y se agregan 10 g de glucosa. Se esteriliza a 121°C X 15'

Se reparte en tubos de cultivo (25 X 200 mm), aproximadamente 15 ml por tubo y en matraces erlenmayer de 500 - ml con 300 ml de medio por matraz.

Medio E₂

Sacarosa	3 g.
Dextrina	15 g.
Cistina	0.1 g.
NaCl	0.5 g.
KH ₂ PO ₄	0.5 g.
Extracto de levadura	1 g.
Peptona	5 g.
FeSO ₄ .7H ₂ O	0.010 g.
Agar	20 g.
Agua destilada c.b.p.	1 litro

Se disuelven todas las materias primas y se calientan para disolver el agar. Se reparten en matraces de 500 ml colocando 300 ml por matraz. Una vez estéril se reparte en cajas petri estériles también, aproximadamente 30 ml por caja. La esterilización se efectua en autoclave 121° X 15'

Medio E₃

Extracto de carne	4 g.
-------------------	------

Gelysate	4 g.
NaCl	2.5 g.
Extracto de levadura	1 g.
Glucosa	10 g.
Agar	20 g.
Agua destilada c.b.p. 1 litro	

Se prepara igual que el medio E₂.

Medio E₄ (Bacto-Czapek)

Sacarosa	10 g.
NaNO ₃	4 g.
KH ₂ PO ₄	1 g.
MgSO ₄	0.5 g.
KCl	0.5 g.
FeSO ₄	0.01 g.

Para rehidratar el medio se suspenden 49 g de Bacto-Czapek "Difco" en 1000 ml de agua destilada, se calienta hasta disolución completa; se distribuye de la misma manera que los medios antes citados y se esteriliza a 121° X 15 minutos.

Medio E₅

Glucosa	10 g.
(NH ₄) ₂ HPO ₄	4 g.
NaCl	5 g.
KH ₂ PO ₄	5 g.
MgSO ₄ ·7H ₂ O	1 g.

CaCl ₂	0.04 g.
FeSO ₄ .7H ₂ O	0.02 g.
MnSO ₄ .7H ₂ O	0.01 g.
Agar	15 g.
Agua destilada c.b.p.	1 litro

Se calienta hasta disolver el agar, se reparte y esteriliza igual que los medios anteriores.

Medio E₆

Sacarosa	3 g.
Dextrina	15 g.
Glicina	0.1 g.
NaCl	0.5 g.
KH ₂ PO ₄	0.5 g.
Extracto de levadura	1 g.
Peptona	15 g.
Agar	20 g.
Agua destilada c.b.p.	1 litro

PARA FERMENTACION

Todos los medios para fermentación se preparan de la misma manera: se disuelven todas las materias primas y se ajusta a pH 6.5 con NaOH 5N, posteriormente se reparten en matraces erlenmayer de 500 ml con 40 ml de medio fermentativo por matraz. La esterilización se efectua en autoclave a 121° durante 15 minutos.

Medio F₁

Harina de maíz	65 g.
Agua de cocimiento de maíz	10 g.
(NH ₄) ₂ SO ₄	3 g.
CaCO ₃	1 g.
ZnSO ₄	0.02 g.
MnSO ₄	0.2 g.
Agua destilada c.b.p. 1 litro.	

Medio F₂

Harina de maíz	60 g.
Harina de soya	10 g.
(NH ₄) ₂ SO ₄	3 g.
CaCO ₃	1 g.
Agua destilada c.b.p. 1 litro	

Medio F₃

Harina de maíz	80 g.
Caseina	15 g.
(NH ₄) ₂ SO ₄	3 g.
CaCO ₃	1 g.
Agua destilada c.b.p. 1 litro	

Medio F₄

Harina de maíz	80 g.
(NH ₄) ₂ SO ₄	3 g.
CaCO ₃	1 g.
ZnSO ₄	0.02 g.
MnSO ₄	0.2 g.
Agua destilada c.b.p. 1 litro	

Medio F₅

Almidón de maíz	150 g.
Gluten	30 g.
Dextrina	30 g.
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	18 g.
CaCO_3	27 g.
$\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.15 g.
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.15 g.
$\text{CoSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.6 g.
Agua de cocimiento de maíz	24 g.
Cacahuete molido	9 g.
Agua destilada c.b.p.	1 litro

Medio F₆

Sacarosa	30 g.
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	3 g.
CaCO_3	6 g.
Cacahuete molido	20 g.
Agua de cocimiento de maíz	3 g.
Agua destilada c.b.p.	1 litro

Nota.- A todos los medios se les agregó después de esterilizados 0.3 ml de aceite de cacahuete estéril, como anti-espumante.

C.- TECNICAS DE INOCULACION

El liofilizado que contiene las esporas de la cepa - Streptomyces rimosus 10,970 ATCC, se suspenden con 5 ml de agua destilada estéril; con 1 ml se hacen las siguientes - inoculaciones:

- a) A tubos inclinados conteniendo el medio E₁, a razón de 0.1 ml por tubo. Se conservan a 28°C hasta completar su esporulación. Se cosechan con 6 ml de agua estéril y se conservan.
- b) La suspensión de esporas del liofilizado se diluye a 10⁻¹, 10⁻², 10⁻³, 10⁻⁴, y se inoculan 0.1 ml de cada una de estas a cada una de cinco cajas petri conteniendo el medio E₁. El inóculo se distribuye uniformemente con el objeto de obtener colonias aisladas. Las cajas se conservan a 28°C hasta completar su esporulación (8 a 10 días). Al cabo de los cuales las colonias obtenidas se observan en cuanto a sus características morfológicas.

Desarrollo :

Para observar el crecimiento de la cepa en medios líquidos, se inoculan 0.5 ml de la suspensión de esporas obtenidas en (a) a cada uno de los medios de desarrollo D₁, D₂, D₃, D₄, D₅. Se incuban durante 24 horas a 28°C sobre agitador oscilante, al cabo de los cuales se determina: pH, PMV

(porcentaje de micelio en volúmen) y se hace observación al microscopio en preparación en fresco.

Esporulación:

Para observar la esporulación y forma de las colonias en los distintos medios, se procede de la siguiente manera: de la suspensión obtenida en a) se hacen diluciones desde 10^{-1} hasta 10^{-6} , y se inoculan 0.1 ml por caja petri conteniendo cada uno de los siguientes medios: E₁, E₂, E₃, E₄, E₅. Se utilizan cuan cuatro cajas de cada medio por dilución.

Las cajas se incuban de 8 a 10 días hasta que completen su esporulación a 28°C. Cuando esta es completa se hacen las anotaciones respectivas a las características de las colonias en cada uno de los distintos medios.

Fermentación:

La capacidad de la cepa para producir antibiótico se prueba en los medios de fermentación. Para inocular éstos se emplearon cultivos de 24 horas en los diferentes medios "D". Cada uno de los medios "D" se inocula a tres matraces de cada uno de los diferentes medios "F" a razón de tres ml de inóculo por matraz. Se considera que a las 144 h la producción del antibiótico ha llegado a su término, por que si efectuamos dosificaciones sucesivas del mismo a partir de este punto, se observa que éste permanece constante ó su incremento resulta despreciable, por lo que se suspende la incubación y se procede a efectuar el análisis cuan-

titativo de éste por los métodos microbiológico y químico descritos más adelante.

Los resultados de cada uno de los tres matraces que -- contienen el mismo medio "F" e igual inóculo "D", se promedian en cada serie de inoculaciones.

D. DETERMINACIONES EN LOS CULTIVOS.

Dosificación del antibiótico

Método Espectofotométrico:

Se acidifica el caldo con H_2SO_4 al 50% hasta un pH de 1.7 - 1.8 con el fin de disolver el antibiótico, se agita durante 10 minutos, se toman con una pipeta 10 ml que se pasan a un matraz volumétrico, llevandose al aforo con solución amortiguadora pH 2 (KCl/HCl 2N), se filtra y del segundo filtrado se toman 10 ml que se llevan a 100 ml nuevamente con solución amortiguadora, se agita y se lee en espectofotómetro a 353 m μ , Las lecturas se refieren a una curva patrón.

Curva patrón (Gráfica #1)

Se pesan exactamente 100 mg de Oxitetraciclina base U.S.P. secada previamente durante 3 horas a 60°C a un vacío inferior a 5 mm de Hg y se transfiere a un matraz volumétrico de 100 ml; se lleva al aforo con HCl 0.1 N, se agita y de esta solución se toman las siguientes cantidades:

1 ml y se lleva a 20 ml que equivalen a 50 gammas/ml

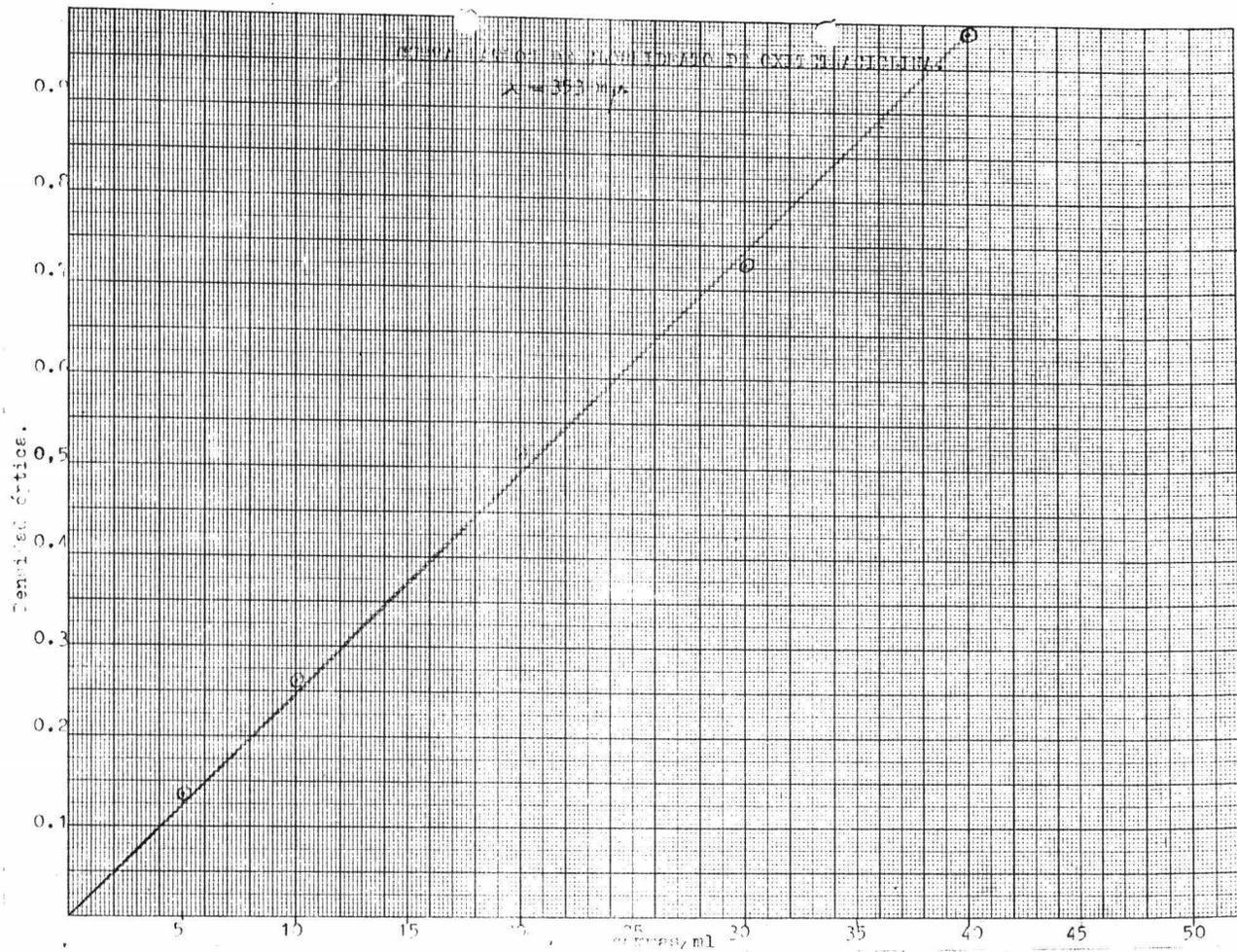
1 " " " " " 25 " " " " 40 " "

1 ml y se lleva 50 ml que equivalen a 20 gammas/ml.

1 " " " " 100 " " " " 10 " "

1 " " " " 200 " " " " 5 " "

Se determina la extinción a 353 m , en un espectofotómetro. Se construye de esta manera la curva patrón de clorhidrato de oxitetraciclina llevando a las abscisas la concentración de la solución empleada y a las ordenadas las respectivas absorbancias registradas en el espectofotómetro.



DOSIFICACION MICROBIOLOGICA DE

LA OXITETRACICLINA.

La dosificación microbiológica de la oxitetraciclina, se hace según el método de placa, mediante inoculaciones de agar con una cepa bacteriana sensible a dicho antibiótico según las siguientes modalidades:

a) Cepa bacteriana :

Bacillus cereus var. micoydes ATCC 9634 (esporas).

El microorganismo se conserva mediante transplante mensual en tubos inclinados con agar triptosa, se incuban 24 horas a 30°C y se recojen con 30 ml de agua destilada estéril, se distribuye esta suspensión sobre una botella de Roux que contiene 300 ml de Agar # 1 (Difco), se incuba a 30°C durante una semana. Se hace una suspensión con el bacilo desarrollado, con 30 ml de agua destilada estéril y se transfiere a un matraz estéril también, se calienta por 30 minutos a 65°C, agitando frecuentemente. La suspensión se centrifuga tres veces, lavando con agua estéril el sedimento, finalmente se calienta a 65° durante treinta minutos.

Para determinar la cantidad de inóculo que se debe emplear, se hace una prueba preliminar, usando distintas cantidades de inóculo sobre agar # 8 (difco) hasta obtener halos de inhibición visibles a la concentración de 5 mcg/ml de antibiótico.

b) Preparación de las placas

En lugar de cajas petri, se usan placas de vidrio cuadradas de 30 X 30 cm y enmarcadas con acero inoxidable, se esterilizan por exposición a la luz ultravioleta durante 30 minutos.

Se licuan 300 ml del medio "Bacto Antibiotic Medium" # 2 (Difco) previamente hidratado y esterilizado, se deja enfriar a 55°C y se vierte en la placa; cuando está perfectamente solidificado, se vierten 100 ml del medio " Bacto Antibiotic Medium " # 1 el cual ha sido inoculado con la suspensión de esporas a la temperatura de 48° C. Se practican en la placa 36 - horadaciones usando un sacabocados estéril de 0.5 mm de diámetro.

La modalidad de usar una placa de vidrio en lugar de cajas petri es ya bien conocida y permite en la misma placa llevar a cabo la determinación de diferentes - concentraciones de una muestra y su correspondiente curva normal.

c) Curva patrón

Se pesan con exactitud 50 mg de oxitetraciclina patrón USP previamente secada al vacío durante 3 h y cuya potencia sea conocida, se disuelven en 100 ml de solución amortiguadora pH 4.5 (cuando se usa base primeramente se disuelve en 5 ml de HCl 0.1 N). obteniéndose una solución de 500 mcg/ml. De esta

solución se toma 1 ml y se diluye a 100 con la misma solución amortiguadora, a esta solución le llamaremos A_2 (5 mcg/ml. De esta solución se hacen diluciones hasta tener las siguientes concentraciones: 2.5 mcg/ml, 1.25 mcg/ml, 0.625 mcg/ml, a estas les llamaremos A_1 , B_2 , B_1 respectivamente.

d) Problema:

La muestra conteniendo el caldo de fermentación que se va a valorar se acidula con H_2SO_4 al 10 % más ó menos 1 ml, se filtra y del filtrado se toman 5 ml a los que se les agregan 5 ml de HCl 2 N y se llevan a 100 ml en matraz aforado, esta solución se denomina S_2 . A 10 ml de S_2 se agregan 10 ml de solución amortiguadora de pH 4.5 y a esta se le denomina S_1 .

f) Procedimiento:

La solución patrón y la solución problema, se colocan mediante una pipeta de punta larga, dentro de las horadaciones (midiendo 0.1 ml por perforación) según el cuadro latino siguiente:

S_1	S_2	A_1	A_2	B_1	B_2
B_2	B_1	S_2	S_1	A_2	A_1
A_1	A_2	S_1	S_2	B_1	B_2
B_1	B_2	A_1	A_2	S_1	S_2
A_1	A_2	S_1	S_2	B_1	B_2
B_2	B_1	A_2	A_1	S_2	S_1

en donde cada letra representa una dilución del patrón A_1 , A_2 , B_1 , B_2 y para el problema S_1 y S_2 como se describen anteriormente.

La placa así preparada se coloca en el refrigerador durante 30 minutos y después se incuba a 30°C durante 24 h.

f) Cálculos:

Se mide el diámetro de inhibición en cada una de las horadaciones y se saca un promedio de las lecturas. Se traza la curva patrón corrigiendo los cuatro puntos promedio de las diluciones de la curva por medio de la fórmula siguiente:

$$\frac{3A_2 + 2A_1 + S_2 - S_1}{5} = \text{Punto alto de la curva.}$$

$$\frac{3S_1 + 2S_2 + A_1 - A_2}{5} = \text{Punto bajo de la curva.}$$

Una vez trazada la curva se interpolan las lecturas de las diluciones del problema y se calculan los porcentajes.

DETERMINACIONES FISICOQUIMICAS

Porcentaje de micelio en volúmen

Para esta determinación se utilizan cultivos de 24 horas conteniendo los diferentes medios "D". Se procede de la siguiente manera: se vierte la muestra en tubos para centrifuga graduados con capacidad para 10 ml, teniendo cuidado que el cultivo sea homogéneo y llegue exactamente hasta la marca 10. Las muestras se colocan en la centrifuga durante 10 minutos. al cabo de los cuales se toma la lectura anotando hasta que marca se encuentra el sedimento que corresponde al porcentaje de micelio en volúmen ó PMV.

Determinación del pH

El pH de los cultivos se determina usando un potenciómetro, calibrado con una solución amortiguadora, el cual nos da directamente las lecturas.

Observación al microscopio

Microscópicamente se observa que el micelio aéreo se presenta más o menos ramificado y que tales ramificaciones pueden ser muy simples: monopódicas, simpódicas o también verticiladas en diversas formas; esta última característica se ha utilizado para formar diversos grupos dentro del mismo género. También puede observarse en algunas ocasiones un micelio que se reúne en haces o mazos esféricos formando conglomerados. Las hifas que llevan las esporas pueden ser cortas o largas, simples o ramificadas y llevan las esporas en cadenas rectas, flexibles o espiraladas.

A partir de la rehidratación de las esporas y de su inoculación a los diferentes medios de cultivo, según se describe en el capítulo anterior, se inician las observaciones tanto microscópicas como macroscópicas y las determinaciones al crecimiento y comportamiento de Streptomyces rimosus ATCC 10,970.

Se observó que el crecimiento del microorganismo es en general muy fácil en los distintos medios de esporulación, pero inmediatamente se notan diferencias en su desarrollo (Tablas 3 y 4).

Se observa en todos los medios que la esporulación se inicia alrededor del sexto día, obteniéndose mejores resultados en los medios E₁ y E₅, destacando el segundo por su abundancia y aspecto.

La esporulación en tubos de cultivo fué también muy satisfactoria para los mismos medios E₁ y E₅.

Los medios E₃ y E₄, se presentan muy deficientes pues las colonias tienen el aspecto de haber crecido en las condiciones mínimas para su desarrollo.

Los medios E₂ y E₆, no presentaron crecimiento, tanto en caja como en tubo inclinado.

La capacidad de las esporas para desarrollar el micelio característico de nuestro microorganismo, se comprobó al inocular éstas en los medios líquidos de " Desarrollo", que son realmente medios vegetativos adecuados para esta fase del crecimiento; para este paso se escogió la esporu-

lación más abundante, inoculando con estas esporas todos los medios de desarrollo.

Estando todos los medios inoculados e incubados en igualdad de condiciones, se procedió a observar el desarrollo tanto en los aspectos macro y microscópico, como por su cambio de pH al medio y la proporción de micelio desarrollado en cada uno de los distintos medios. Estos resultados se encuentran en la tabla 4.

En el medio D_1 no se observa crecimiento alguno ni aún después de 48 h de incubación. En el medio D_2 se observa crecimiento escaso a las 24 h.

Los medios D_3 y D_4 son los más satisfactorios, ya que a las 24 h presentan abundante desarrollo del micelio, el que es prácticamente igual en las dos fórmulas.

Con estos resultados se procedió a hacer la inoculación a los medios de fermentación, en series, como se indica a continuación:

A- Del medio D_2 a las seis fórmulas de los medios de fermentación (Tabla 5).

B- Del medio D_3 a las seis fórmulas de los medios de fermentación (Tabla 6).

C- Del medio D_4 a las seis fórmulas de los medios de fermentación (Tabla 7).

Después de terminada la incubación de los medios de fermentación, se determinó la cantidad de antibiótico producido en cada uno de ellos, tanto por métodos químicos como

por métodos microbiológicos.

Los mejores títulos de antibiótico se encuentran en la serie B de fermentación, inoculada con D₃, y entre todas las fórmulas el mejor es para F₂. El resto de la serie da resultados semejantes, pudiendose considerar el segundo grupo como F₁, F₃, F₅.

El medio F₄ dió los resultados más bajos.

Las series A y C pueden considerarse prácticamente iguales. Sin embargo, si observamos los resultados reorganizando su distribución (Tabla 8), se nota que la serie A tiene una ligera ventaja sobre la serie C y por otro lado no presenta un título tan bajo como la serie C, por lo que se puede decir que se obtuvieron mejores resultados en una serie cuya proveniencia no había sido precisamente calificada como la mejor (el inóculo desarrollado en D₂), lo cual no es muy sorprendente pero si muy importante.

Si a primera vista podría decirse que la mejor serie sería la formada por: E₅ - E₄ (ó E₃) - F₂, analizando los resultados con más cuidado, se pueden encontrar otras secuencias que serían mejores y tal vez llegaran a mejorar más fácilmente.

En cuanto a los medios de fermentación, también se puede decir lo mismo. Aparentemente hay una preponderancia de los medios F₂ y F₅, considerando las tres series en conjunto, pero en cuanto al valor de los títulos son mejores F₂, F₁ y F₃ en este orden. Aunque los títulos más bajos en ge-

neral para las tres series se obtuvieron en los medios F_1 y F_3 con la sólo excepción del F_1 que dá el título más bajo y que ocupa en la serie B el tercer lugar.

Hay otros factores que considerar para estos títulos, que son las diferencias inherentes entre las determinaciones química y microbiológica para la cantidad de antibiótico presente en los medios, la velocidad de producción del antibiótico y el progreso del mismo en cada fermentación, desde el punto de vista bioquímico. De estos aspectos no se ocupa este trabajo pero sí se cree necesario señalar su importancia.

En la gráfica 2 se muestra el progreso "ideal" de una fermentación de este tipo. No fué posible determinarla con los medios de este trabajo, aunque sí puede y debe hacerse cuando se estudia una nueva cepa, pero preferentemente a escala piloto.

TABLA # 3

Desarrollo de Streptomyces rimosus ATCC 10970
en medios de esporulación

Medio	Periodo de incubación (días)	Colonias			Pigmento en el medio
		Forma	Tamaño en mm.	Color	
E ₁	10	Redondas, onduladas, presentan mayor esporulación al centro, ligeramente elevadas.	18	blanco	-
E ₂	-	-	-	-	-
E ₃	10	Redondas, planas, casi transparentes, con aspecto anulado y esporulación nula a la periferia.	0.5	blanco	-
E ₄	8	Redondas muy planas, con bordes dentados y abundantes rugosidades al centro formando anillos.	10 a 15	gris	-
E ₅	10	Redondas, muy elevadas algunas crateriformes, esporulación abundante.	0.7	blanco	-
E ₆	-	-	-	-	-

TABLA # 4

Desarrollo de Streptomyces rimosus 10,970 ATCC en medios para crecimiento.

Medio de crecimiento	Tiempo de incubación (horas)	PMV	pH final del medio.
D ₁	24	-	7.1
		-	7.0
		-	7.2
		-	6.8
D ₂	24	1.8	6.4
		1.5	6.0
		2.0	6.0
		1.5	6.4
D ₃	24	6.0	4.0
		6.4	4.5
		6.2	3.8
		5.9	4.2
			máximo
D ₄	24	6.3	1.5
		6.4	1.0
		6.3	1.7
		6.0	1.7
	máximo		

PMV = Porcentaje de micelio en volúmen.

TABLA V. SERIE A.

"Producción del antibiótico en los diferentes medios de fermentación inoculados con S. rimosus crecido en medio D₂"

Medio de fermentación	Titulo Químico (gammas/ml)	Titulo microbiológico (gammas/ml)
F ₁	310	400
F ₂	440	520
F ₃	365	300
F ₄	400	400
F ₅	420	480
F ₆	370	450

TABLA VI. SERIE B.

" Producción del antibiótico en los diferentes medios de fermentación inoculados con S. rimosus crecido en medio D₃ "

Medio de fermentación	Título Químico (gammas/ml)	Título Microbiológico (gammas/ml)
F ₁	720	630
F ₂	775	810
F ₃	650	610
F ₄	320	350
F ₅	470	500
F ₆	400	350

TABLA VII. SERIE C.

"Producción del antibiótico en los diferentes medios de fermentación inoculados con S. rimosus crecido en medio D₄"

Medio de fermentación	Título Químico (gammas/ml)	Título Microbiológico (gammas/ml)
F ₁	380	210
F ₂	465	440
F ₃	465	400
F ₄	400	320
F ₅	430	450
F ₆	455	480

TABLA VIII
DISTRIBUCIÓN DE LOS TÍTULOS DE ANTIBIÓTICO OBTENIDOS EN LOS MEDIOS
DE FERMENTACIÓN EN LAS TRES SERIES DE EXPERIMENTACIÓN

O.T.C. g/ml	SERIE A		SERIE B		SERIE C	
	MICROB.	QUIM.	MICROB.	QUIM.	MICROB.	QUIM.
800			F ₂	F ₂ F ₃ F ₁		
700						
600			F ₃ F ₃			
500	F ₂		F ₆	F ₆	F ₆ F ₂ F ₃ F ₆	F ₆ F ₂ F ₅
400	F ₁ F ₅ F ₄ F ₆	F ₂ F ₅ F ₄ F ₆ F ₅	F ₄ F ₆	F ₆	F ₄ F ₁	F ₃
300	F ₃	F ₁		F ₄		F ₄
200						F ₂

Capítulo IV.

DISCUSIONES Y CONCLUSIONES.

- ✓ 9.- Evans A. J. and W. H. Linell Editors
 "The Chemistry of Antibiotics used in medicin"
 Pergamon press Oxford, London, New York, Paris.
- ✓ 10.-Finlay A.C. y otros
 "Terramicin a new antibiotic"
 Sciens III:85,1950
- 11.-Gauze G. F.
 "The search new antibiotics"
 New Haven, Yale University Press, 1960.
- 12.-Gottlieb David and Paul D. Show, Editors.
 "Antibiotics mechanism of action"
 Springer Verlag Berlin, Heidelberg, New York, 1967
- 13.-Hockenull D. J. D. Gordon and Bresh Sciens Pub.
 "Progress in Industrial Microbiology" 1964.
- 14.-Kuznetov V. D. Lyagina N. M. Sorokina E. I.
 "Mykrobiologya" XXXI:731, 1962
- 15.-Midlin S.Z. Alikenian S.I.Vladimirov A. V.
 Appl Microbiology 9:349,1961.
- 16.-Oginsky L. E. and W. Umbreit
 "An introduction to bacterial physiology"
 2a Ed. Sn. Fco., 1959.
- 17.-Pasteur L. and Jaubert J.
 Compt. Rend. Acad. d.s.c. 85:101,1877
- 18.-Piatkin K.
 "Microbiologya"
 Ed. MIR, Moscu, 1968.

- ✓ 19.- Prescott S. R. and G. C. Dunn
"Industrial Microbiology"
Mc. Graw-Hill N.Y. 1959.
- 20.- Rainbow C. and A.H. Rose
"Biochemistry of Industrial Microorganism"
Academic Press, London, New York, 1963.
- 21.- United States Dispensatory and Phisian Pharm.
Osol-Pratt-Altschue
26 th Edition, 1967.
- 22.- United States Pharmacopeia
XVIII, 1970.
- 23.- United States Patent 2,61680
Sobin B. A. and Finlay A. C.
Julio 18 de 1950.
- 24.- United States Patent 3,092556
Andrew and Nichols
Jun., 4, 1963
- 25.- Underkofler L. and J. M. Richard
"Industrial Fermentations"
Chemical Publishing Co. Inc. 1959.
- 26.- Waksman S. A.
"Actinomycetes"
The Ronald Press Co. New York 1962.
- 27.- Waksman S. A.
"Soil Microbiology"
John Wiley & Sons, Inc. New York.

28.- Waksman S. A. and A. T. Henrici

" The nomenclature and clasification of
Actinomycetes "

J. Bact. 46:337,1947

✓ 29.- Waksman S. A.

" The Actinomycetes "

Chronica Botanica Co. Waltham, Mass.

(pag. 78) 1950