



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO**

**INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMEDICAS**

**COLEGIO DE CIENCIAS Y HUMANIDADES**

**EFFECTOS DE LA ERITROMICINA SOBRE EL CRECIMIENTO DE  
Streptomyces erythreus Y SOBRE SU PROPIA BIOSINTESIS**

**T E S I S**

Que para obtener el título de:

**LICENCIADO EN INVESTIGACION BIOMEDICA BASICA**

**P r e s e n t a :**

**HECTOR LOPEZ HERNANDEZ**



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.

# TESIS CON FALLA DE ORIGEN



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA

EFFECTOS DE LA ERITROMICINA SOBRE EL  
CRECIMIENTO DE Streptomyces erythreus  
Y SOBRE SU PROPIA BIOSINTESIS

TESIS QUE PRESENTA

HECTOR LOPEZ HERNANDEZ

En cumplimiento parcial de los requisitos para la  
obtención del Título de

LICENCIADO EN INVESTIGACION BIOMEDICA BASICA

Colegio de Ciencias y Humanidades Unidad Académica  
de los Ciclos Profesional y de Posgrado e Instituto de  
Investigaciones Biomédicas, U. N. A. M.

Agosto 1981

## I N D I C E

	Pag.
INTRODUCCION	3
BIOSINTESIS DE LA ERITROMICINA	5
Formación de Subunidades Acil-CoA	5
Formación de 2-metil-malonil-CoA	6
Síntesis del 6-deoxieritronólido	7
Modificaciones finales del 6-deoxieritronólido	9
REGULACION DE SU BIOSINTESIS	11
Estimulación por Propanol	11
Regulación por el Producto Final	11
Regulación por la Fuente de Carbono	13
Regulación por Fosfato Inorgánico	14
TOLERANCIA A LOS ANTIBIOTICOS DE LOS MICROOR- GANISMOS PRODUCTORES	15
OBJETIVOS	16
MATERIALES Y METODOS	17
Microorganismos	17
Condiciones de Cultivo	17
Ensayo de la Eritromicina	17
Crecimiento Celular	18
Actividad de la Vía de Biosíntesis de Eritromicina	18
Cromatografía en Capa Fina	20

	Pag.
Radlocromatograma	20
ANALISIS DE RESULTADOS	21
EFECTO DE LA ERITROMICINA SOBRE EL CRECIMIEN- TO DE <u>Streptomyces erythreus</u>	21
Posibles Mecanismos de Resistencia	27
EFECTO ESTIMULATORIO DE LA ERITROMICINA SOBRE SU VIA DE BIOSINTESIS	29
EFECTO ESTIMULATORIO SOBRE LA PRODUCCION DE ERITROMICINA A	33
CONCLUSIONES	37
APENDICE	39
PROGRAMA DE CALCULO DE LA PRODUCCION ESPE- CIFICA DE ERITROMICINA	39
PIELIOGRAFIA	47
FIGURAS	51
TABLAS	63
AGRADECIMIENTOS	73
JURADO.	74

## INTRODUCCION.

La eritromicina (A), descubierta en 1952 -- (Mc Guire y cols., 6) es un antibiótico macrólido producido por Streptomyces erythreus. Terapéuticamente tiene una gran importancia, pues es sumamente eficaz contra bacterias gram positivas (Tabla 1). Es el antibiótico de elección en varios padecimientos de vías respiratorias, tales como neumonía, bronconeumonía, amigdalitis y en otras infecciones como enteritis e intoxicaciones estafilococcicas, sífilis, tétanos, meningitis y difteria, siendo todas ellas frecuentes en nuestro medio (CNIDS, -- 1977). Actúa como un antibiótico bacteriostático que al interactuar con la subunidad 50 S ribosomal, impide la continuidad de la síntesis de proteínas (Otake y cols, 1971; Oleinick, 1975). Es un antibiótico con notables ventajas, ya que dosis terapéuticas presentan muy baja toxicidad, no es alergénico ni daña la flora intestinal normal. En casos de hipersensibilidad a penicilina puede ser el antibiótico de uso alternativo (Kagan, 1975; -- Oleinick, 1975).

Químicamente consiste en un anillo lactónico macrocíclico, constituido por un átomo de oxígeno y trece átomos de carbono, y por azúcares no comunes como desosamina, cladinosa y micarosa (Fig. 1) (Wiley y cols, 1957).

Dicho antibiótico, al igual que otros metabolitos secundarios, no se requiere ni para el crecimiento ni para la reproducción del microorganismo que la produce y su síntesis está asociada a una determinada etapa de su ciclo de vida.



## BIOSÍNTESIS DE LA ERITROMICINA.

El núcleo de la molécula de la eritromicina es el eritronólido. Esta estructura se sintetiza por la polimerización sucesiva de siete unidades activadas de propionato, con reacciones de condensación similares a las de la biosíntesis de los ácidos grasos (Fig. 1) (Lynen, 1967; Vanek y Majer, 1967). La localización de los grupos oxo e hidroxilos en la molécula de la eritromicina sugieren que ésta se forma como una cadena polícarbonílica. Estudios de incorporación de propionato de sodio doblemente marcado (Kaneda y cols., 1962; Grisebach y cols., 1960) y de metil-malonil-CoA ( $C^{14}$ ) en esta estructura apoyan el argumento anterior. La biosíntesis se inicia con una molécula de propionil-CoA y continúa con la condensación sucesiva de seis moléculas de 2-metil-malonil-CoA (Friedman y cols., 1964).

Formación de Subunidades Acil-CoA. Una primera activación se realiza al formarse propionil-CoA por las actividades consecutivas de una propionil cinasa específica y de una acil-CoA fosfotransferasa (Fig. 2). La actividad de la primera enzima parece ser un factor limitante en la biosíntesis de este antibiótico. Existe una estrecha correlación entre la actividad

de la propionato cinasa y la producción de eritromicina en tres cepas de S. erythreus, contando con los valores menores de  $K_M$  hacia propionato, las enzimas de las mejores cepas productoras (Raczynska-Bojanowska y cols. 1973; Holjevac y Vlasic, 1976). Los niveles intracelulares de propionil-CoA se regulan por tioesterasas que desfosforilan a este intermediario. En S. erythreus las actividades de esta enzima y de la enzima fosforilante presentan órdenes de magnitud similares, lo cual sugiere que la primera podría tener relevancia como mecanismo de control (Fig. 2, Raczynska-Bojanowska, 1974).

Formación de 2-metil-malonil-CoA. La energía libre necesaria para que el eritronólido se sintetice, es obtenida de las descarboxilaciones del 2-metil-malonil-CoA durante las reacciones de condensación. La participación directa de subunidades de propionil-CoA, aunque factible estructuralmente, no favorece que la síntesis del eritronólido ocurra en este sentido (Stryer, 1980). La propionil-CoA carboxilasa es la encargada de esta segunda activación. Esta enzima, dependiente de ATP, utiliza dióxido de carbono para carboxilar el propionil-CoA. Su actividad es estimulada por citrato y por propanol in vitro. Actinomicina D, inhibidor de la transcripción del DNA, suprime -

dicho efecto, lo cual sugiere que dichos moduladores actúan de manera directa o indirecta a nivel de la síntesis de la enzima (Figs. 2 y 3).

A partir de oxaloacetato, por una reacción de transcarboxilación, también se puede obtener metil-malonil-CoA, sin embargo, esta reacción tiene un papel secundario en la síntesis del antibiótico. La expresión de dicha actividad en este actinomiceto solo se presenta durante la trofofase, cuando el oxaloacetato abunda y no en la etapa de síntesis de la eritromicina, mientras que la actividad de la propionil carboxilasa es paralela en el tiempo, a la formación del antibiótico (Raczinska-Bojanowska y cols. , 1970).

Metil-malonil-CoA puede derivarse de ciertos aminoácidos: alanina, valina, treonina, isoleucina y metionina, sin embargo se desconoce el grado de sus participaciones (Fig. 3) (Stryer, 1980). En algunos macrólidos, valina e isoleucina se incorporan al aglucón (Gersch y cols. , 1977).

Síntesis del 6-desoxieritronólido. Poco es lo que se ha estudiado sobre la macrólido sintetasa y hay ciertas -

evidencias que sugieren que esta actividad, se deriva de la sintetasa de los ácidos grasos. La sintetasa de los ácidos grasos de S. erythreus es más parecida a la de los hongos que a la de la bacterias. Se caracteriza por ser un complejo multienzimático no dissociable y ser activado por flavín-mononucleótido. Sintetiza ácidos grasos a partir de acetyl-CoA y malonil-CoA; si se sustituye el primero por propionil-CoA, presuntamente se forman ácidos grasos de cadena non (Corcoran, 1974).

Un complejo multienzimático macrólido sintetasa, parcialmente purificado, ha sido descrito. Incorpora propionil-CoA y 2-metilmalonil-CoA radioactivos en un intermediario no volátil, aparentemente similar al 6-desoxieritronólido. Este metabolito parcialmente se convierte, por micelio intacto de S. erythreus, en el eritronólido B (Fig. 2) (Corcoran, 1973 y 1974).

La cerulenina es un inhibidor plenamente identificado de la sintetasa de los ácidos grasos (Martín, 1976). Se desconoce su efecto sobre la actividad de macrólido sintetasa. Sería sumamente interesante el demostrar que este inhibidor bloquea también esta actividad, lo cual apoyaría el argumen

to de que estas actividades análogas, en etapas fisiológicas diferentes, son realizadas por el mismo complejo (López, 1979).

El requerimiento de cofactores reductores, como el fosfato de nicotinamida-adenín-dinucleótido (NADPH), es mucho menor en la síntesis del macrólido no poliénico, que en la síntesis de los ácidos grasos. En este último caso, cada proceso de elongación contiene dos reacciones de reducción. En la eritromicina, la mayoría de las funciones policarbonílicas se encuentra sin reducir (Martín, 1976). Además se ha observado, que la regeneración de cofactores por NADP-deshidrogenasas -- dependientes no es un factor limitante en la biosíntesis del antibiótico (Roszkowski y cols., 1971).

#### Modificaciones finales del 6-desoxieritronólido

lido. Una vez formado el 6-desoxieritronólido, se hidroxila, sufre dos glicosidaciones, por azúcares derivados de la 6-desoxiglucosa (Vanek y Majer, 1967), y es sujeto a metilación antes de ser convertido en la eritromicina biológicamente activa.

El eritronólido B, producto hidroxilado del 6-desoxieritronólido, se condensa secuencialmente con los azúcares micarosa y desosamina, para dar lugar al micarosildesosa-

nil-eritronólido B o eritromicina D (Fig. 2). Este intermediario al ser nuevamente hidroxilado se transforma en eritromicina C, que por una reacción de transmetilación se convierte rápidamente en eritromicina A. De acuerdo a lo anterior, se ha observado que cepas industriales de S. erythreus no acumulan eritromicina C. La eritromicina E puede ser un precursor alternativo del producto final (Martín y Golstein, 1970). La caracterización de estos últimos pasos metabólicos ha sido favorecida por el uso de diferentes mutantes de la vía (Fig. 2). (Queener y cols., 1978).

En condiciones especiales, por biotransformación de la eritromicina A, puede obtenerse eritromicina E, estructura que presenta una unión orto éster adicional entre la cladinosa y el eritronólido (Fig. 2) (Martín y cols., 1975).

Si bien los precursores e intermediarios de la vía se encuentran plenamente identificados, el conocimiento es mínimo sobre la enzimología y la regulación de la vía de biosíntesis.

## REGULACION DE SU BIOSINTESIS.

Estimulación por Propanol. El propanol y el propionato estimulan la producción de la eritromicina (Fig. 3). - El propanol, agregado a fermentaciones industriales, ejerce un notable efecto estimulador sobre la producción de este antibiótico (Hockenull, 1963). Además de su papel de precursor, el propanol induce la actividad de la propionil-CoA carboxilasa de S. erythreus. Tal efecto estimulador parece ocurrir a nivel transcripcional (Racynska Bojanowska y cols., 1970 b).

Propanol y propionato también estimulan la biosíntesis de otros dos antibióticos macrólidos: candicidina - - (Martín y McDaniel, 1976) y turimicina (Gersch y cols., 1977).

Regulación por el Producto Final. La biosíntesis de un gran número de antibióticos es inhibida por la acumulación de su producto final (Tabla 2) (Martín y Demain, 1980). En la mayoría de los casos, el mecanismo de retrorregulación se desconoce. En el caso de cloranfenicol, éste es capaz de reprimir a la arilamina sintetasa, primera enzima en su vía biosintética, la cual se inicia con un intermediario del metabolismo de aminoácidos aromáticos (el ácido corísmico). La enzima

es producida justo antes de la formación del antibiótico y deja rápidamente de sintetizarse cuando el cloranfenicol ha alcanzado una concentración crítica. La represión de la arilamina sintetasa es inversamente proporcional a la concentración del cloranfenicol externo agregado, ni el crecimiento ni las actividades de otras dos enzimas se llegan a modificar (Jones y Westlake, 1947). Para el ácido micofenólico, la última enzima de la vía, una O-metiltransferasa, es inhibida por él como producto final (Muth y Nash, 1975), inhibición similar se presenta en la biosíntesis de puromicina (Sankaran y Pogell, 1975). En el caso de aurodox, éste al ser agregado al medio de cultivo inhibe su propia producción, la inhibición está en función directa del antibiótico exógeno y es reversible (Liu y cols, 1975).

En antibióticos macrólidos, resultados similares a los anteriores no han sido reportados.

En el caso particular de la eritromicina, se ha observado que ésta estimula su propia producción. La adición de altas concentraciones del antibiótico (2 mg/ml) a células de S. erythreus, al cuarto día de la fermentación, aumenta casi en un 50% la velocidad de síntesis de la eritromicina. Dicho



efecto, sin embargo no se observa si las adiciones se practican al inicio de la fermentación, o dos días después. Se desconoce el mecanismo por el cual se lleva a cabo la estimulación (Smith y cols., 1962). El presente estudio, en términos generales es compatible con los resultados anteriores.

A nivel enzimático, se ha estudiado el efecto de la eritromicina, producto final de la vía, sobre la propionil-CoA carboxilasa y la eritromicina transmetilasa de S. erythreus. La primera enzima, involucrada en la síntesis de metil malonil-CoA, no altera su actividad in vitro con concentraciones de eritromicina equivalentes a las producidas de forma natural (Raczynska-Bojanowska y cols., 1970). La segunda enzima, catalizadora de la transformación de la eritromicina C en eritromicina A, es inhibida in vitro por el producto de su reacción (Corcoran, 1975). Es factible que este efecto regulatorio tenga importancia a un nivel fisiológico.

Regulación por la Fuente de Carbono. La producción de eritromicina es dependiente de la fuente de carbono. Azúcares como glucosa, sacarosa, manosa o glicerol reducen la producción específica del antibiótico (Escalante y cols., -

1981). La regulación por la fuente de carbono, es un mecanismo involucrado en la biosíntesis de un gran número de antibióticos. Está bien establecido que la biosíntesis de estos idiolitos es inhibida o reprimida por fuentes de carbono fácilmente catabolizables, como la glucosa o el citrato (Martín, 1978), sin embargo el mecanismo molecular de tal regulación se desconoce (Tabla 3). Para el caso particular de la eritromicina, aparentemente la glucosa ejerce una "represión transitoria" sobre la biosíntesis del antibiótico (Escalante y cols., 1981).

Regulación por Fosfato Inorgánico. Un efector negativo de la biosíntesis de muchos idiolitos, inclusive de la eritromicina, es el fosfato inorgánico (Tabla 4). Los antibióticos se sintetizan únicamente en concentraciones de fosfato inorgánico subóptimas para el crecimiento. La mínima concentración inhibitoria de fosfato inorgánico se encuentra entre 1 y 50 mM para los diferentes antibióticos. Con concentraciones superiores, la producción del antibiótico se inhibe o se suprime totalmente, mientras que el crecimiento se estimula con concentraciones de fosfatos superiores a 500 mM (Martín, 1977). Concentraciones de fosfato inorgánico mayores a 4 mM inhiben la producción de la eritromicina (Romero, 1981).

## TOLERANCIA A LOS ANTIBIOTICOS DE LOS MICROORGANISMOS PRODUCTORES.

Entre las sustancias más potentes, biológicamente producidas, se encuentran los antibióticos. Es realmente notable que los microorganismos que las producen puedan sobrevivir y permanecer metabólicamente activos en sus propios medios. Aún si se considera que la acumulación del antibiótico puede alcanzar concentraciones tan altas como 50 mM (Demain, 1974).

Dentro de los mecanismos propuestos para evitar el suicidio de las especies productoras de antibióticos se tienen las siguientes: i) la alteración del sitio de acción del antibiótico, ii) la disminución de la permeabilidad del antibiótico hacia el interior de la célula, una vez que ha sido sintetizado y excretado, y iii) la modificación enzimática (y por lo tanto la detoxificación) del antibiótico por la especie productora. ----- Demain (1974) y Vining (1979) han revisado este tema en especial.

## OBJETIVOS.

- i) Determinar el efecto que la eritromicina -  
A ejerce sobre el crecimiento de Strep--  
tomyces erythreus, microorganismo que -  
la produce.
  
- ii) En condiciones de cultivo que no alteran -  
el crecimiento, determinar el efecto que -  
la eritromicina A ejerce sobre su biosín-  
tesis.

## MATERIALES Y METODOS.

Microorganismos. Las cepas de Streptomyces erythreus NRRL 2338, silvestre, productora de eritromicina A, y Sarcina lutea NRRL B-1018, gram positiva sensible a eritromicina A, fueron obtenidas del A.R.S. Culture Collection -- Research, U.S. Department of Agriculture, Peoria IL.

Condiciones de Cultivo. S. erythreus fue -- crecida en un medio completo para Streptomyces, constituido -- por 4  $\text{gl}^{-1}$  de extracto de levadura, 10  $\text{gl}^{-1}$  de extracto de malta y 4  $\text{gl}^{-1}$  de glucosa. El pH finalmente fue ajustado a 7.3 -- (Sánchez y Smiley, 1975). La agitación rotatoria fue de 170 rpm y la temperatura de incubación de 29<sup>o</sup> C. Los inóculos para los experimentos fueron crecidos por 24 h a partir de esporas. Estas fueron cosechadas entre los ocho y diez días de su siembra, en el mismo medio suplementando con agar 15  $\text{gl}^{-1}$ .

Ensayo de la Eritromicina. El antibiótico -- del medio de cultivo fue cuantificado por la técnica microbiológica de difusión en agar, la cual se basó en el reporte de Kavanagh (1975). Discos de 6 mm, de papel filtro, conteniendo 50 --

ul de medio centrifugado (13000 g, 10 min), fueron colocados en cajas de agar nutritivo; estas fueron cubiertas por aspersión de un cultivo de S. lutea. Los halos de inhibición del crecimiento fueron medidos, y la cantidad de eritromicina fue estimada, utilizando una solución estandar de eritromicina A - - (Fig. 14) (para detalles suplementarios véase el apéndice).

Crecimiento Celular. Muestras de micelio fueron cosechadas, lavadas con dos volúmenes de agua destilada y secadas a 80° C, hasta alcanzar un peso constante. En otros casos, la absorción a 540 nm de los cultivos fue utilizada para determinar su crecimiento.

La eritromicina A se obtuvo de los Laboratorios Fermic, S. A. de C. V., México, D. F., corroborando su identidad antibiótica y cromatográfica con eritromicinas A de los Laboratorios Abbot, México, D. F. y de Sigma Chemical Co., S. Louis, MO. El 2-metilmalonil-CoA C<sup>14</sup> y el 2-propionato de sodio C<sup>14</sup> fueron adquiridos de New England Nuclear, Boston MA.

Actividad de la Vía de Biosíntesis de Eritro

micina. La actividad de la vía biosintética se determinó por la incorporación global de propionato de sodio  $C^{14}$  en la eritromicina A y en sus precursores metabólicamente cercanos. El precursor radioactivo fue agregado desde el inicio del cultivo, 200- $\mu M$  y  $0.62 \text{ uCi } \mu\text{mol}^{-1}$  (exceptuando los casos particularmente indicados). En algunos experimentos se utilizó metil-malonil-CoA  $C^{14}$ , precursor del antibiótico (Friedman y cols., 1964), para ello se utilizó  $0.8 \text{ } \mu M$  y con  $48.2 \text{ uCi } \mu\text{mol}^{-1}$ . En los tiempos seleccionados, la eritromicina A y sus precursores metabólicamente cercanos fueron recuperados del medio de cultivo libre de células, ajustándolo a un pH de 9.8, extrayendo con cloroformo (v/v) dos veces, lavando con agua y evaporando al vacío casi a sequedad. Finalmente se obtuvo un aceite viscoso de color amarillo. La radioactividad global de estas muestras se cuantificó, descartando previamente por cromatografía en capa fina, que no contenían impurezas radioactivas significativas, como lípidos en la zona de migración superior o alguna otra sustancia de mayor polaridad, en la zona inferior que las eritromicinas. Las muestras fueron diluidas en solución de Bray (1960) y cuantificadas en un contador de líquido de centelleo.

Experimentos de transporte del precursor ra

radioactivo indican que éste no se afecta cuando S. erythreus se crece en presencia de eritromicina.

Cromatografía en Capa Fina. Muestras extraídas de manera similar a la descrita, fueron corridas en -- placas de sílica-gel 60 (Merck), de 0.25 mm de espesor, mediante un sistema de disolventes constituido por diclorometano, metanol e hidróxido de amonio (90/10/ 1 v/v/v) (Martin y Goldstein, 1970), y reveladas según el caso, con una mezcla de e tanol, p-anisaldehído y ácido sulfúrico concentrado (9/1/1 v/v/v) y calentamiento (Majer y cols., 1977), u observadas directamente con luz ultravioleta de onda corta.

Radiocromatograma. La distribución de la radioactividad a lo largo de la placa de cromatografía fue determinada por un detector Packard de radioactividad para placas.



## ANALISIS DE RESULTADOS.

### EFECTO DE LA ERITROMICINA SOBRE EL CRECIMIENTO DE Streptomyces erythreus.

Streptomyces erythreus (NRRL 2338), microorganismo que sintetiza eritromicina, es sensible a su propio — antibiótico. Esta sensibilidad se presenta durante su fase de crecimiento, antes de iniciarse la producción natural del antibiótico, que ocurrirá durante la idiofase.

El fenómeno inhibitorio se ha observado en dos condiciones:

i) Si S. erythreus es crecido en un medio, que inicialmente cuenta con 200 ug/ml de eritromicina exógena, se advierte un retraso considerable en el inicio del crecimiento.

ii) Si la adición de la eritromicina es posterior al inicio del cultivo, pero ocurre durante la trofofase, el crecimiento celular se detiene temporalmente (Fig. 4).

En el primer caso se observa que para al canzar, en la fase logarítmica de crecimiento, una densidad ce lular similar a la del control, se requieren de aproximadamente 10 h adicionales. En el segundo caso, después de la adición hay un periodo no menor a 6 h, donde la densidad celular no se incrementa, mientras que en el cultivo control todavía hay crecimiento.

El retraso en el inicio del crecimiento aparentemente depende de la concentración celular externa del antibiótico (Fig. 5). En nuestras condiciones experimentales, u na fase lag de 10 h en un control sin exposición a la eritromicina, se alarga hasta tener 24 h de duración, cuando es incubado con  $1\ 000\ \text{ug}\ \text{ml}^{-1}$  del antibiótico; concentraciones intermedias del antibiótico ejercen un retraso también intermedio. Para concentraciones de  $50\ \text{ug}\ \text{ml}^{-1}$  de eritromicina, o menores a ella, no se observa la inhibición del crecimiento.

La eritromicina inhibe síntesis de proteínas a nivel de la traducción del ARNm. Al combinarse con la subunidad 50 S del ribosoma bacteriano impide la translocación normal del aminoacil  $\text{ARN}_t$  (Gale y cols., 1972). Las bacterias

gram-positivas acumulan más eritromicina que las especies -- gram-negativas, en las cuales la droga penetra la pared celular con cierta dificultad (Tanaka y Weisblum, 1975). S. erythreus -- con ribosomas 70 S típicos bacterianos (Deley, 1964) y como -- gram-positivo que es, en su fase de crecimiento no parece li-- brarse de esta susceptibilidad.

Sin embargo, en los casos estudiados, la -- inhibición sobre el crecimiento es solo temporal, aún con 1000 ug/ml. Y en la fase exponencial subsiguiente a la fase lag, los tiempos de duplicación celular son similares al de un cultivo -- control (Tabla 5). Si la adición de la eritromicina es posterior al inicio del cultivo, durante la trofofase, el efecto también es -- transitorio (Fig. 4). Es posible que en estas fases más tardías del desarrollo, se cuente ya con un mecanismo maduro de tole -- rancia hacia este metabolito.

Conviene hacer notar, que una segunda adi -- ción de eritromicina a un mismo cultivo, que ya se ha sobre -- puesto a un contacto inicial, no parece ejercer sobre él ningún efecto (Fig. 4).

La insensibilidad posterior a la eritromicina no parece deberse a una degradación o inactivación de ella en el medio extracelular, pues los perfiles de actividad antibiótica, medidos por el ensayo microbiológico, se mantienen más allá del momento de restablecerse el crecimiento (hasta las -- 45 h) (Fig. 6); más aún, tales actividades ni siquiera se aproximan a las presentes de manera natural, en un cultivo normal.

La estabilidad extracelular del antibiótico -- sugiere que se induce un mecanismo de resistencia, no existente en un principio, que permita tanto la síntesis de las proteínas participantes en el metabolismo secundario, como la sobrevivencia del microorganismo, cuando menos durante la etapa inicial de formación del antibiótico.

Por otra parte, es notable la gran capacidad de resistencia desarrollada hacia la eritromicina. S. erythreus es capaz de seguir multiplicándose, con un tiempo de duplicación celular muy normal (5.1 h) con  $1000 \text{ ug ml}^{-1}$ , concentración veinte veces mayor a la que produciría normalmente -- ( $40 \text{ ug ml}^{-1}$ ), y entre  $10^3$  a  $10^5$  veces mayor a la requerida para inhibir el crecimiento de otras bacterias gram-

positivas sensibles de interés clínico (Tablas 5 y 1).

El manejo del fenómeno de sensibilidad, -- descrito anteriormente, pudiera tener implicaciones prácticas. -- En S. goldiniensis, productor del antibiótico aurodox, la selección de cepas resistentes a dicho antibiótico ha permitido obtener productividades mayores de este metabolito (Unowsky y Hoppe, 1978). Cepas mutantes que se desarrollan en presencia de  $2 \text{ g l}^{-1}$  de aurodox llegan a producir hasta 5 veces más de este antibiótico que sus antecesoras, que originalmente toleran -- concentraciones menores a  $0.05 \text{ g l}^{-1}$  de aurodox. Correlaciones similares han sido descritas para otros microorganismos -- productores de antibióticos. Es posible que en S. erythreus -- (NRRL2338) también se presentase esta asociación de eventos.

A diferencia de otras especies productoras de antibióticos, donde este metabolito no ejerce peligro en ningún momento de sus ciclos de vida, como sería el caso de la -- penicilina para hongos del género Penicillium (Vining, 1979), en nuestro caso, S. erythreus es sensible a la eritromicina durante la trofofase y requiere aparentemente de la inducción de un -- mecanismo de protección.

Dentro de otros Streptomyces, hay casos - similares, que ilustran el contraste existente, entre una resis-- tencia en etapas tardías del desarrollo para el antibiótico produ-- cido y una sensibilidad al metabolito en cultivos jóvenes del mi-- croorganismo: El crecimiento, a partir de esporas de S. griseo carneus, es inhibido por 5 ug de estreptomycin por ml cuando-- 300 ug/ml adicionados al micelio de un cultivo de 24 h ya no -- tienen efecto (Benedict y cols., 1951). El crecimiento de S. an tibioticus, un productor de actinomicina, es inhibido en un 50%- por 4 ug/ml de actinomicina, aunque esta cepa es capaz de pro-- ducir cerca de 120 ug/ml durante la idiofase. Resultados simila-- res han sido reportados en S. parvulus, otro productor de acti-- nomicina (Hitchcock y Katz, 1978). El desarrollo temprano del - productor de tetraciclina S. aureofacteus es inhibido por 400 -- ug/ml de clorotetraciclina, aún cuando se presente síntesis de - proteínas durante la idiofase tardía, en presencia de 2000 ug/ml (Mikulik y cols., 1971) (Tabla 6). De manera similar, el cloran-- fenicol inhibe el desarrollo tanto de S. niveus como de S. ste-- roides, que son productores de novobiosina (Al'Nuri y Egorov, - 1968; Hoeksema y Smith, 1961). Para productores de eritromi-- cina u otro antibiótico de la familia de los macrólidos no se en-- contraron reportes al respecto.

### Posibles Mecanismos de Resistencia.

Dentro de los mecanismos propuestos para evitar el suicidio de las especies productoras de antibióticos se tienen los siguientes: i) la alteración del sitio de acción del antibiótico, ii) la disminución de la permeabilidad del antibiótico-hacia el interior de la célula, una vez que ha sido sintetizado y excretado y iii) la modificación enzimática intracelular (y por lo tanto la detoxificación) del antibiótico por la especie productora.

En procariotes, el efecto inhibitorio del -- crecimiento por la eritromicina, se atribuye a la interferencia- que ésta ejerce en el paso de traslocación del aminoacil-ARN<sub>t</sub>, durante la síntesis de proteínas (Otaka y cols., 1971; Cleinick, 1975). En bacterias resistentes de importancia clínica, la metilación enzimática del ARN 23 S ribosomal disminuye considerablemente la afinidad del antibiótico hacia este organelo (Lai y - Weisblum, 1971).

En el caso particular de esta cepa de Streptomyces erythreus (NRRL-2338), se han encontrado diferencias-

importantes en su patrón de metilación para las adeninas constituyentes del ARN<sub>r</sub> 23 S (Yang Graham y Weisblum, 1978), que bien pudiera asociarse a la tolerancia observada por nosotros, - de este microorganismo a su propio antibiótico. Lo anterior - - también es consistente con la evidencia de insensibilidad observada por Teroaka y Tanaka (1974). Comparando estos investigadores los ribosomas de S. erythreus con los de otra cepa de - S. griseus, encontraron que los del productor de la eritromicina son incapaces de unirse a éste u otros antibióticos macrólidos (Fig. 7). Sin embargo los ribosomas de S. griseus dan resultados positivos. Las evidencias anteriores sugieren que la - - metilación del ARN<sub>r</sub> está implicada como posible mecanismo por el cual S. erythreus se protege de su metabolito.

Sin embargo queda en duda como es que - se induce molecularmente el mecanismo de tolerancia y así también la identidad de los posibles componentes involucrados.



## EFFECTO ESTIMULATORIO DE LA ERITROMICINA SOBRE SU VIA DE BIOSINTESIS.

La actividad global de la vía de síntesis de la eritromicina, puede determinarse por la incorporación de propionato de sodio C<sup>14</sup> en el anillo lactónico. Esta estructura, denominada también eritronólido, está formada por siete subunidades de tres carbonos, las cuales son derivadas del propionato (Fig. 1) (Lynen, 1967; Vanek y Majer, 1967). El eritronólido es una estructura común tanto para la eritromicina A, producto final de la vía, como para sus precursores inmediatos: Eritronólido B, micarosil-eritronólido, eritromicinas D, B, C y E (Figs. 1 y 2) (Queener y cols., 1978). Al contar con isótopos radioactivos C<sup>14</sup> incorporados en dicho anillo, podemos cuantificar para diferentes condiciones experimentales, la actividad metabólica de toda la vía biosintética, aún a pesar de presentarse fluctuaciones entre las concentraciones relativas de las diferentes eritromicinas. Sin embargo, la técnica en sí no permite determinar las concentraciones individuales de estas últimas.

Haciendo uso de esta metodología, se ha observado que la cinética de actividad biosintética de esta vía ---

presenta una correlación muy estrecha con la cinética de producción de eritromicina A, determinada por su capacidad de antibiosis (Fig. 8). Si bien ambas técnicas son sensibles y cuantitativas, la primera presenta gran precisión en sus determinaciones.

Por análisis cromatográfico, se observa que casi la totalidad de la radioactividad presente en una muestra — del cultivo de S. erythreus, está asociada a la zona de migración de la eritromicina A. Sin embargo, en el control hay una pequeña fracción radioactiva no despreciable, que se asocia a un compuesto no identificado (Figs. 11 y 12).

Haciendo uso de esta técnica de ensayo, experimentalmente se ha observado que la eritromicina A de origen externo, estimula apreciablemente la actividad metabólica de su misma vía de formación. Este efecto estimulador se presenta al utilizar, tanto propionato de sodio  $C^{14}$ , como metil-malonil CoA  $C^{14}$ , que son dos precursores con distinta posición en esta vía metabólica. (Tabla 7). Experimentos adicionales descartan la existencia de un transporte preferencial del precursor radioactivo, que fuera la causa de la estimulación observada, pues ni la

velocidad de transporte ni la radioactividad total intracelular, — al equilibrio (1 h aproximadamente) son menores cuando el micelio es crecido en ausencia del antibiótico (no graficado).

La estimulación de la biosíntesis ocurre -- con una mínima concentración de eritromicina A,  $2 \text{ ug ml}^{-1}$  -- (Fig. 9; Tabla 8), cuando normalmente se produce más de diez veces dicho valor (Tabla 9).

La velocidad de incorporación del precursor radioactivo a la molécula de la eritromicina, parece depender de la concentración de eritromicina adicionada, pues aunque las diferencias no son importantes, reproduciblemente, la mayor estimulación se presenta con  $200 \text{ ug/ml}$  del antibiótico, que fue la máxima concentración de eritromicina probada. Consecuentemente, los valores máximos de radioactividad incorporada, a las 70 h, llegan a ser hasta de ocho veces mayores con respecto al control (Fig. 9).

En el rango de concentraciones estudiado, — el crecimiento de S. erythreus es normal, y es entre los cuatro cultivos experimentales prácticamente similar. Como era de

esperarse, no se observa la inhibición del crecimiento, con concentraciones no mayores de  $200 \text{ ug ml}^{-1}$  de eritromicina A - -- (Fig. 9). Asimismo, al no presentarse tales diferencias, no hay discrepancia entre un análisis comparativo de productividades específicas ( $\text{cpm mg peso seco}^{-1}$ ) y otro análisis de productivida--des volumétricas ( $\text{cpm ml}^{-1}$ ) como el anterior (Fig. 13).

Las cinéticas de incorporación de propionauto de sodio  $\text{C}^{14}$  son similares entre sí y difieren básicamente - en la magnitud de sus velocidades de incorporación. Después de una etapa previa de mínima incorporación, se presenta otra de--una incorporación sostenida, por un período de tiempo aprecia--ble (70 h aproximadamente). Esta etapa se inicia al final de la--trofofase y se mantiene presente en la idiofase. El comporta---miento es típico de un metabolismo secundario. En estas etapas tardías se alcanzan valores similares de incorporación, para todos aquellos cultivos expuestos al antibiótico, si bien a distintos tiempos dependiendo de sus particulares velocidades de forma--ción. En el caso del control no se llega a observar dicho valor (Tabla 8). No se descarta que lo observado en este sentido, sea un artefacto por una limitación del precursor radioactivo.

## EFECTO ESTIMULATORIO SOBRE LA PRODUCCION DE ERI-- TROMICINA A.

Los resultados experimentales anteriores ha blan de una estimulación global de la vía biosintética, causada - por la eritromicina exógena. A continuación se discuten los re-- sultados, que sugieren que la formación de la eritromicina A -- como tal, también se ve estimulada.

En condiciones de cultivo de S. erythreus -- similares a las anteriormente descritas, se observa que la con-- centración extracelular de eritromicina A, determinada por el - ensayo microbiológico es significativamente mayor en la etapa - de producción, que el antibiótico inicial adicionado como agente- estimulante (Tabla 9). La estimulación es mayor cuando la con-- centración inicial del antibiótico así lo es. De tal forma que de 17 ug/ml de eritromicina A, como producción máxima en los -- controles, se puede llegar a tener cerca de diez veces más - - (159 ug/ml) de producción neta cuando el cultivo es expuesto a - la máxima concentración de eritromicina A exógena probada.

Al graficar la máxima actividad antibiótica -

producida en función de la actividad inicial de la eritromicina A adicionada a los cultivos, puede observarse, que con 20 y 200  $\mu\text{g ml}^{-1}$  del antibiótico exógeno, se tiene una producción nueve veces mayor que la que presenta un cultivo control. Es notable que el efecto sea más claro en las concentraciones elevadas - - (Fig. 10).

Si bien la estimulación se ha observado a dos niveles distintos: i) actividad de la vía de biosíntesis y ii) formación del producto final, no hay una correlación estrecha entre ambos ensayos. En el primer caso, la estimulación que se logra con concentraciones mínimas, no es muy diferente de lograda con concentraciones mayores a ella (Fig. 9). En el segundo caso, de manera inversa vemos que el grado de estimulación es dependiente directamente de la concentración del efector, por lo menos hasta la máxima concentración estudiada (200  $\mu\text{g ml}^{-1}$ ) (Fig. 10). Indudablemente la variación relativa entre las concentraciones de los intermediarios inmediatos al producto final, y el producto final pudieran modificar tal correlación.

El análisis por cromatografía en capa fina, de la muestra de un cultivo estimulado, indica que el principal-

producto radioactivo biosintetizado es eritromicina A. El revelado característico con p-anisaldehído, la migración paralela a un estandar y su actividad antibiótica lo confirman (Fig. 11).

Si bien esta técnica es parcialmente cuantitativa, puede observarse la estimulación al comparar el perfil - descrito anteriormente (Fig. 11) con el perfil de un cultivo control (Fig. 12).

Es interesante hacer notar, que el perfil - del radiocromatograma se modifica de forma relativa por el - - efecto de adicionar eritromicina A, no marcada al medio de cultivo (50 ug/ml). Mientras que la radioactividad asociada a eri--tromicina A aumenta (cerca de 50 veces), la correspondiente a - un compuesto importante en el control ( $R_{f_p} = 0.6$ ) disminuye. - - Desconocemos la identidad de este último compuesto, sin embargo, por la tinción azul característica con el revelador y su actividad antibiótica, pudiera ser uno de los intermediarios de la - eritromicina A. El uso de estandares adecuados de tales precursores permitiría discernir a que producto corresponde.

Si este presunto intermediario fuera tal, -

los resultados sugerirían, que cuando ocurre la estimulación -- existe una canalización de intermediarios hacia la acumulación -- del producto final. Se aprecian además, otros picos de radioac-- tividad menor (dos en el control y tres en el estimulado) inme-- diatamente anteriores al de la eritromicina A. Una técnica con-- mayor resolución permitiría su análisis individual.



## CONCLUSIONES.

La biosíntesis de la eritromicina, metaboliito secundario de gran importancia terapéutica, es un ejemplo -- más de que los mecanismos regulatorios de los sistemas biológicos pueden ser complejos en su comprensión, requiriendo del -- experimentalista, una visión amplia, sin restricciones, para -- identificar la lógica biológica.

Un microorganismo, capaz de sintetizar un metabolito tóxico para él, lo produce sólo cuando ya no ejercerá ningún peligro directo. Así vemos que S. erythreus, NRRL - 2338, microorganismo que sintetiza eritromicina, es sensible en su trofofase a su propio antibiótico, sensibilidad dependiente de la concentración del antibiótico. Sin embargo, tal efecto es sólo transitorio, pues aún con concentraciones veinte veces mayores a las producidas de manera natural (40 ug/ml), el microorganismo recupera su velocidad normal de crecimiento.

Puesto que la actividad del antibiótico en -- el medio extracelular, se mantiene constante, es posible que -- S. erythreus desarrolle un eficiente mecanismo de resistencia -

hacia su metabolito tóxico que le permita crecer aún en concentraciones de  $1000 \text{ ug ml}^{-1}$  de eritromicina, veinte veces superiores a las que produciría normalmente.

Por otra parte, la síntesis de la eritromicina es estimulada considerablemente. La adición del antibiótico al inicio del cultivo, afecta tanto la actividad biosintética de su vía de formación, como la producción particular de ella. La producción neta del antibiótico llega a ser hasta nueve veces mayor al ser comparada con la producción de un cultivo control.

El efecto observado no parece deberse a una simple deficiencia de un precursor de su biosíntesis, pues hay un incremento neto en el antibiótico producido, sin embargo sugiere la activación o la inducción de un paso enzimático limitante.

Estudios particulares sobre la alteración de la actividad catalítica de pasos enzimáticos clave de la vía, nos permitirán apoyar (o descartar) esta hipótesis de estudio.

APENDICE .

PROGRAMA DE CALCULO DE LA PRODUCCION ESPECIFICA  
DE ERITROMICINA

El programa permite calcular de manera --  
sencilla la producción específica de la eritromicina, así como --  
otros parámetros experimentales de interés.

Valores	Requerimientos
tiempo	directo
concentración de:	
eritromicina	halo, m, e <sup>o</sup>
proteína	A <sub>560</sub> , volumen, m, b.
peso seco	peso neto, volumen
radioactividad	cpm, volumen
producción específica de:	
eritromicina / proteína	e, proteína
eritromicina / peso seco	e, peso seco
eritromicina / X	e, x
eritromicina C <sup>14</sup> / proteína	e-C <sup>14</sup> , proteína
eritromicina C <sup>14</sup> / peso seco	e-C <sup>14</sup> , peso seco
eritromicina C <sup>14</sup> / X	e-C <sup>14</sup> , x

El programa cuenta con los siguientes módulos:

12. Elección del tipo y del título del subprograma.
13. Elección del subprograma. Programa ejecutivo.
14. Relación tiempo, eritromicina.
15. Relación tiempo, proteína.
16. Relación tiempo, peso seco.
17. Relación tiempo, eritromicina, peso seco, producción específica.
18. Relación tiempo, eritromicina, proteína, producción específica.
19. Relación tiempo, halo, eritromicina, peso seco, producción específica.
20. Relación tiempo, halo, eritromicina.
21. Relación tiempo, X.
22. Relación tiempo, halo, eritromicina, proteína, producción específica.

La implementación del programa se lleva a cabo en el equipo formado por una calculadora HF 9821A, un dispositivo de interfase para teletipo HF 11201A y un teletipo Facit.

A continuación se describen los diferentes módulos que constituyen este programa.

```

0:
0→R0→R1→R2→R3→R4
→R5→R6→R7→R8→R9→
R10→R11→R12→R13→
R14→R15F
1:
0→R16→R17→R18→R1
9→R20→R21→R22→R2
3→R24→R25→R26→R2
7F
2:
♦BEL ;♦BEL ;♦
BEL ;ENT "ANTIBI
OTICO ?",R11;IF
R11=0;GTO 8F
3:
ENT "BIDENSAYO ?
",R14;IF R14=0;
GTO 6F
4:
ENT "PENDIENTE ?
",R1;ENT "O. ORI
GEN ?",R2;GSB 19
F
5:
FXD 3;TYP "ANTIB
IOTICO",".",R1,R
2;GTO 8F
6:
ENT "ERITROM. C†
14 ?",R15;IF R15
=0;GTO 8F
7:
ENT "VOL. VARIAB
LE ?",R16;IF R16
=0;ENT "VOLUMEN
?",R18F
8:
ENT "PROTEINA ?"
,R12;IF R12=0;
GTO 13F

```

```

9:
ENT "PENDIENTE ?
",R5;ENT "O. ORI
GEN ?",R6;ENT "V
OL. VARIABLE ?",
R13F
10:
IF R13=0;ENT "VO
LUMEN ?",R7F
11:
IF R14=0;GSB 19F
12:
FXD 3;TYP "PROTE
INA",".",R5,R6;
GTO 17F
13:
ENT "PESO SECO ?
",R19;IF R19=0;
GTO 16F
14:
ENT "VOL. VARIAB
LE ?",R13;IF R13
=0;ENT "VOLUMEN
?",R7F
15:
GTO 17F
16:
ENT "X ?",R20F
17:
FMT 2/;TYP F
18:
GTO 0;LDF 13F
19:
TYP ".",".", "PEN
DIENTE","O. ORIG
EN";RET F
20:
END F
327550
R44

```

Subprograma 12. Elección del tipo de subprograma.

```

0:
TYP "TIEMPO", "ER
ITROMICINA" F
1:
TYP "HS", "CPM/ML
" F
2:
ENT "TIEMPO ?"; R
10; ENT "CPM ?"; R
21 F
3:
IF R16=1; ENT "VO
LUMEN ?"; R18 F
4:
R21/R18+R23 F
5:
FMT FXD 18.1,
FXD 18.1; TYP R10
+R23 F
6:
GTO 2 F
7:
END F
221511
R121

```

```

0:
T
1:
IF R15*R19=1;
GTO 0; LDF 17 F
2:
IF R15*R12=1;
GTO 0; LDF 18 F
3:
IF R14*R19=1;
GTO 0; LDF 19 F
4:
IF R12+R19+R20-R
14=-1; GTO 0; LDF
20 F
5:
IF R12+R19+R20-R
15=-1; GTO 0; LDF
14 F
6:
IF R14+R15-R12=-
1; GTO 0; LDF 15 F
7:
IF R14+R15-R19=-
1; GTO 0; LDF 16 F
8:
IF R14+R15-R20=-
1; GTO 0; LDF 21 F
9:
IF R14*R12=1;
GTO 0; LDF 22 F
10:
END F
219103
R104

```

```

0:
TYP "TIEMPO", "PR
OTEINA" F
1:
TYP "HS", "MG/ML"
F
2:
ENT "TIEMPO ?", R
10; ENT "ABSORBAN
CIA ?", R8 F
3:
IF R13=1; ENT "VO
LUMEN ?", R7 F
4:
(R8-R6)/(R5*R7) +
BF
5:
FMT FXD 18.1,
FXD 18.1; TYP R10
, BF
6:
GTO 2 F
7:
END F
Σ27424
R121

```

```

0:
TYP "TIEMPO", "PE
SO SECO" F
1:
TYP "HS", "MG/ML"
F
2:
ENT "TIEMPO ?", R
10; ENT "PESO NET
O ?", R22 F
3:
IF R13=1; ENT "VO
LUMEN ?", R7 F
4:
R22/R7 + R24 F
5:
FMT FXD 18.1,
FXD 18.1; TYP R10
, R24 F
6:
GTO 2 F
7:
END F
Σ24669
R122

```

Subprogramas 15 y 16.

```

0:
TYP "TIEMPO ", "E
RITROMICINA", "PE
SO SECO", "PROD.
ESP." F
1:
TYP "HS", "CPM/ML
", "MG/ML", "CPM/M
G" F
2:
ENT "TIEMPO ?", R
10; ENT "CPM ?", R
21 F
3:
IF R16=1; ENT "VO
LUMEN ?", R18 F
4:
ENT "PESO NETO ?
", R22 F
5:
IF R13=1; ENT "VO
LUMEN ?", R7 F
6:
R21/R18 → R23 F
7:
R22/R7 → R24 F
8:
R23/R24 → Z F
9:
FMT FXD 18.1,
FXD 18.1, FXD 18.
1, FXD 18.2; TYP R
10, R23, R24, Z F
10:
GTO 2 F
11:
END F
Σ14368
R104

```

```

0:
TYP "TIEMPO", "ER
ITROMICINA", "PRO
TEINA", "PROD. ES
P." F
1:
TYP "HS", "CPM/ML
", "MG/ML", "(CPM
E)/(MG P)" F
2:
ENT "TIEMPO ?", R
10; ENT "CPM ?", R
21 F
3:
IF R16=1; ENT "VO
LUMEN ?", R18 F
4:
ENT "ABSORBANCIA
?", R8 F
5:
IF R13=1; ENT "VO
LUMEN ?", R7 F
6:
R21/R18 → R23 F
7:
(R8-R6)/(R5*R7) →
B F
8:
R23/B → X F
9:
FMT FXD 18.1,
FXD 18.1, FXD 18.
2, FXD 18.1; TYP R
10, R23, B, X F
10:
GTO 2 F
11:
END F
Σ28319
R104

```



```

0:
TYP "TIEMPO", "HA
LO", "ERITROMICIN
A", "PESO SECO", "
PROD. ESP." F
1:
TYP "HS", "MM", ".
001MG/ML", "MG/ML
", "(.001MG. E)/(M
G PS)" F
2:
ENT "TIEMPO ?", R
10; ENT "HALO ?",
R4 F
3:
ENT "PESO NETO ?
", R22 F
4:
IF R13=1; ENT "VO
LUMEN ?", R7 F
5:
10↑(R1*R4+R2)→A F
6:
R22/R7→R24 F
7:
A/R24→Y F
8:
FMT FXD 18.1,
FXD 18.1, FXD 18.
1, FXD 18.1, FXD 1
8.2; TYP R10, R4, A
, R24, Y F
9:
GTO 2 F
10:
END F
Z30703
R104

```

```

0:
TYP "TIEMPO", "HA
LO", "ERITROMICIN
A" F
1:
TYP "HS", "MM", "1
0↑-3MG/ML" F
2:
ENT "TIEMPO ?", R
10; ENT "HALO ?",
R4 F
3:
10↑(R1*R4+R2)→A F
4:
FMT FXD 18.1,
FXD 18.1, FXD 18.
1; TYP R10, R4, A F
5:
GTO 2 F
6:
END F
Z5620
R122

```

```

0:
TYP "TIEMPO", "X"
┆
1:
TYP "HS", ". "┆
2:
ENT "TIEMPO ?", R
10; ENT "X ?", R23
┆
3:
FMT FXD 18.1,
FXD 18.1; TYP R10
, R23┆
4:
GTO 2┆
5:
END ┆
Σ25064
R129

```

```

0:
TYP "TIEMPO", "HA
LO", "ERITROMICIN
A", "PROTEINA", "P
ROD. ESP."┆
1:
TYP "HS", "MM", "1
0↑-3MG/ML", "MG/M
L", "(10↑-3MG E)/
(MG P)"┆
2:
ENT "TIEMPO ?", R
10; ENT "HALO ?",
R4┆
3:
ENT "ABSORBANCIA
?", R8┆
4:
IF R13=1; ENT "VO
LUMEN ?", R7┆
5:
10↑(R1*R4+R2)→A┆
6:
(R8-R6)/(R5*R7)→
B┆
7:
A/B→C┆
8:
FMT FXD 18.1,
FXD 18.1, FXD 18.
2, FXD 18.2, FXD 1
8.1; TYP R10, R4, A
, B, C┆
9:
GTO 2┆
10:
END ┆
Σ3055
R104

```

## BIBLIOGRAFIA.

- Aharanowitz, Y. y Demain, A. L. (1976). Abst. 16th Inter sci. Conf. Antimicrob. Agents Chemother. 49.
- Aharanowitz, Y y Demain, A. L. (1978). Antimicrob. Agents Chemother. 14, 159-164.
- Al'Nuri, M. A. y Egorov, N. S. (1968). Mikrobiologiya 37 413-416.
- Anuario de la Industria Química Mexicana (1977).
- Audhya, T. K. y Russell, D. W. (1975). J. Gen. Microbiol 86, 327-331.
- Basak, K. y Majumdar, S. K. (1973). Antimicrob. Agents - Chemother. 4, 6-10.
- Benedict, R. G. y cols. (1951). J. Bacteriol. 62, 487--497.
- Bray, G. (1960). Anal. Biochem. 1, 279-285.
- Centro Nacional de Información y Documentación en Salud (CENID). Informe de enfermedades transmisibles. (1977) Sal. Pub. Mex.. 19, 118-119.
- Corcoran, J. W. (1973) En Genetics of Industrial Microorganisms, Actinomycetes and Fungi. (Vanék, Z. ed.), vol. II, p. 339. Elsevier, Amsterdam.
- Corcoran, J. W. (1974). Developments in Industrial Microbiology 15, 93.
- Corcoran, J. W. (1975). Methods in Enzymology 43, 487.
- DeLey, J. (1964). J. Gen. Microbiol. 34, 219-227.
- Demain, A. L. (1963). Clin. Med. 70, 2045-2051.
- Demain, A. L. (1974). Ann. N. Y. Acad. Sci. 235, 601-612.
- Demain, A. L. (1976). Stadler Symp. 8, 41-55.
- Demain, A. L. y Inamine, E. (1970). Bacteriol. Rev. 34, 1-19.
- DeMoss, R. D. (1967). En "Antibiotics" vol. II. Biosynthesis (D. Gottlieb y P. S. Shaw, eds.) p. 77-81, -- Springer Verlag, New York.
- Doskocil, J. y cols. (1958). J. Gen. Microbiol. 18, 302.
- Egorov, N.S., Toropova, E. G. y Suchkova, L. A. (1971) - Mikrobiologiya 40, 475-480.
- Escalante, L. y cols. (1981). Antimicrob. Agents Chemother. sometido para publicación.
- Finland, M. C. y cols. (1952). Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 81, 725.
- Ford, H. J. y cols. (1953). Anal. Chem. 25, 1195-1197.
- Friedman, S. M., Kaneda, T. y Corcoran, J. W. (1964). J. Biol. Chem. 239, 2386-2391.
- Fusillo, M. H. y cols. (1953). Antibiot. & Chemother. 3, 581.

- Gale, E. F. y cols. (1972). "The molecular basis of anti-biotic action". Wiley, New York.
- Gallo, M. y Katz, E. (1972). J. Bacteriol. 109, 659-667.
- Gersch, D., Boker, H. y Thrum, H. (1977). J. Antibiotics 30, 488.
- Gordee, E. L. y Day, L. E. (1972). Antimicrob. Agents -- Chemother. 1, 315-322.
- Grisebach, H., Achenbach, A. y Grisebach, U. C. (1960). -- Zeitschrift für Naturforschung 15b, 560.
- Guy, L. R. y Chapman, J. S. (1961). Am. Respirat. Dis. - 87, 746.
- Haavik, H. I. (1974a). J. Gen. Microbiol. 81, 383-390.
- Haavik, H. I. (1974b). J. Gen. Microbiol. 84, 321-326.
- Hitchcock, M. J. y Katz, E. (1978). Antimicrob. Agents Chemother. 13, 104-114.
- Hockenhull, D. J. D. (1963). En " Biochemistry of industrial micro-organisms" (C. Rainbow and A. H. Rose, -- eds.) p. 159. Academic Press, Londres y New York.
- Hoeksema, H. y Smith, C. G. (1961). Prog. Ind. Microbiol. 3, 91-139.
- Holjevac, M. y Vlastic, D. (1976). En Proc. 5th Int. Fer. Symp. (H. Dellweg, ed.) p. 145 Berlin.
- Howells, J. D. y cols. (1972). Antimicrob. Agents Chemother. 2, 79-82.
- Hudson, D. G., Yoshihara, G. M. y Kirby, W. M. M. (1956) Arch. Internal. Med. 97, 57.
- Hurley, L. H. y Bialek, A. (1974). J. Antibiot. 27, 49-56
- Johnson, M. J. (1952). Bull. Wld. Hlth. Org. 6, 99-121.
- Jones, A. y Westlake, D. W. S. (1974). Can. J. Microbiol. 20, 1599-1611.
- Inamine, E.B.D., Lago, B. D. y Demain, A. L. (1969). En "Fermentation Advances" (E. Perlman, ed.) p. 199-221. Academic Press Inc. New York.
- Kagan C. (1975). Antimicrobial Therapy. Caps. 6 y 8. -- Saunders, New York.
- Kaneda, T. y cols. (1962). J. Biol. Chem. 237, 322.
- Kavanagh, F. (1975). En Methods in Enzymology 43, 55-68.
- Kimura, A. (1967). Agr. Biol. Chem. 31, 845-852.
- Kirsch, E. J. (1967). En "Antibiotics". Vol. II. Biosynthesis (Gottlieb, D. y P. D. Shaw, eds.) p. 66-76. -- Springer Verlag, Berlin.
- Kominek, L. A. (1972). Antimicrob. Agents Chemother. 1, 123-124.
- Kominek, L. A. (1975a). Antimicrob. Agents Chemother. 7, 856-860.
- Kominek, L. A. (1975b). Antimicrob. Agents Chemother. 7, 861-863.
- Lai, C. J. y Weisblum, B. (1971). Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 68, 856.

- Liu, C. M., Hermann, T. y Miller, P. A. (1977). *J. Antibiotics* 30, 244-251.
- López, H. (1979). En "Regulación de la Biosíntesis de la Eritromicina. Diseños Experimentales" (no publicado).
- Lynen, F. (1967). *Biochemical J.* 102, 381.
- Majer, J. y cols. (1977). *J. Am. Chem. Soc.* 99, 1620-1622
- Majumdar, M. K. y Majumdar, S. K. (1971). *Folia Microbiol.* 16, 285-292.
- Malik, V. S. y Vining L. C. (1972). *Can. J. Microbiol.* - 18, 137-143.
- Martín, J. F. (1976). *Developments in Industrial Microbiology* 17, 223.
- Martín, J. F. (1977). *Adv. Biochem. Engin.* 6, 105-127.
- Martín, J. F. (1978). En "Antibiotics and Other Secondary Metabolites: Biosynthesis and Production", (R. - Hutter, Th. Leisinger, J. Nuesch y W. Wehrli, eds.). Academic Press, London.
- Martín, J. F. (1980). En *Economical Microbiology*. Vol III p. 249. (Rose H. ed.).
- Martín, J. F. y Demain, A. L. (1980). *Microbiol. Rev.* 44, 230-251.
- Martín J. F. y McDaniel, L. E. (1974). *Dev. Ind. Microbiol.* 15, 324-337.
- Martín, J. F. y McDaniel, L. E. (1976). *European J. Appl Microbiol.* 3, 135.
- Martin, J. y cols. (1975). *Tetrahedron* 31, 1985.
- Martin, J. y Goldstein, A. W. (1970). En "Progress in Antimicrobial and Anticancer Chemotherapy". Vol. II, p. 112. University Press. Baltimore.
- McGuire, J. M. y cols. (1952). *Antibiotic and Chemotherapy* 2, 281.
- Mikulik, K. y cols. (1971). *J. Antibiot.* 24, 801-809.
- Molani, A. y Weinstein, L. (1971). *J. Infect. Diseases* - 123, 216.
- Muth, W. L. y Nash, C. H. (1975). *Antimicrob. Agents --- Chemother.* 8, 321-327.
- Oleinick N. L. (1975). En "Antibiotics. Mechanism of -- Action of Antimicrobial Agents". (J. W. Corcoran ed.) - Vol. III, p. 396. Springer-Verlag, New York.
- Otaka, E. y cols. (1971). *Molecular and General Genetics* 114, 14.
- Queener, S. W., Sebek, O. K. y Vézina C. (1978). *Ann. -- Rev. Microbiol.* 32, 593-636.
- Raczynska-Bojanowska, K (1974). *Postepy Higieny I Mediziny Dosw* 28, 499.
- Raczynska-Bojanowska, K., Rafalski, A y Ostrowska-Krysiak (1970). *Acta Biochimica Polonica* 17, 331.
- Raczynska-Bojanowska, K. y cols. (1973). *Antimicrob. -- Agents Chemother.* 3, 162.

- Ramsey, H. H., Hussain-Qadri, S. M. y Williams, R. P. -- (1973). Abst. Ann. Meet. Am. Soc. Microbiol. 180.
- Revilla, G. y Martín, J. F. (1977). Resultados no publicados.
- Romero, J. (1981). Tesis de Licenciatura, U.N.A.M.
- Roszkowsky, J. y cols. (1971). Acta Microbiologica Polonica 3, 97.
- Sánchez, S. y Smiley, K. L. (1975). Appl. Microbiol. 29, 745-750.
- Sankaran, L. y Pogell, B. H. (1975). Antimicrob. Agents Chemother. 8, 721-732.
- Smith, C. G. y Hinman, J. W. (1963). Prog. Ind. Microbiol. 4, 137-163.
- Smith, R. L., Bungay, H. R. y Pittenger, R. C. (1962). Appl. Microbiol. 10, 253-256.
- Soltero, F. V. y Johnson, M. J. (1953). Appl. Microbiol. 1, 52-57.
- Spizek, J. y cols. (1965). Folia Microbiol. 10, 263.
- Spizek, J., Chick, M. y Corcoran, J. W. (1965). Antimicrob. Agents Chemother. 1965, 138.
- Sprinkmejer, H. y Pape, H. (1977). Abstracts of the Fifth Symposium of the Federation of European Microbiological Societies, Basel, Switzerland.
- Stark, W. M. y Smith, R. L. (1961). Prog. Indust. Microbiol. 3, 210-230.
- Stryer, L. (1980). Biochemistry, 2d. ed.. W.H. Freeman, New York.
- Tanaka, T. y Weisblum, B. (1975). J. Bacteriol. 123, 771.
- Teroaka, K. H. y Tanaka, K. (1974). J. Bacteriol. 120, -316-321.
- Unowsky J. y Hoppe, D. C. (1978). J. of Antibiotics 31, 662-666.
- Vaněk, Z. y Majer, J. (1967). En "Antibiotics: Biosynthesis" (D. Gottlieb y P. D. Shaw, eds.), vol. II, p. 154-188. Springer-Verlag, Berlin.
- Vining, L. (1979). Adv. Appl. Microbiol. 25, 147-168.
- Wiley, P. F. y cols. (1957). J. Am. Chem. Soc. 79, 6070.
- Yang-Graham, M. y Weisblum, B. (1978). En "Microbiology 1978" (D. Schlessinger, ed.), p. 2533-2541. Am. Soc. Microbiol., Washington, D.C.
- Yanagimoto, M. y Terui, G. (1971). J. Form. Technol. 49, 604-610.

F I G U R A S

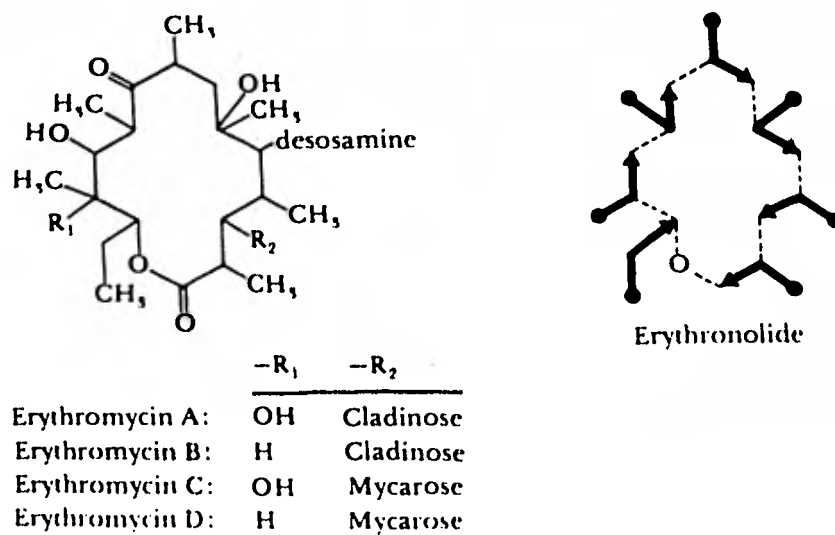


Fig. 1 Estructura química de las eritromicinas (izquierda) y -- posición de las subunidades de propionato en el eritronólido. -- (derecha). (Wiley y cols., 1957; Lynen, 1967 y Vanek y Mayer, 1967).



ERYTHROMYCIN BIOSYNTHETIC PATHWAY .

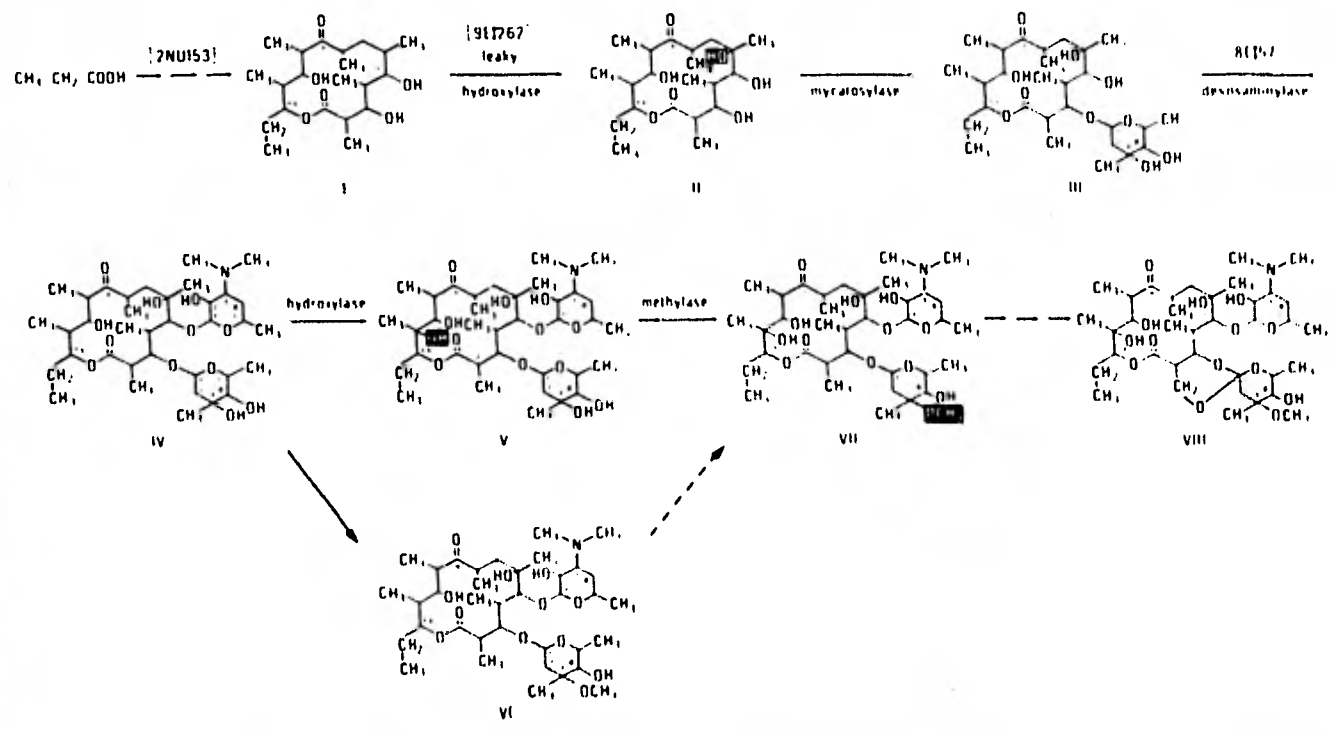
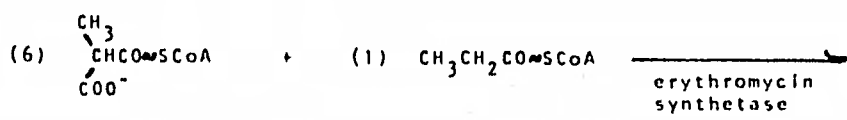
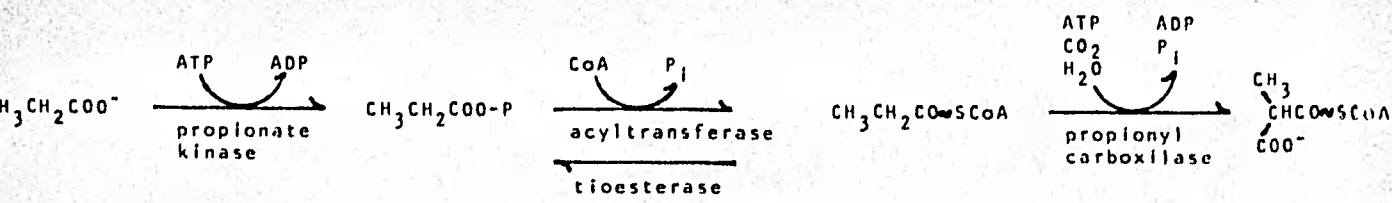
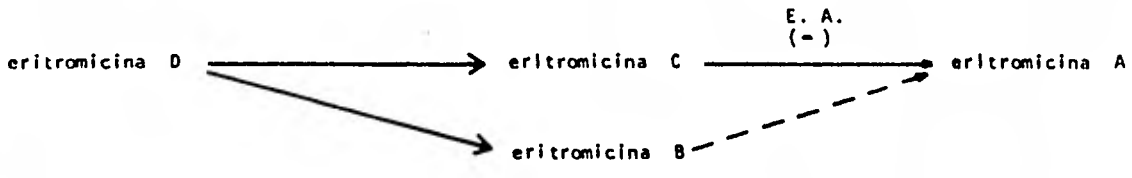
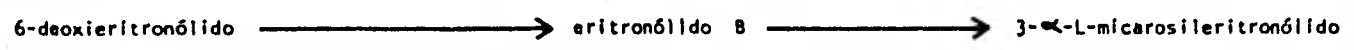
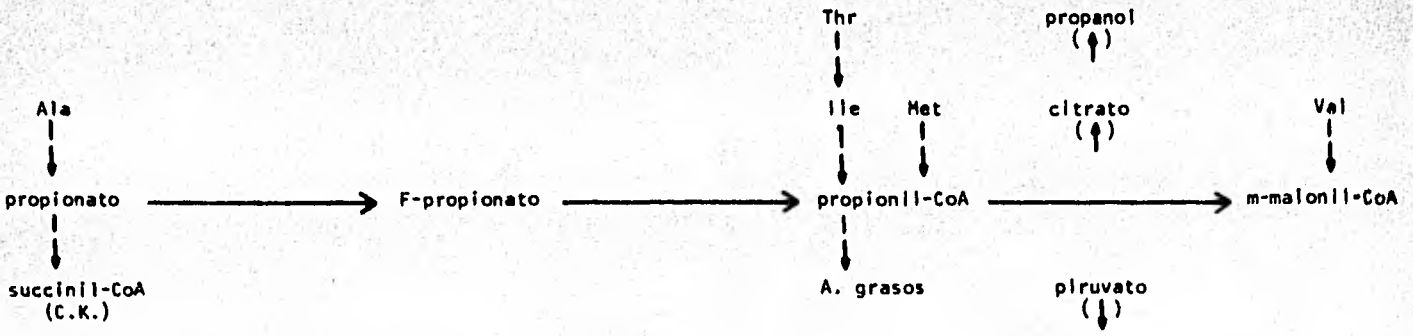


Figura 2 Vía de Biosíntesis de la Eritromicina. Adaptado de - Quener y cols. (1978).



EFACTORES POSITIVOS      EFACTORES NEGATIVOS

propanol	fosfatos
propionato	eritronólido B
ácidos grasos	

(↑)	inducción
(↓)	represión
(-)	inhibición

Figura 3 Regulación de la Biosíntesis de la Eritromicina.

CRECIMIENTO ( $A_{540}$ )

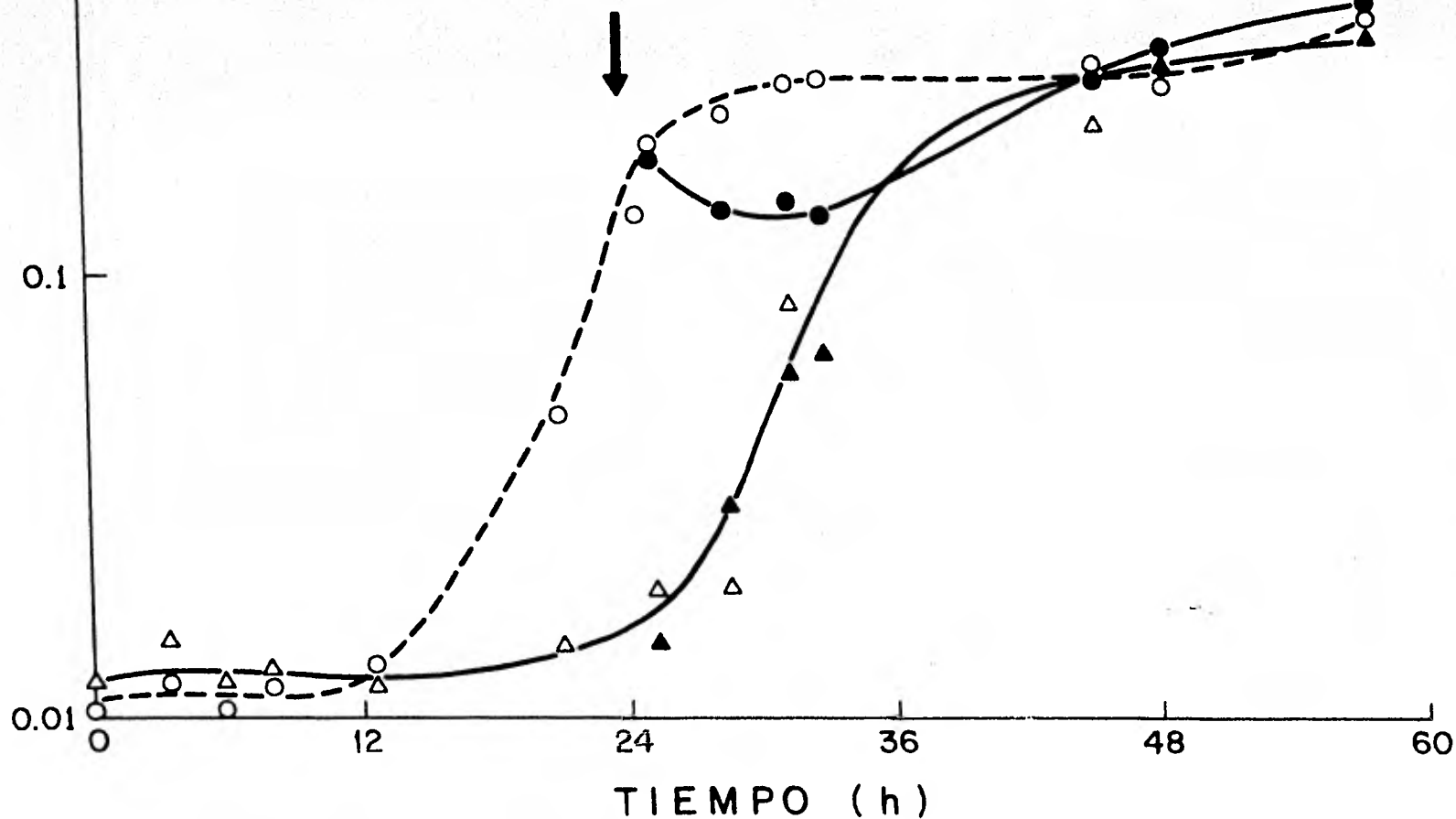


Fig. 4 Efecto de la eritromicina sobre el crecimiento de *Streptomyces erithreus*. Los cultivos fueron crecidos en presencia de eritromicina exógena como se indica posteriormente (200 ug/ml en cada adición) y en las condiciones experimentales referidas en materiales y métodos. Símbolos: ○ control sin antibiótico; ● adición del antibiótico a las 24 hs; △ adición del antibiótico a las 0 hs; ▲ adición del antibiótico a las 0 y a las 24 hs.

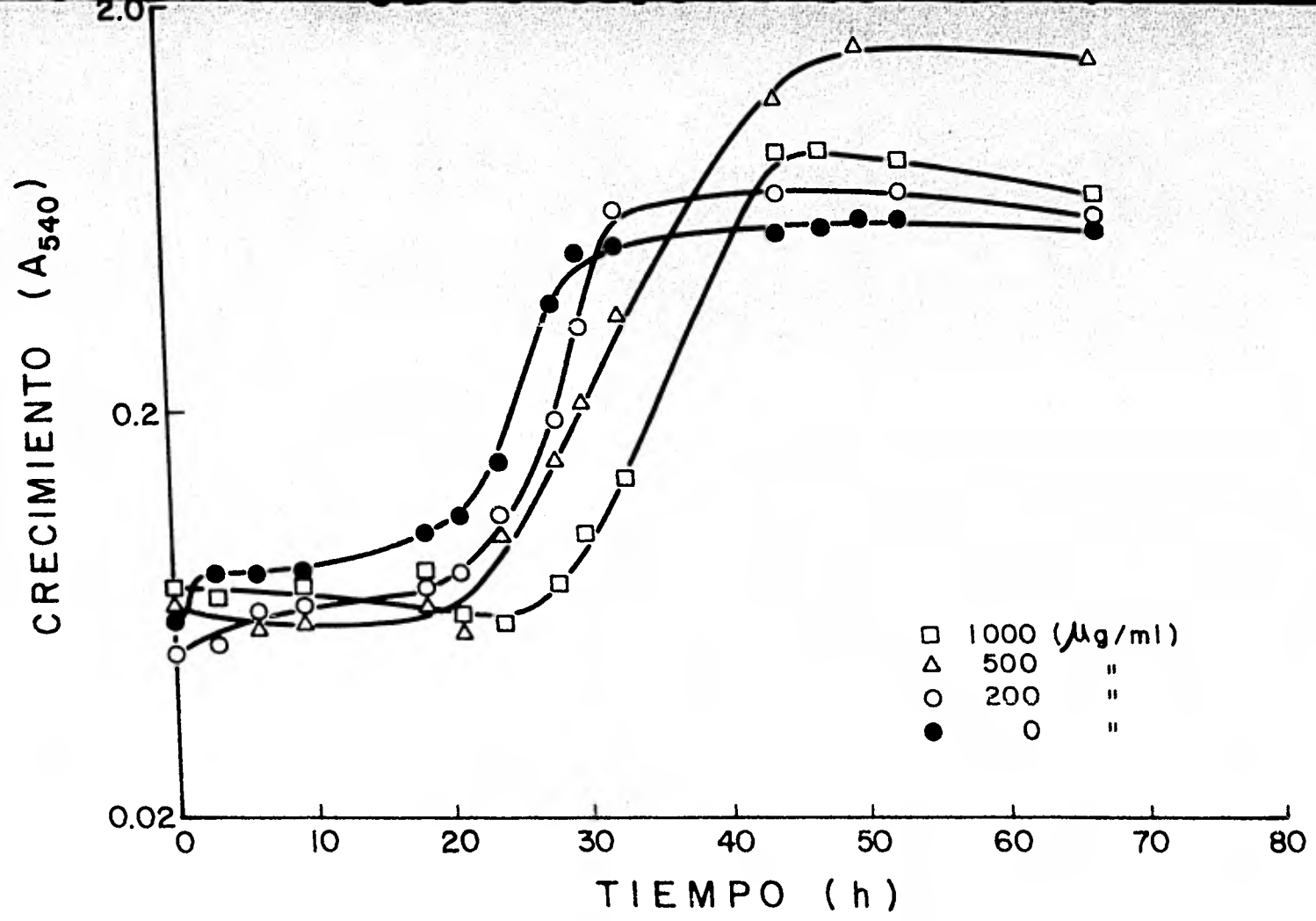


Fig. 5 Efecto de la eritromicina sobre el crecimiento de *Streptomyces erythreus*. Los cultivos fueron crecidos desde un principio con tres distintas concentraciones ( $\mu\text{g/ml}$ ) del antibiótico exógeno, y en las condiciones experimentales referidas en materiales y métodos. Símbolos: □ 1000; △ 500; ○ 200; ● control sin adición.

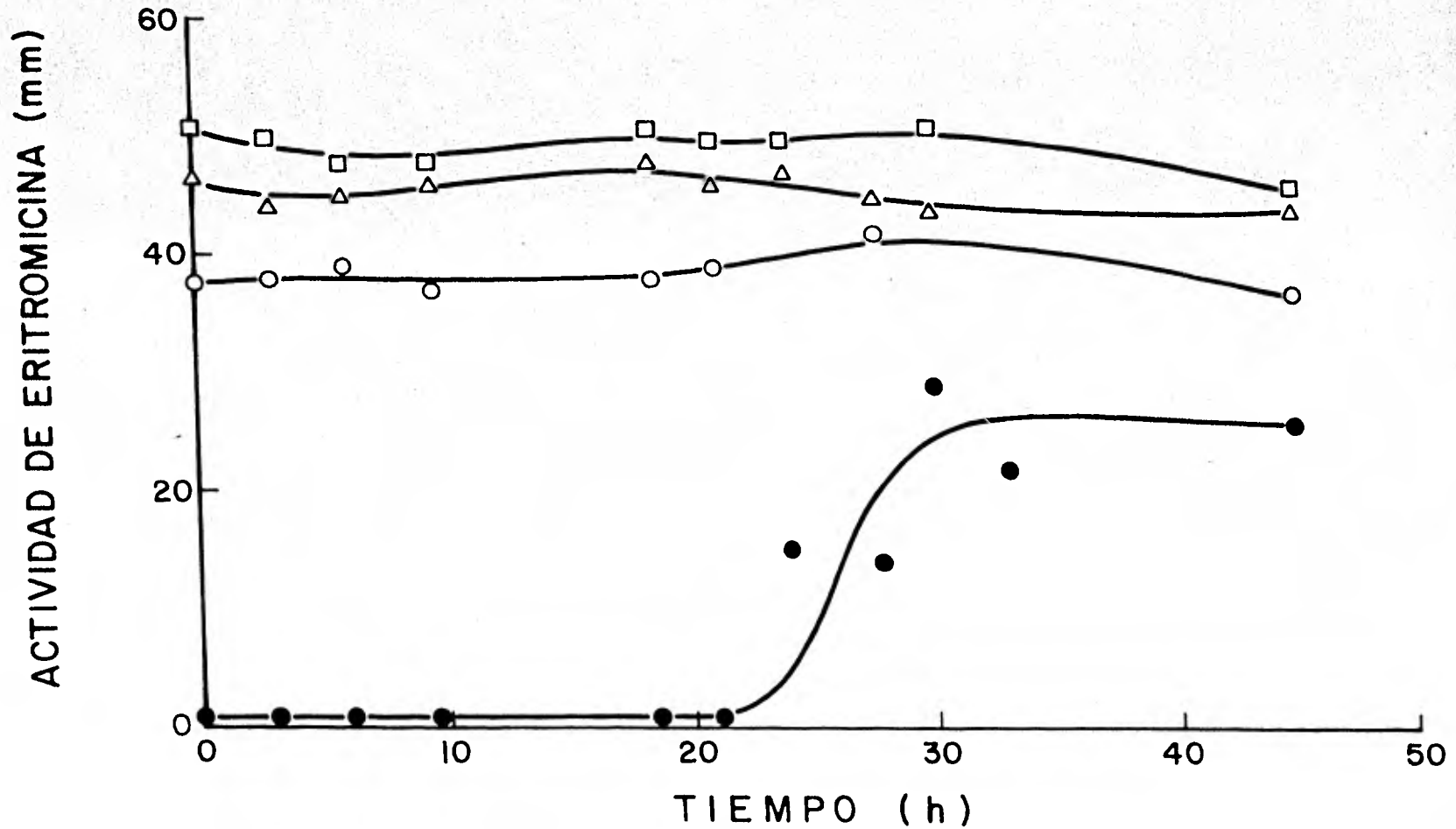


Fig. 6 Perfiles de Antibiosis de cultivos de *S. erythraeus* crecidos desde un principio en presencia de eritromicina exógena, en tres diferentes concentraciones ( $\mu\text{g/ml}$ ), mediante el ensayo microbiológico referido en materiales y métodos. Símbolos: □ 1000; Δ 500; ○ 200 ● control -- sin adición.

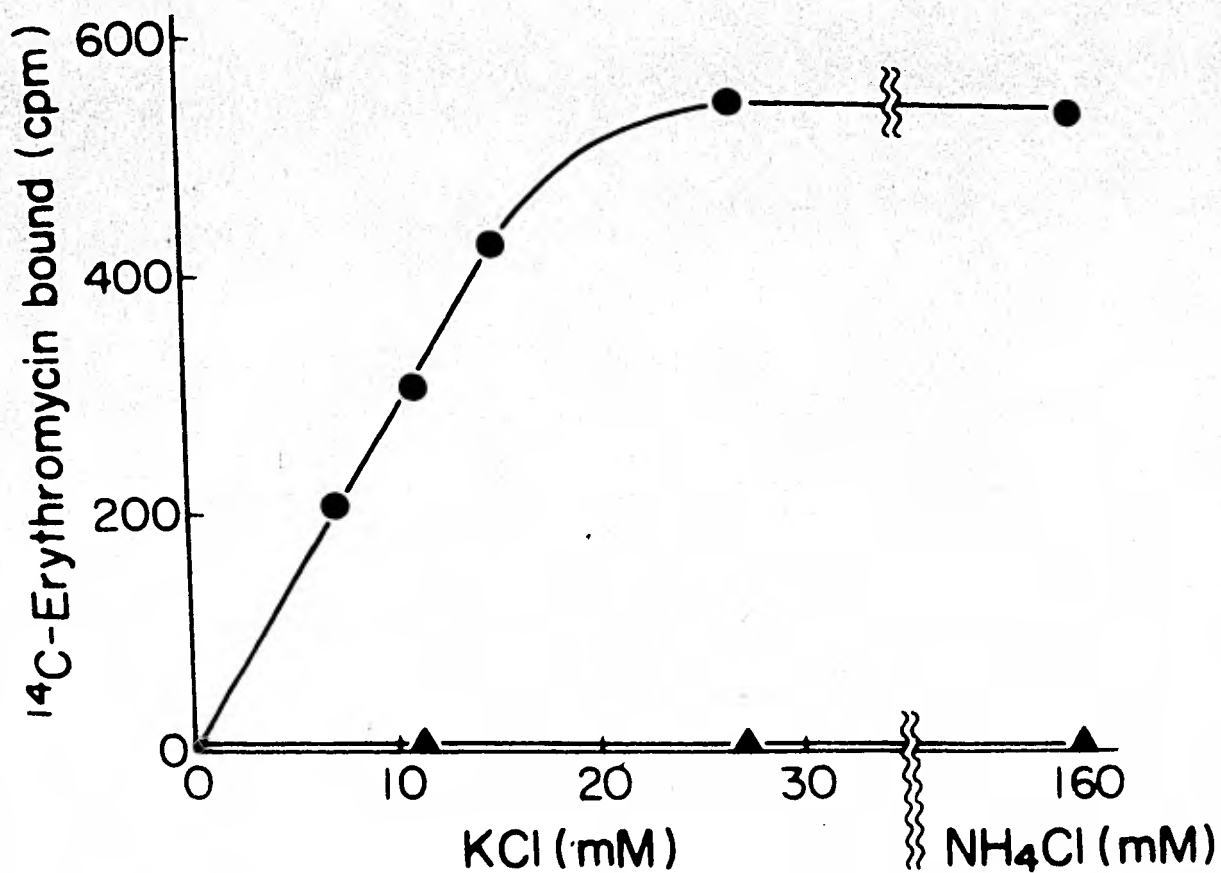


Fig. 7 Interacción de la eritromicina  $\text{C}^{14}$  con ribosomas de S. erythreus (▲) y S. griseus (●). La afinidad es dependiente de la concentración de KCl o de  $\text{NH}_4\text{Cl}$ . Fuente: Teoroaka H. y Tanaka K. (1974).

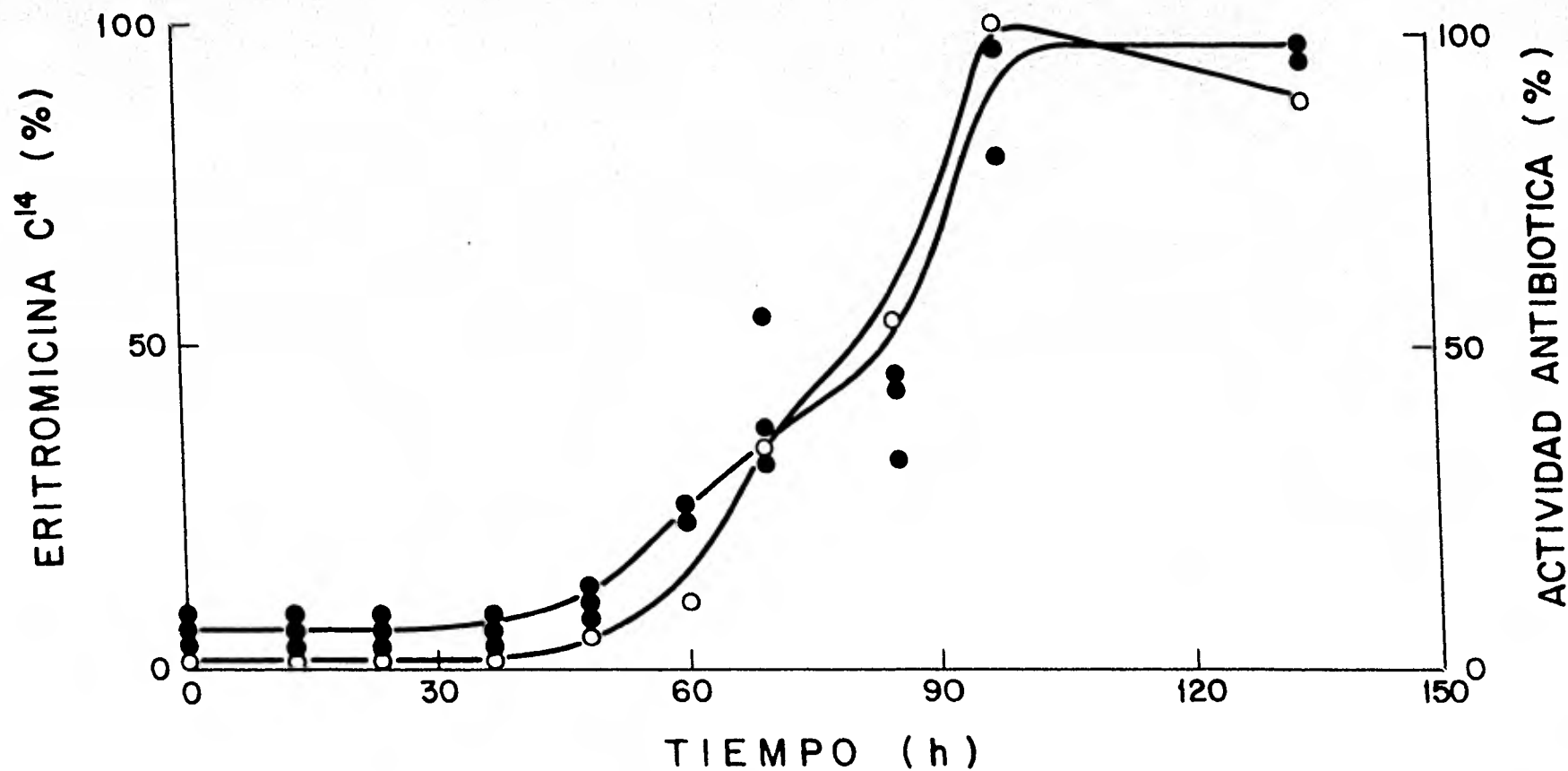


Fig. 8 Cinética de producción de eritromicina, por un cultivo de *S. erythreus* en condiciones normales. - Símbolo: ○ Producción volumétrica porcentual de Eritromicina C<sup>14</sup>; ● Producción volumétrica porcentual de Eritromicina, por su capacidad antibiótica. Mayores detalles en materiales y métodos.

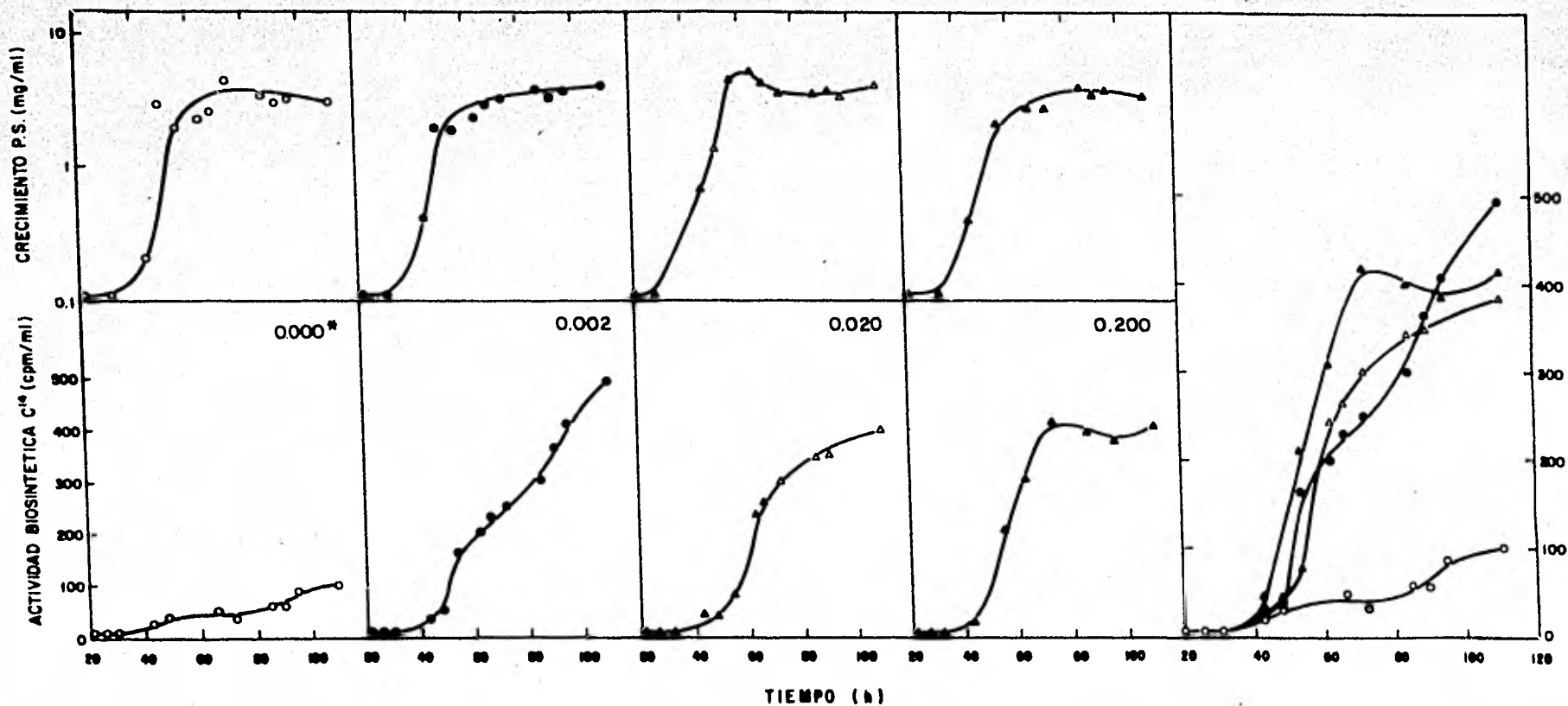


Figura 9 Efecto de la eritromicina A sobre la actividad metabólica de su vía de biosíntesis. En la serie de gráficas inferior se presentan las cinéticas de incorporación de propionato de sodio  $C^{14}$  en la eritromicina A y sus precursores inmediatos. Cada cultivo de *S. erythreus* fue incubado con eritromicina A exógena, no radioactiva en las siguientes concentraciones:  $\circ$  0.000,  $\bullet$  0.002,  $\Delta$  0.020 y  $\blacktriangle$  0.200 ( $mg\ ml^{-1}$ ). En la extrema derecha se presentan las cinéticas en conjunto. En la serie de gráficas superior, se tienen las curvas de crecimiento respectivas para cada cultivo. El crecimiento fue determinado por la concentración del peso seco micelial. Las técnicas de extracción y cuantificación se detallan en materiales y métodos.



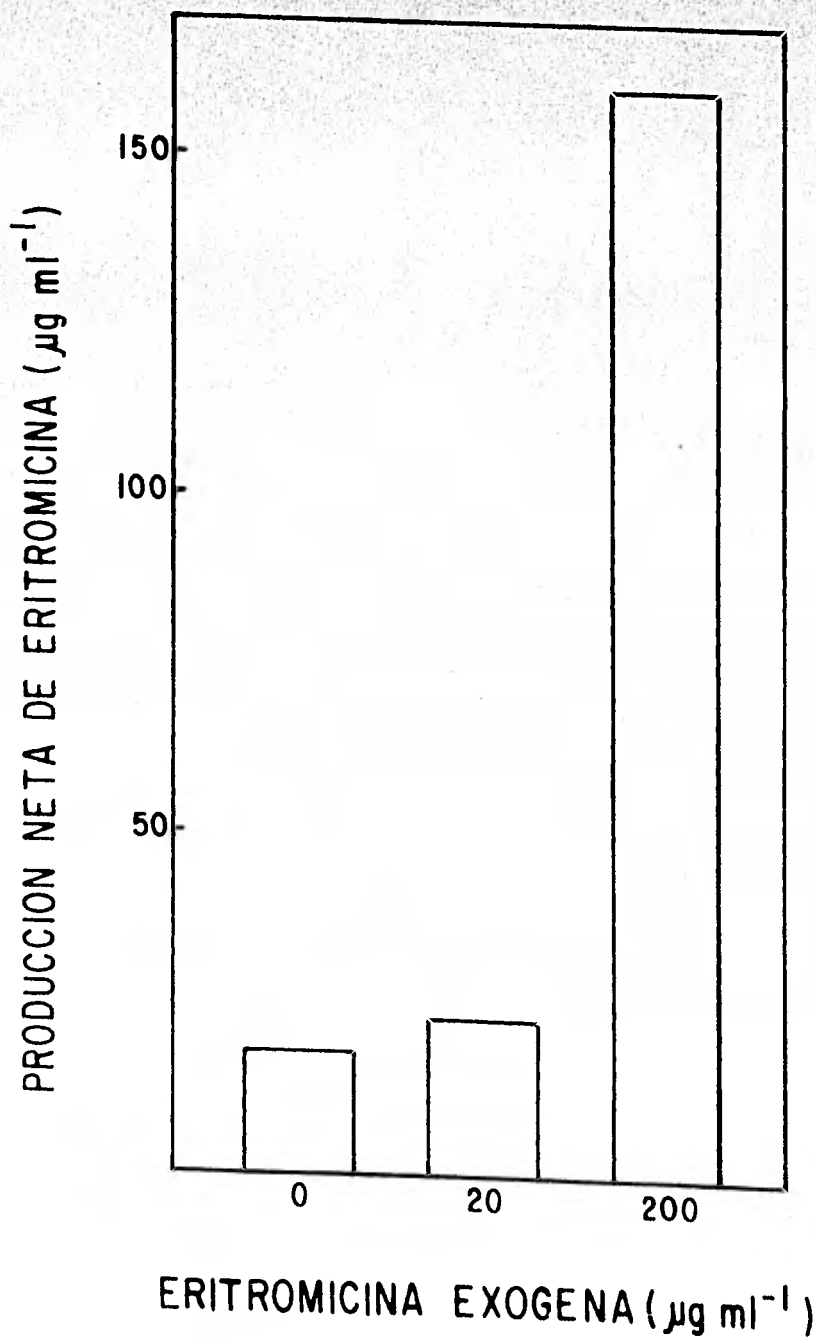


Fig. 10 Efecto de la eritromicina A sobre su biosíntesis. Mediante el ensayo microbiológico se calcularon las concentraciones netas de antibiótico, al momento de la máxima producción. Cada barra representa el valor promedio de triplicados de cultivos, expuestos a tres distintas concentraciones de eritromicina A exógena: 0, 20 y 200 µg ml<sup>-1</sup>.

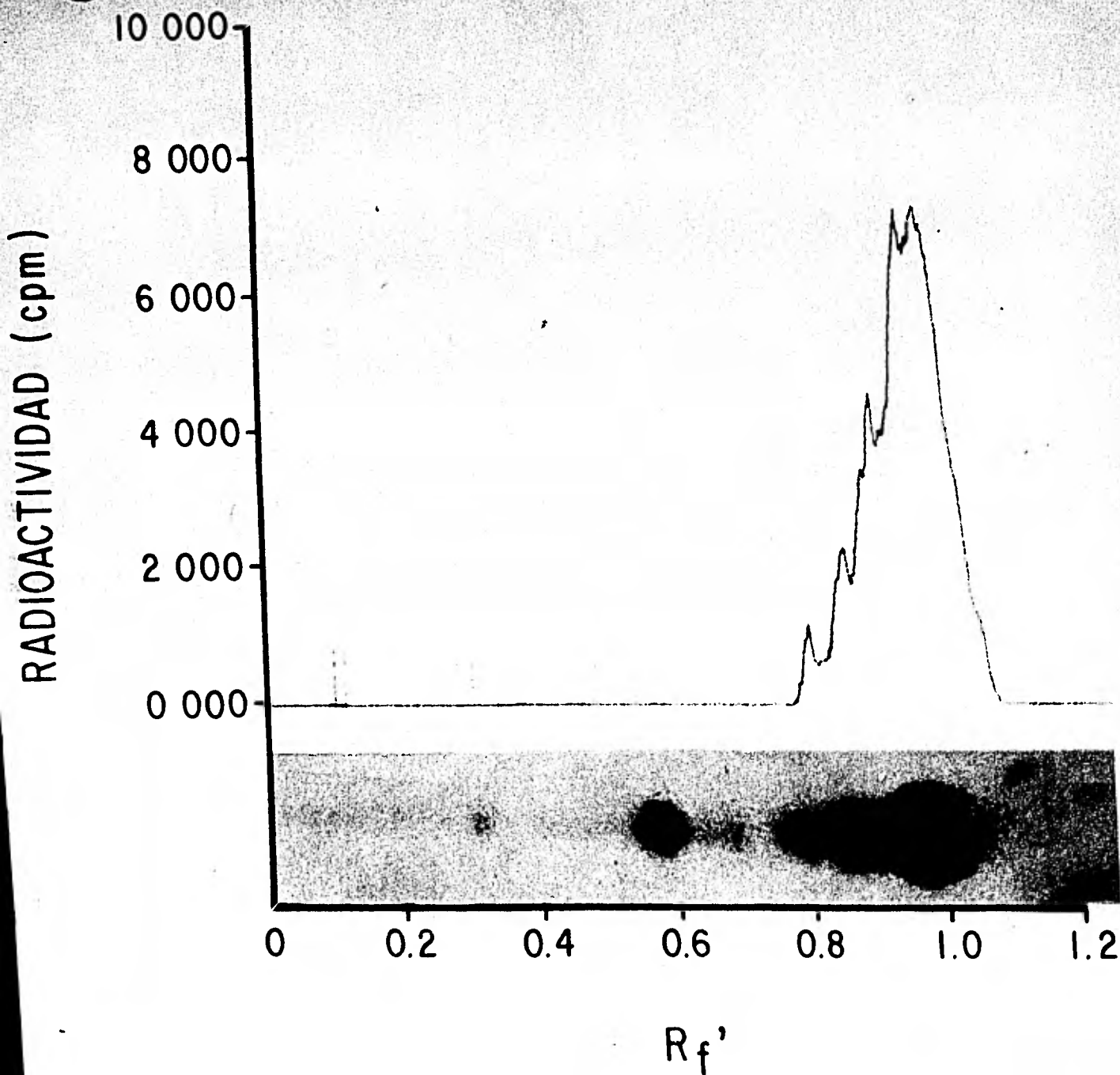


Figura 11. Cromatografía en capa fina de una alícuota equivalente a 10 ml de cultivo de *S. erythreus*. El microorganismo fué crecido en presencia de 50  $\mu\text{g ml}^{-1}$  de eritromicina A no radioactiva y de propionato de sodio  $\text{C}^{14}$  (5  $\mu\text{Ci } \mu\text{m}^{-1}$ , 200  $\mu\text{M}$ ). En la parte superior se presenta el perfil de radioactividad de la placa. La técnica cromatográfica y el tipo de extracción realizados, se describen en Materiales y Métodos.  $R_f'$  de la eritromicina A: 1.0.

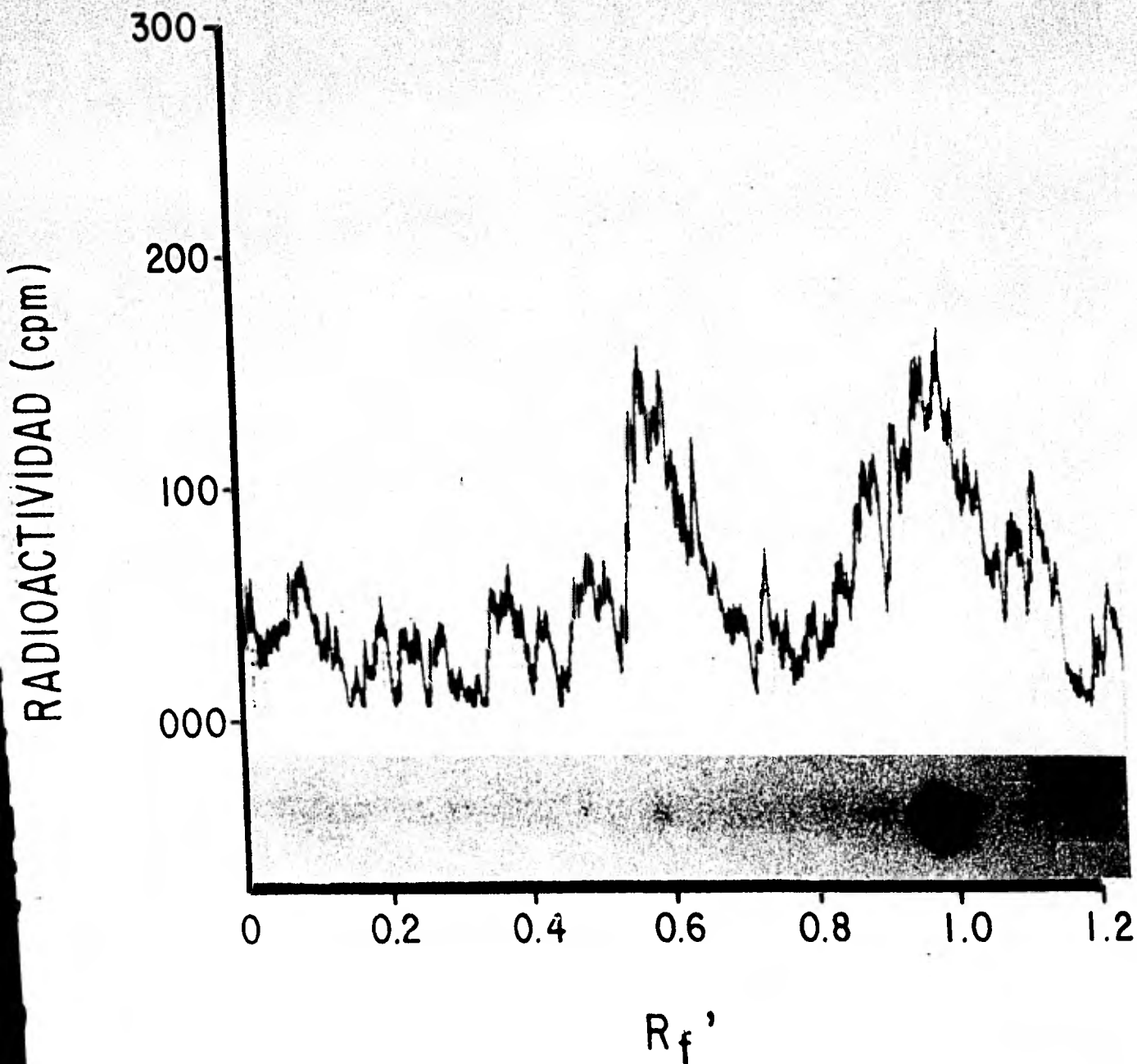


Figura 12. Cromatografía en capa fina de una alícuota equivalente a 10 ml de cultivo de *S. erythreus*. A diferencia de la cromatografía de la figura anterior, aquí el cultivo fue crecido en ausencia de eritromicina de origen externo y en el momento de la cromatografía se agregaron 20  $\mu$ g de eritromicina A (no radioactiva) como un control interno. Mayores detalles de las técnicas utilizadas se describen en Materiales y Métodos.

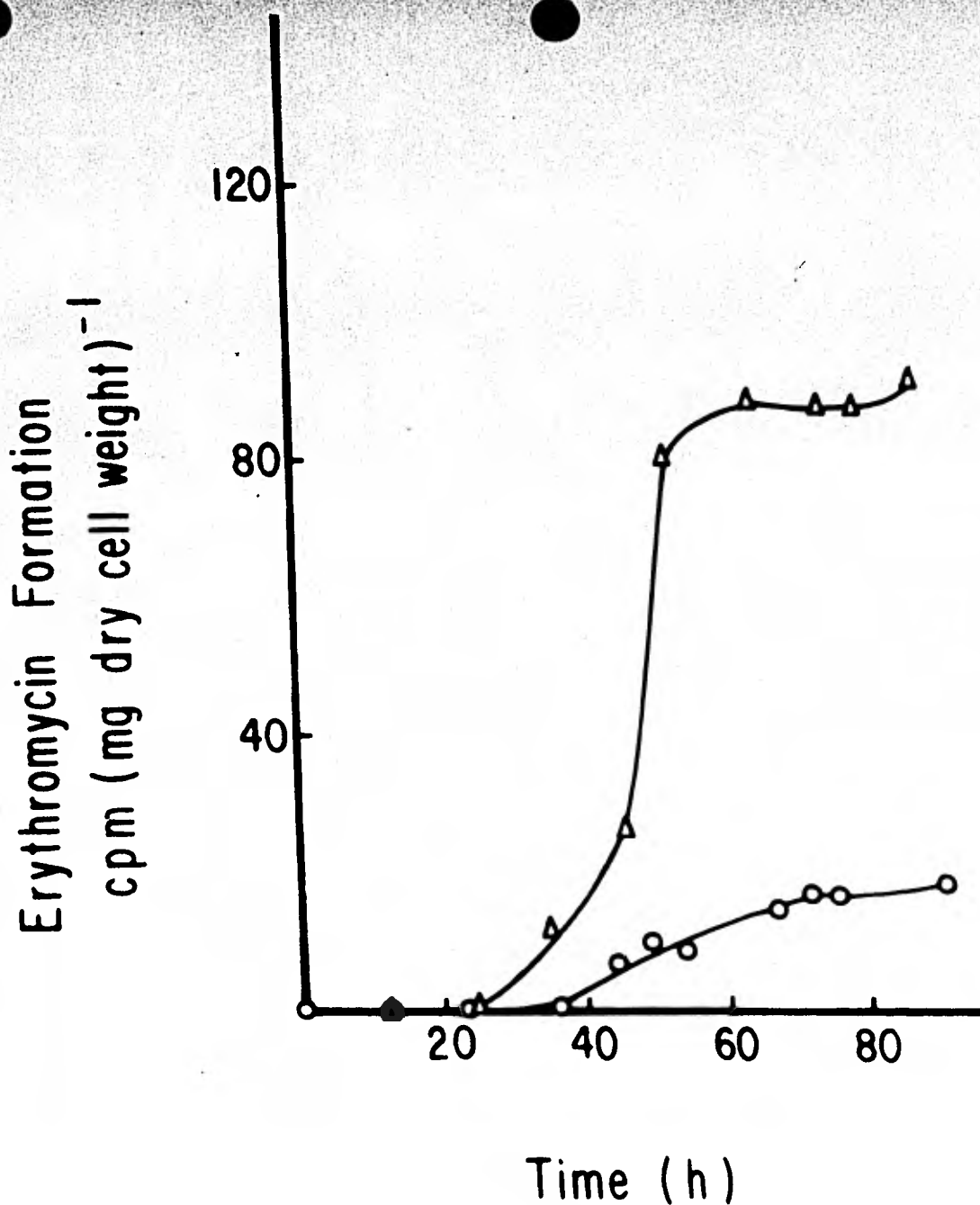


Figura 13. Efecto de la eritromicina A sobre su formación específica. Cinéticas de incorporación específica del precursor  $C^{14}$  en la eritromicina A y en sus precursores enzimáticos.  $\Delta$ : cultivo de *Streptomyces erythreus* con  $200 \mu\text{g ml}^{-1}$  de eritromicina A, exógena, no radioactiva.  $\circ$ : cultivo control, sin adición. Las técnicas de extracción y de cuantificación se detallan en Materiales y Métodos

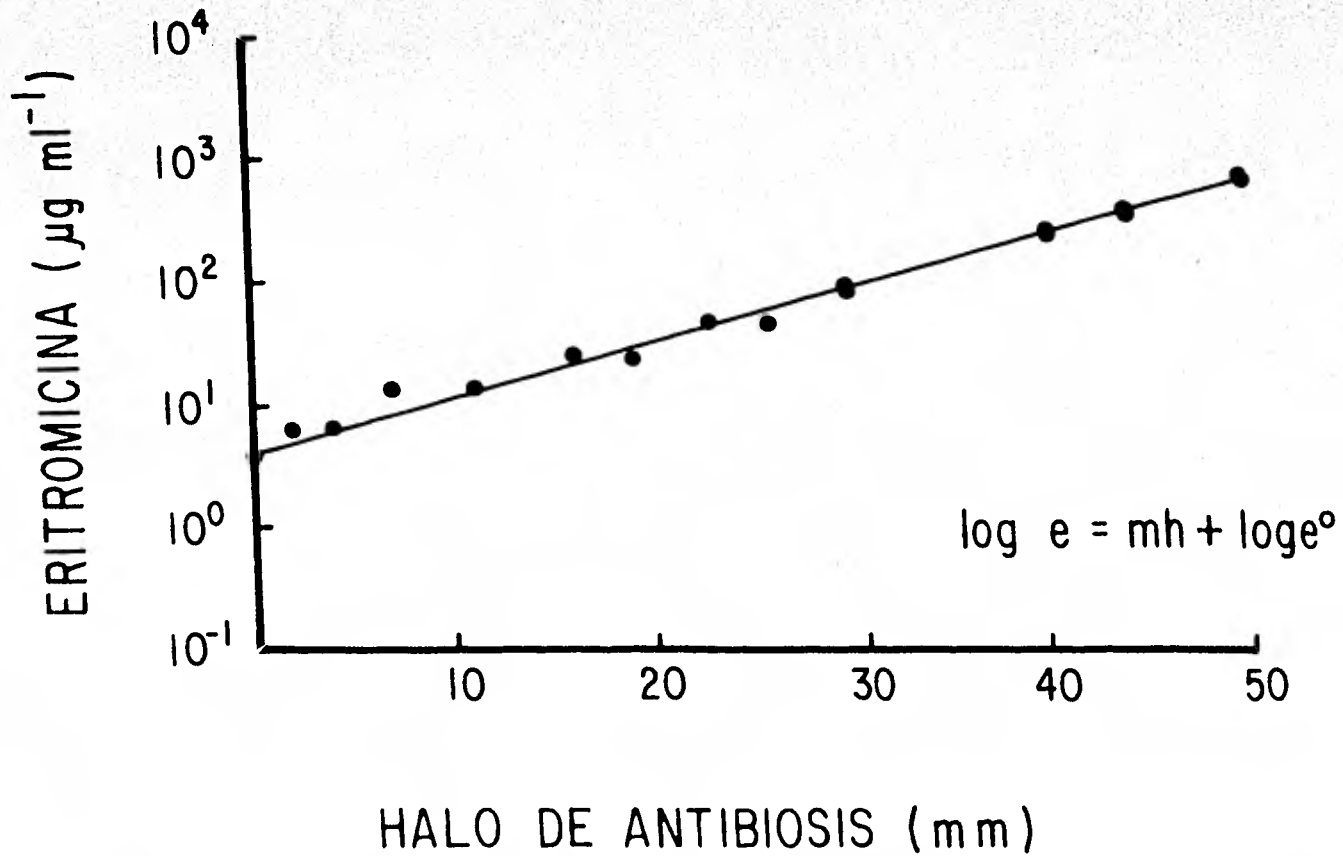


Fig. 14 Ensayo microbiológico de la actividad antibiótica de la eritromicina. Relación existente entre la concentración de eritromicina (e) y el halo de antibiosis observado (h), mediante la técnica de difusión en agar. "m", valor de la pendiente de la recta y "e<sub>0</sub>" valor de la ordenada en el origen. Coeficiente de correlación de los valores experimentales: 0.97.

T A E L A S

Tabla 1 Sensibilidad hacia la Eritromicina de Bacterias Gram-positivas de Interés Clínico.\*

Organismo	Concentración inhibitoria (ug ml <sup>-1</sup> )
<u>Streptococcus</u> Grupo A	0.01-0.1
<u>Streptococcus</u> Grupo B	0.2
<u>Streptococcus</u> Grupo D	0.2-6.3
<u>Pneumococcus</u> sp.	0.02-0.05
<u>Staphylococcus</u> <u>albus</u>	1.6
<u>Staphylococcus</u> <u>aureus</u>	0.4
<u>Sarcina</u> <u>lutea</u>	0.02
<u>Bacillus</u> <u>cereus</u>	0.4
<u>Bacillus</u> <u>subtilis</u>	0.5
<u>Clostridium</u> sp.	0.1-2.0
<u>Corynebacterium</u> <u>diphtheriae</u>	0.01-0.1
<u>Actinomyces</u> <u>israeli</u>	0.1
<u>Mycobacterium</u> <u>Kansastii</u>	0.5-2.0
<u>Mycobacterium</u> <u>tuberculosis</u>	1-10

\* Tomado de Finland et al. (1952); Fusillo et al. (1953); Hudson et al. (1956); Guy y - - -  
Chapman (1961); Molavi y Weinstein (1971).

Tabla 2 REGULACION POR EL PRODUCTO FINAL EN LA BIOSINTESIS DE ANTIBIOTICOS.\*

ANTIBIOTICO	REFERENCIA
Cloranfencol	Jones y Westlake, 1974
Cicloheximida	Komínek, 1975 a, b
A. Micofenólico	Muth y Nash, 1975
Aurodox	Liu y cols., 1975
Penicilina	Gordee y Day, 1972
	Revilla y Martín, 1977
Ristomicina	Egorov y cols., 1971
Virginiamicina	Yanagimoto y Terui, 1971
Puromicina	Sankaran y Pogell, 1975
Fungicidina	Spizek y cols., 1965
Candihexina	Martin y Mc Daniel, 1974

\* Adaptada a partir de Martín y Demain (1980).



Tabla 3 REGULACION POR CARBONO EN LA BIOSINTESIS DE ANTIBIOTICOS .

ANTIBIOTICO	FUENTE INHIBITORIA	FUENTE NO INHIBITORIA	REFERENCIA
Eritromicina	Glucosa	Lactosa, Sorbosa	Escalante, 1981
Penicilina	Glucosa	Lactosa	Johnson, 1952
Actinomicina	Glucosa	Galactosa	Gallo, 1972
Estreptomicina	Glucosa	Mananas, L-Ramnosa	Demain, 1970
Siomicina	Glucosa	Maltosa	Kimura, 1967
Indolmicina	Glucosa	Fructosa	Hurley, 1974
Bacitracina	Glucosa	Citrato	Haavik, 1974 a, b
Cefalosporina C	Glucosa	Sacarosa	Demain, 1963
Cloranfenicol	Glucosa	Glicerol	Smith, 1963
Violaceína	Glucosa	Maltosa	De Moss, 1967
Prodigiosina	Glucosa	Galactosa	Ramsey, 1973
Mitomicina	Glucosa	Glucosa*	Kirsch, 1967
Neomicina	Glucosa	Maltosa	Majundar, 1971
Kanamicina	Glucosa	Galactosa	Easak, 1973
Eniatina	Glucosa	Lactosa	Audhya, 1975
Puromicina	Glucosa	Glicerol	Sankaran, 1975
Novobiocina	Citrato	Glucosa	Kominek, 1972
Candidina	Glucosa	Glucosa*	Martín, 1974
Candihexina	Glucosa	Glucosa*	Martín, 1974
Butirosina	Glucosa	Glicerol	Howells, 1972
Cefamicina	Glicerol	Asparagina, Almidón	Aharonowitz, 1976
Tilosina	Glucosa	A. Grasos	Sprinkmeyer, 1977

\* Cultivos alimentados con bajas concentraciones de glucosa.

Tabla 4 CONTROL DE LA SINTESIS DE ANTIBIOTICOS POR-FOSFATO INORGANICO (Martín, 1977).

Antibiótico	Cepa Productora	Rango de ortofosfato - inorgánico que permite la producción de antibióticos (mM).
Estreptomina	<u>S. griseus</u>	1.5-15
Novobiocina	<u>S. niveus</u>	9-40
Monamicina	<u>S. jamaicensis</u>	0.2-0.4
Neomicina	<u>S. fradiae</u>	
Clortetraciclina	<u>S. aureofaciens</u>	1-5
Oxitetraciclina	<u>S. rimosus</u>	2-10
Vancomicina	<u>S. orientalis</u>	1-7
Viomicina	<u>S. sp.</u>	1-8
Eacitracina	<u>S. licheniformis</u>	0.1-1
Ristomicina	<u>P. fructiferi</u>	0.2-5
Actinomicina	<u>S. antibioticus</u>	1.4-17
Polimixina	<u>B. polymyxa</u>	
Tetraciclina	<u>S. aureofaciens</u>	0.14-0.2
Kanamicina	<u>S. kanamyceticus</u>	2.2-5.7
Cicloheximida	<u>S. griseus</u>	0.05-0.5
A-9145	<u>S. griseolus</u>	0.28-2.24
Piocianina	<u>P. aeruginosa</u>	0.1 <sup>a</sup>
Prodigiosina	<u>S. marcescens</u>	0.05-0.2
Butirosina	<u>B. circulans</u>	<5.6
Corineicinas	<u>C. sp.</u>	2.24 <sup>a</sup>
Oleandomicina	<u>S. antibioticus</u>	0.5 <sup>a</sup>
Gramicidinas	<u>B. brevis</u>	10-60
Gramicidinas	<u>B. brevis</u>	50 <sup>a</sup>
Cefamicina	<u>S. clavuligerus</u>	25
Amfotericina B	<u>S. nodus</u>	1.5-2.2
Aifactina	<u>S. aureofaciens</u>	1-17
Candicidina	<u>S. griseus</u>	0.5-5
Candidina	<u>S. viridoflavus</u>	0.5-5
Levorina	<u>S. levoris</u>	0.3-4
Micoheptina	<u>S. mycoheptinicum</u>	3.5 <sup>a</sup>
Nistatina	<u>S. noursei</u>	1.6-2.2
Ristomicina	<u>P. fructiferi var ristomycin</u>	<2.8
Eritromicina	<u>S. erythreus</u>	<4.0

<sup>a</sup> Concentración óptima de fosfato para la producción de antibiótico.

Tabla 5 CRECIMIENTO DE Streptomyces erythreus EN PRESENCIA DE ERITROMICINA.

Eritromicina * ( $\mu\text{g ml}^{-1}$ )	A/540 nm			Fase Lag. (h)	T.D.C. ** (h)
	0 h	24 h	30 h		
00	0.06	0.15	0.50	10	5.1
50	0.05	0.10	0.50	10	5.0
200	0.05	0.11	0.32	18	5.2
500	0.07	0.10	0.21	21	5.5
1000	0.07	0.06	0.10	24	5.1

\* Concentración de eritromicina exógena al inicio del cultivo.

\*\* Tiempo de Duplicación Celular, calculado en la trofofase. Coeficientes de correlación respectivos: 0.98, 0.84, 0.97, 0.93 y 0.98.

Tabla 6 Sensibilidad de Microorganismos Productores a su Propio Antibiótico.

Microorganismo	Antibiótico	Sensibilidad en Trofofase *	Resistencia en Idiofase *
<u>S. griseocarneus</u>	estreptomina	5	300
<u>S. antibioticus</u>	actinomicina	4	120
<u>S. parvulus</u>	actinimicina	4	100
<u>S. aureofaciens</u>	tetraciclina	400	2000 **

\*  $\mu\text{g ml}^{-1}$ .

\*\* por síntesis de proteínas.

Tabla 7 Efecto de la Eritromicina A sobre la actividad de su Vía de Biosíntesis. Uso de Propionato de Sodio y de Metil-malonil-CoA como Precursores Radioactivos.

Tiempo de Incubación con el Precursor.  (h)	Actividad Biosintética de Eritromicina (cpm mg <sup>-1</sup> P.S.)			
	Propionato de Sodio C <sup>14</sup>		Metil-malonil-CoA C <sup>14</sup>	
	con Eritromicina (200 ug ml <sup>-1</sup> )	Control	con Eritromicina (200 ug ml <sup>-1</sup> )	Control
0'	30.0	12.6	19.3	3.9
3	1030.0	135.4	19.8	4.4
15	3679.4	139.9	32.3	4.4

Cultivos de S. erythreus crecidos por 30 hs en presencia de 200 ug ml<sup>-1</sup> de eritromicina, - o sin ella en el caso de los controles, fueron incubados con propionato de sodio C<sup>14</sup> 200 -- uM y 0.62 uCi umol<sup>-1</sup>, o con metil-malonil-CoA 0.8 uM y 48.2 uCi umol<sup>-1</sup>. En los tiempos indicados en la tabla, se determinó la radioactividad de extractos del medio de cultivo. Vea se materiales y métodos para mayor detalle.

Tabla 8 Efecto de la Eritromicina A sobre la Actividad de su Vía de Biosíntesis.

Tiempo (h)	Eritromicina A Inicial no Radioactiva ( $\mu\text{g ml}^{-1}$ )				
	000	2	20	50	200
0	32*	35	26	27	36
	32		26		45
52	34	252	302	320	418
	36		270		298
140	86	495	373	399	510
	104		443		420

\* Radioactividad incorporada a la eritromicina ( $\text{cpm ml}^{-1}$  de medio) en distintos tiempos. -

Cada cultivo fue incubado con las concentraciones de Eritromicina A no radioactiva indica  
das en la tabla, desde un principio.

Tabla 9 Efecto de la Eritromicina A sobre su Biosíntesis.

Tiempo (h)	Eritromicina A (ug ml <sup>-1</sup> )			
	I	II	III	IV
	0	000*	2	32
30	017	6	53	184
Máxima Producción	017**	7**	55**	337**

Mediante el ensayo microbiológico, se determinó la concentración de eritromicina A en cuatro grupos de cultivos de S. erythreus, que fueron crecidos desde un inicio con eritromicina A exógena, en las concentraciones indicadas a las 0 h.

\* Valores promedio de tetraplicados.

\*\* Concentración de antibiótico al momento de máxima producción, en c/u de las cuatro - - condiciones.

## AGRADECIMIENTOS.

El trabajo experimental de la presente tesis fue realizado en el Departamento de Biotecnología del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la U. N. A. M.. Con especial agradecimiento al Dr. Sergio Sánchez por su paciencia, amistad y constante actitud formativa. A la Dra. Julieta Rubio, al Dr. Carlos Huitrón y a la M.en C. Ma. Elena Flores, por su entusiasmo y participación en el desarrollo de este proyecto. A la Dra. Ana Elena Pérez y al Dr. Gregorio Pérez Palacios, por su valiosa asesoría técnica. También estoy en deuda de gratitud con Laura Escalante por su apoyo en la realización de varios de los experimentos de este proyecto, y con la Sra. Carmen Guerrero por su valiosa colaboración en la edición de este trabajo.