135

Tel. 54(04)

U. N. A. M.

TESIS PROFESIONAL

ALICIA MARTINEZ ROSAS

MEXICO 1957.

Universidad Nacional Autónoma de México
UNAM
Biblioteca Central
Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

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.

54 (04)

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO
ESCUELA NACIONAL DE CIENCIAS QUIMICAS

IDENTIFICACION CROMATOGRAFICA DE ANTIBIOTICOS ANTIFUNGICOS

TESIS QUE PRESENTA PARA SU EXAMEN PROFESIONAL DE LA CARRERA DE QUIMICO

ALICIA MARTINEZ ROSAS

MEXICO, D. F.

1957.

Con todo cariño a mis padres:
Rafael Martínez Orduña y
Soledad Rosas de Martínez.

A mi hermano:
Raúl.

Mi especial agradecimiento al maestro:
Dr. Alfredo Sánchez Marroquín.

A mis maestros.

Al H. Jurado respetuosamente.

A mis familiares
compañeros y amigos.

Este trabajo se efectuó en el Laboratorio de Microbiología de la E.N.C.Q. bajo la dirección del maestro Dr. Alfredo Sánchez Marroquín.

CAPITULOS

I.—Introducción.

II.—Parte Experimental.

III.—Resultados y Discusión.

IV.—Resumen y Conclusiones.

V.—Bibliografía.

CAPITULO I

INTRODUCCION

Se han dado diferentes definiciones de Antibióticos, las cuales han motivado toda una serie de discusiones e inconformidades, por lo que se ha propuesto fijar ciertos requisitos, de modo que un antibiótico será aquél que satisfaga las siguientes condiciones: (2).

a).—Es un producto o derivado metabólico (aunque pueda ser elaborado y aún haber sido anticipado por síntesis Química).

b).—Antagoniza el desarrollo o supervivencia de una o más especies de microorganismos.

c).—Es efectivo desde bajas concentraciones.

Esta serie de condiciones presedentes no deben interprétarse rigurosamente, pues dichos conceptos no podrían circunscribirse exclusivamente a los factores bioactivos elaborados por los gérmenes.

Las primeras observaciones relativas al antagonismo microbiano fueron hechas por Pasteur, Joubert (11) y De Bary, tales experiencias se iniciaron superficialmente, habiendo progresado más tarde gracias a los trabajos de Duchesne de los cuales resultó que varios hongos del género de Penicillium anulan el desarrollo de algunas bacterias. (20).

Frost (11), consideró que el suelo era una sede pródiga de microorganismos antagonistas del grupo de los **Actinomycetes**, gérmenes con caracteres intermedios entre los hongos inferiores y las Micobacterias, y cuyas especies antibióticas más frecuentes suelen incluirse dentro de un género que Waksman y Henrici han llamado **Streptomyces**.

En 1940 Waksman y Woodruff (20) partiendo de **Etreptomy-**

ces **Antibioticus** encontraron la actinomicina y posteriormente se ha visto que el estudio de especies diferentes de este género de **Streptomyces** ha llevado al aislamiento de gran número de nuevos antibióticos tales como estreptomicina, cloromicetina, terramicina, aureomicina, viomicina, eritromicina, oleandromicina, magnamicina, etc.

Describimos brevemente los que se lograron identificar en el curso del presente trabajo.

1.—**Actinomicina.**—(3) (18) Es un antibiótico compuesto por un grupo cromóforo de fórmula C_{15} H_{11} O_3 N adoptado de la fórmula de la azantraquinona. Se encontró una diferencia en la composición de los aminoácidos de la parte péptida de las moléculas. La actinomicina I_2, I_1, C, X_1 y X_2 contienen, 1-trionina, sarcocina 1-prolina, d-valina y 1 N-metil valina. La actinomicina C contiene d-isoleucina en lugar de d-valina; en el caso de la actinomicina C_3 se encuentran los seis aminoácidos.

Estos antibióticos contienen dos moléculas de 1-prolina, una de 1-triolina una de d-isoleucina y cuatro de aminoácidos N metilados (sarcocina, y N-metil valina).

2.—**Neomicina.**—La Neomicina es una substancia producida por **Streptomyces fradiae** (19).—Es soluble en agua, tiene carácter básico y es relativamente resistente a la acción del calor y a la descomposición microbiana. La Neomicina no es un antibiótico simple si no que está compuesta de dos o más substancias que son designadas como neomicina A, neomicina B, etc., teniendo cada una diferentes potencia de unidades por miligramo, la neomicina A tiene una fórmula empírica de C_{12} H_{26} N_4 O_6 (3). De estas neomicinas la Química Moderna tiene estudiada a la neomicina B; su estructura no está bien determinada pero las preparaciones más puras y de mayor valor contienen C H N y S siendo activa contra una variedad de bacterias ácido resistentes; no tiene efecto contra virus verdaderos.

La neomicina contiene factores nefrotóxicos; los cuales parecen ser parte activa de impurezas y parte de otra droga presente. En el hombre los factores tóxicos pueden reportar varias complicaciones que divesos investigadores encontraron en diferentes lotes de material (16).

Ia neomicina es efectiva en el tratamiento de la tuberculósis,

aunque estudios preliminares no han demostrado que sea superior a la estreptomicina. La neomicina es rápidamente absorbida en inyecciones intramusculares por el hombre en proporción de microgramos por mililitro que son mantenidos por lo menos ocho horas en una dósis de 1,0 mg., que es eliminado al cabo de este tiempo por la orina (16).

Neomicina ha sido usada con gran éxito en el hombre en el tratamiento de infecciones urinarias e intestinales.

3.—**Estreptotricina.**—En el año de 1941 surgió la estreptotricina separada de los productos metabólicos de **Streptomyces levandulae** por Waksman, Woodruff y Horning (20). Pero más adelante con el advenimiento de estreptomicina extraida de cultivos de **Streptomyces griseus** por Schatz, Bugie y Waksman (20 quedó olvidada la anterior. El análisis el haliantato cristalino y el cloruro amorfo de la estreptotricina indica que tiene una substancia tribásica con una fórmula empírica $C_{\ }H_{\ }N_{\ }O_{\ }$ (3). Al quedar descartada la estreptotricina resultó más útil la estreptomicina a causa de su mayor espectro antimicrobiano y por presentar menos efectos indeseables, los cuales se atenuaron aún más al reducirla hasta dihidro-estreptomicina, usádose con frecuencia bajo la forma de sales solubles con agua, que se absorben más o menos rápidamente.

4.—**Viomicina.**—Viomicina es el nombre dado a un antibiótico producido por **Streptomyces puniceus.** Es una substancia básica, orgánica, muy fuerte y moderadamente estable a temperatura normal en soluciones acuosas a un pH 5 a 6. Ha sido obtenida en forma cristalina y contiene C H N y SO_4. Es similar a la estreptomicina en algunos aspectos; es activa contra M. tuberculósis Estreptomicino resistente aunque representa efectos tóxicos similares a aquellos encontrados para la estreptomicina, pues han sido observados varios signos análogos de intolerancia.

A causa de su toxicidad y grado de actividad contra el bacilo tuberculoso es improbable que esta droga llegue a reemplazar a la estreptomicina en el tratamiento de la tuberculósis.

5.—**Eritromicina.**—La eritromicina es un nuevo antibiótico producido por un organismo que originalmente fue aislado de una muestra de suelo procedente de las Filipinas e identificado por su morfología y cultivos característicos, como **Streptomyces erithreus**

Waksman. Un grupo de investigadores de los laboratorios Lilly han reportado sus características químicas y biológicas.

El antibiótico se obtiene en forma cristalina cuando se extrae con reactivos adecuados, de filtrados de cultivos bien desarrollados de este organismo, con una proporción de 2 mg., por centímetro cúbico pero su más alta solubilidad está en el alcohol y otros solventes orgánicos. Su peso molecular se estima cercano a 725, su fórmula empírica se dá como: C_{34}-H_{63}-NO_{11}-$_{14}$. Los resultados de pruebas "in vitro" por aquellos investigadores, mostraron que los organismos gram-positivos incluyendo tipos de **M. pyogenes var aureus** que eran resistente a otros agentes antimicrobianos, fueron muy sencibles siendo inhibidos por concentraciones menores a un micro gramo por ml. (9).

Algunos tipos de organismos gram-negativos, tales como **Nesseria Hemophilus** y **Brucela**, también son inhibidos por seis microgramos.

Antibióticos antifúngicos. (21) se han aislado buen número de antibióticos de acción antifúngica como nuevos agentes quimoterapéuticos. Las propiedades antifúngicas de estos materiales se consideran interesantes pues su importancia va creciendo a medida que son aplicados en medicina clínica, humana y animal, así como en fitopatología.

Por este interés tan reciente de los agentes antifúngicos, se han aislado gran cantidad de estos compuestos a partir de cultivos de bacterias y **Actinomycetes** como se indica en las V, VI y VII (22).

Los productos bacterianos son principalmente polipéptidos e igualmente lo son las substancias elaboradas por **Actinomycetes** del género **Streptomyces.** A continuación mencionamos tres de las aplicaciones importantes que presentan los antibióticos antifúngicos.

a).—Para combatir las infecciones fúngicas (por ejemplo las causadas por **Candida albicans.** (10).

b).—Para controlar, si no completamente, por lo menos desarraigar varias infecciones superficiales y profundas causadas por hongos.

c).—Para controlar las enfermedades de las plantas.

El descubrimiento de antibióticos efectivos para enfermedades humanas o animales originadas por bacterias, hace esperar que

en un futuro próximo se logre el descubrimiento de agentes activos contra hongos patógenos de las plantas.

Varios de los antibióticos que han llegado a aislarse de cultivos de diferentes microorganismos, pueden ser divididos en ciertos grupos bastante amplios, tomando como base sus respectivos espectros antimicrobianos.

a).—Antibióticos que tienen la capacidad de inhibir el crecimiento de bacterias y hongos. Las variaciones de actividad de estos organismos son al mismo tiempo cuantitativas y cualitativas, dependiendo su espectro específico de la presencia de una o varias substancias. A este grupo pertenecen un gran número de compuestos producidos por hongos, **Actinomycetes** y bacterias, tales como gliotoxina, actinomicetina, estreptotricina, y tirotricina. Con grandes variaciones en su naturaleza química, espectros antibióticos, y toxicidad para los animales.

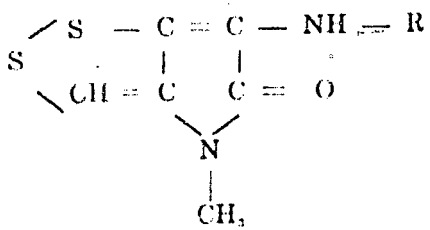
b).—Antibióticos que son activos contra bacterias y **Actinomycetes** principalmente y que sólo tienen un grado leve de acción sobre hongos. Este grupo incluye la mayoría de los antibióticos quimoterapéuticos, más notables como penicilina, estreptomicina, aureomicina, terramicina y neomicina.

c).—Antibióticos que son activos fundamentalmente contra hongos y solo en un grado muy limitado, sobre bacterias y **Actinomycetes**. Este grupo de substancias parece que es el más significativo desde el punto de vista de su uso en el tratamiento de enfrmedades fúngicas. Estas substancias también tienen grandes variaciones en su naturaleza química, espectro antifúngico, y toxicidad sobre animales.

La amplia distribución de agentes antifúngicos entre los **Actinomycetes** fue confirmada por Cooper y Chilton (4) y por numerosos investigadores. El origen, naturaleza química y actividad de estos antibióticos, se encuentran explicados en la tabla V (22).

Cualquier correlación entre la actividad de los antibióticos frente a diferentes microorganismos (o combinación de ellos) y su estructura química es impedida por la falta de información suficiente respecto a la exacta composición química de estas substancias (22). Unicamente se conoce la estructura de dos agentes específicos activos contra hongos entre más de treinta compuestos. Estos dos antibióticos son la cicloheximida o actidiona y la tiolu-

tina; la tiolutina (3) se caracteriza como una acetamida, producto de la hidrólisis del $C_6 H_6 N_2 O S_2$ de la siguiente fórmula:



Finalidad del presente trabajo.—Las experiencias realizadas en este estudio, han tenido por objeto la identificación cromatográfica de algunos agentes antibióticos que se obtuvieron al cultivar algunas cepas de **Streptomyces** en diferentes medios líquidos.

Teniendo como base siete cepas de **Streptomyces**, convencionalmente como: B-9, B-12, M-2, A, B-6, R-7 y 5014, las cuales fueron aisladas por el doctor Alfredo Sánchez Marroquín (director de la presente tesis) de muestras de suelo de varios estados de la República.

De todas y cada una de estas cepas se obtuvieron cuatro antibióticos, con excepción de la cepa R-7 que mostró dos valores Rf, los cuales se reservan para estudios posteriores, y la cepa B-6 que mostró un solo valor Rf el cual no nos orientó a la identificación de ningún antibiótico.

Los antibióticos obtenidos por los métodos que más adelante se describen, fueron identificados claramente por el método cromatográfico el cual nos da valores específicos del Rf para reconocidos antibióticos fungicidas, que pueden ayudar a la búsqueda de nuevas substancias de la misma índole. Con frecuencia dichos valores en combinación con las demás pruebas físico-químico-biológicas, constituyen el criterio para determinar si el material aislado resulta nuevo o si ya ha sido reportado. Cuando los datos del Rf se obtienen con respecto a cultivos bajo agitación, se pueden eliminar de posterior estudio muchos organismos productores de antibióticos previamente descritos.

Martín y colaboradores (8), fueron los primeros en aplicar una técnica de separación de amino-ácidos en micro escala, usando papel filtro en lugar de Gel de Sílice. Goodall y Levi (8) aplicaron este procedimiento para identificación de penicilina, usando papel como fase estacionaria, y un procedimiento microbiológico para determinar aproximadamente los tipos y valores totales de la penicilina en tiras de papel colocadas en medios apropiados sembrados con el gérmen de prueba.

Más o menos cinco microlitros de la solución que se va a probar se ponen en cada una de las tiras de papel filtro, las cuales se colocan para el desarrollo cromatográfico en una cámara especial. Es preferible tener una reserva de solvente cada vez que se use.

La colocación y arreglo se hacen procurando una atmósfera del vapor del solvente en el aparato, dejando saturarse las tiras en este ambiente durante un tiempo de doce horas antes del desarrollo.

La extención del revelado obtenido, está en relación con el tipo de solvente usado; se pueden emplear varios solventes, como se observa en la figura No. 1 en la que aparece una serie de ellos para la identificación de diferentes antibióticos. Además en el capítulo II, se describe el método para este reconocimiento y el uso de distintos solventes. Después de 20 a 24 horas, disminuye el solvente del depósito; la disposición y el total de cada zona de penicilina invisible, se determina por la técnica biológica.

Goodall y Levi (8) usaron esta técnica en la separación de las penicilinas; después de este tiempo ha sido empleado este método de una manera más substanciosa. Algunos de los antibióticos polipeptídicos han sido posteriormente separados por cromatografía. Como ejemplo de estos tenemos; bacitracina, tirotricina y viomicina (1953).

Como anteriormente hemos dicho, las experiencias realizadas en este estudio se han basado sobre la identificación de antibióticos antifúngicos, que presentaron así mismo acción antibacteriana obtenidos de diferentes cepas de **Streptomyces** por métodos que ha continuación se describen.

CAPITULO II

PARTE EXPERIMENTAL

Con objeto de que los resultados obtenidos en este estudio resultaran favorables, fue necesario manipular dentro de las más estrictas condiciones de esterilidad, para evitar contaminaciones. Sabiendo que este procedimiento es la completa destrucción de los microorganismos, por medio del calor, filtración o de otros métodos físicos.

Conservación de las cepas.—Las cepas en estudio para el presente trabajo, fueron proporcionadas por el laboratorio de Microbiología de la E.N.C.Q., aisladas de diferentes muestras de suelos de varios estados de la República y consideradas bajo las siguientes designaciones: B-9, B-12, M-2, A, B-6, B-7 y 5014. Dichas cepas de **Streptomyces** fue necesario mantenerlas en un estado de constante actividad antimicrobiana, para esto fue indispensable tenerlas en un medio nutritivo y fresco en el cual presentaran un buen desarrollo, tales como los medios de Czapeck (1), Gelosa simple (1) y el de trigo. Estos substratos se alojaron en tubos de ensaye que después de esterilizados convenientemente, se dejaron solidificar de modo que presentaran la máxima superficie inclinada, sobre la cual se sembraron los **Streptomyces** en estría ondulada incubándose a 28° C. hasta obtener un buen crecimiento.

Cada cepa presentó diferentes características conforme iba pasando el tiempo, por lo que fue necesario resembrarlas en varios tubos con medios frescos para que retuvieran por regular tiempo, no solamente la propiedad de proliferar, sino también toda su actividad antimicrobiana original.

Bioactividad de los Streptomyces.—Para determinar la acti-

vidad de las cepas de Streptomyces durante los experimentos, se siguieron dos métodos, que son a saber:

1.—Método de las estrías cruzadas.

2.—Método de los discos de papel.

Método de las estrías cruzadas.—(7) Se llevó a cabo en caja Petri en la cual se vació con anterioridad un medio de Gelosa simple (1), esperando a que ésta solidificara y se enfriase para poder sembrar en la caja uno de los **Streptomyces** en forma de estría ancha dispusta en tal forma que ocupara el diámetro de la placa, luego se colocan en una estufa que ha sido previamente ajustada a una temperatura de 28 C. para incubar durante tres días los **Streptomyces**, al cabo de los en cada una de las Cajas Petri que contenían por separado diferentes **Streptomyces** se sembraron en las inmediaciones de la cepa y en forma perpendicular otras siete estrías rectas y separadas entre sí lo más posible, para poder ver el efecto de la cepa sobre ellas, ya que estas segundas son siembras de: Saccharomyces sp., Candida albicans, Bacillus oxálycum y Mycobacterie Plhei, una vez así preparadas las placas volvieron a introducirse en la estufa a la misma temperatura, o sea a 28 C. en la cual permanecieron durante 48 horas, al cabo de las cuales se vieron los resultados.

Suspensión del inóculo.—Una vez que se han obtenido los resultados de bioactividad de las cepas de Streptomyces por el método de las estrías cruzadas, se procedió a obtener una suspensión de esporas en tal forma, que se tuviera un número máximo de ellas lográndose ésto por medio de perlas de vidrio y agua estéril. Se tomó un ml, de cada uno de los microorganismos suspendidos, por medio de pipetas que fueron esterilizadas y preparadas para usarlas en la siembra de la susensión en diferentes medios líquidos que se emplearon en el ensayo. (13) (14).

Medio 2.—Glucosa 25 g. Extracto de carne 10 g en 1000 ml de agua de la llave y a un pH de 7.5

Medio 3.—Glucosa 25 g. Extracto de levaduras 10 g en 1000 ml de agua de la llave a un pH de 7.5

Medio 5.—Glicerol 25 g. Extracto de levaduras 10 g. en 1000 ml de agua de la llave a un pH de 7.5

Medio 6.—Glicerol 25 g. Harina de soya 10 g. en 1000 ml de agua de la llave a un pH de 7.5

Caldo simple.—Extracto de carne 3 g. Peptona 5 g. Sacarosa 4 g. agua destilada 1000 ml.

Medio 10.—Extracto de carne 10 g. Glucosa 10 g. NaCl 5 g $MgSO_4$ 0.5 g. $FeSO_4$ 0.01 g. y agua de la llave 1000 ml a un pH de 7.5

Método de los discos de papel.—(5) (17) Una vez que se han preparado los matraces, con los distintos medios líquidos se procedió a la biosíntesis del antibiótico, mediante una aeración suficiente, agitándolos durante 120 horas y haciéndose a intérvalos de 24 horas observaciones en placas preparadas con medio de A.G.E. (14) (agar-gelosa-extracto de levadura) por el método que vamos a describir a continuación: Se preparan placas con el medio de A.G.E. y se inocula cada una respectivamente con la suspensión microbiana de Saccharomyces sp, Candida albicans, y Penicillium oxálycum. Por otra parte se hacen discos de papel filtro Whatman No. 2 de 10 mm de diámetro que se esterilizan por medio de color seco, usándose unas pinzas flameadas con las que se toma cada uno de los discos y se mojan en cada caldo de cultivo diferente durante treinta segundos, para ponerlo en contacto por otro tiempo igual con la pared interna del matraz que lo contiene y escurrir el exceso, depositándose nuevamente sobre la placa, marcada con una seña especial para saber de que antibiótico puede tratarse. Se colocan las cajas en una estufa puesta a 37° C. en la cual se incuban por espacio de un día entero. En las observaciones que se hicieron cada veinticuatro horas se notó que la actividad del antibiótico iba aumentando hasta llegar a su máximo a las 72 hrs.

Selección del medio en que se obtuvo mayor actividad.—Esta elección fue hecha a través de suficientes experiencias en las que se veía el poder de inhibición que presentaba frente a cada uno de los microorganismos-prueba.

Después de cuidadosa selección se procedió a filtrar al vacio con Buchner y papel filtro Whatman No. 2 a fin de eliminar el micelio y los sólidos en suspensión, operación que se hizo lo más rápidamente posible para evitar que el antibiótico difundido en el caldo permaneciera demasiado tiempo a temperatura ambiente y

que por esta causa se ocasionara en él una descomposición. Los frascos que contenían los antibióticos fueron colocados inmediatamente en el refrigerador con objeto de conservarlos el tiempo necesario e indispensable para pruebas que más adelante se citan.

Como este estudio consiste en la identificación de los antibióticos producidos, se ha escogido el método cromatográfico porque se han obtenido excelentes resultados usando este sistema, ya que el conocimiento de los valores específicos del Rf es aprovechable para comprar los antibióticos mediante ciertos solventes.

Aunque una variedad de antibióticos obviamente complica el reconocimiento de cada uno en un material no separado, sin embargo, aún en aquellos cultivos similares y diferentes entre sí, antibióticos conocidos o sin identificar pueden ser revelados por medio de la papirografía menodimensional, la cual es útil para aclarar resultados con preparaciones crudas.

Cuando las preparaciones son impuras el valor del Rf no es exacto, porque el antibiótico puede estar incluído por la presencia de constituyentes del cultivo, así como también cuando un cultivo líquido es viscoso tiende a retardar el movimiento debido al contacto con el solvente. Una combinación de antibióticos inactivos en caldos de cultivo con proporción de antibióticos puros ha dado un porcentaje de movimiento relativamente menor, pero se puede tener la posibilidad de que en experiencias posteriores obtenga el resultado requerido.

Técnica, Materiales y Métodos para Cromatografía en papel.— En el presente trabajo se siguió el método de Ammann y Gottlieb (15) que consiste en lo siguiente: Se cortaron tiras (35 cm de largo por 6 cm de ancho) de grandes hojas de papel filtro Whatman No. 1, y 3.5 cm de distancia del borde inferior del papel se pusieron con una micropipeta sobre la línea longitudinal 5 lambdas de la muestra, dejándose secar al aire. Una vez secas se colocaron en una campana de cristal dejando que el solvente ascendiera hasta un poco antes de la punta del papel (usualmente 20 cm.), el cromatograma se sacó de la campana y se secó perfectamente. Exponiéndolo a un calor intermitente durante el secado con objeto de remover el ácido acético. Los solventes que se usaron para hacer estos papirogramos fueron: propanol-agua-ácido-acético, (14) (12: 12: 1), como primer solvente, ter-butanol-ácido acético-agua (65: 6: 29)

como segundo solvente y NH_4Cl en solución acuosa al 3% como tercero y último. Se empleó especialmente en el caso del terbutanol una atmósfera de amoniaco con la que fue posible obtener algunas diferenciaciones que no se lograron con otros solventes. La presencia del acido acético tiende a mejorar el resultado de algunos antibióticos, pero el ácido así como los demás constituyentes que integran la composición de un sistema solvente deben ser renovados antes de cada desarrollo.

Una vez que las tiras estuvieron perfectamente secas se procedió a hacer el revelado Químico el cual se llevó a cabo con una solución de ninhidrina, que se roció uniformemente sobre las tiras dejándose secas a una temperatura de 100° C. durante 10 min. apareciendo claramente manchas de color rosa intenso que nos indicaban la presencia del antibiótico.

Cuando se utiliza el procedimiento de inmersión (17) de las tiras con solución se ninhidrina en acetona, es conveniente cortar las tiras en mitades, la media tira se suspende de su final por medio de un par de pinzas de plástico y se pasa lentamente a través de la solución en una charola fotográfica. La acetona se evapora a los pocos minutos y el color revelado se puede observar a la temperatura ambiente o se puede llevar a cabo completamente en pocos minutos calentando a 90° C. La acetona rociada con butanol muestra un color más intenso y con mayor persistencia que cuando se usa sola la acetona.

El reactivo de inmersión es de 0.25% volumenes de agua, la solución de ninhidrina al 1% en acetona anhidra. El color revelado con este reactivo es uniforme y rápido. La presencia de 10% do agua en el reactivo aumenta el tamaño de las manchas y remarca el color revelado.

Con el fin de obtener resultados comparables, se procedió a hacer promatogramas de revelado microbiológico (8). Las tiras de papel con la muestra que se investiga después de haber sido colocadas en la campana de cristal y cuando el solvente ha ascendido hasta la altura límite, fueron secadas al aire y colocadas sobre placas estériles alojadas en charolas y conteniendo unas medio de Emerson (6) inoculado con **B. subtilis** y otras Gelosa simple sembrada con B-938; al colocar las tiras sobre la superficie del subs-

trato, se vió que quedarán separadas entre sí y perfectamente tirantes durante un cuarto de hora.

Después de incubación conveniente (17 horas a 36° C.) aparecieron zonas claras en los lugares donde el material activo se había difundido del papel al medio. La relación entre el avance medido del soluto dividido entre la distancia precisa recorrida por el frente del solvente, da el Rf para cada antibiótico.

CAPITULO III

RESULTADOS Y DISCUSION

1.—**La conservación de las cepas** durante el tiempo necesario e indispensable para los trabajos realizados, fue lograda en el medio de Czapek. Se tomaron en cuenta por ser de gran importancia los factores siguientes:

a).—El pH debe de estar perfectamente bien determinado y ajustado, pues es de una ayuda muy eficaz para la proliferación de las cepas. En el presente estudio se trabajó a un pH óptimo entre 6.8 a 7.2.

b).—La temperatura fue necesario mantenerla a 28° C. para la incubación de las cepas antes mencionadas, pues se vió que si se tiene una variación superior de temperatura no se alcanza el éixto necesario para su desarrollo.

2.—**En la prueba preliminar de bioactividad** (estrias cruzadas), se notó que la mayor sensibilidad de las bacterias con respecto a los agentes que actúan como antibióticos, fue decreciendo en el siguiente orden: **B subtilis, P. oxalycum, M. phlei, M. Pyogens var. aureus, E. coli, Saccharomyces sp.** y **C. albicans.** Pero la mayor sensibilidad de todas y cada una de las bacterias fue advertida frente a las cepas de **Streptomyces**: B-9, A, y B-12, como se puede observar en la tabla I.

3.—**Método de los discos de papel.** En las pruebas hechas, cada veinticuatro horas se notó que éstas mostraban zonas de inhibición circulares alrededor de cada uno de los discos, habiéndose usado los cultivos líquidos preparados anteriormente y previamente filtrados con un tiempo de agitación de 72 y 96 horas (tabla II y III).

Los antibióticos que resultaron tener una mayor actividad fueron producidos en los medios No. 2 y No. 10 y caldo con sacarosa, ya que cada uno de ellos contiene la mayoría de las substancias nutritivas requeridas, tales como proteínas e hidratos de carbono completándose con cationes como Na, Mg, y Fe que se encuentran bajo la forma de cloruros, sulfatos y fosfatos que son empleados por el gérmen en la regulación de la presión osmótica, así como en la acción enzimática y mantener el equilibrio de membrana.

En la tabla II se encuentra la actividad de las cepas estudiadas en diferentes medios líquidos a las 72 hrs. de agitación. Así la cepa B-9 tuvo actividad contra **Saccharomyces sp.**, **Candida albicans**, **Penicillium Oxálycum** en los medios 2 y 10.

Las bacterias fueron suceptibles a la cepa B-12 cultivadas en el medio 2; no siendo sensibles a las acción de los filtrados en los medios restantes.

El poder antimicrobiano de la cepa M-2 se presentó contra **Saccharomyces sp.**, **Candida albicans**, y **Penicillium oxálycum** en los medios 3, 10, y C. El correspondiente a la cepa A fue presentado contra los microorganismos antes mencionados únicamente en los medios 2, Cs y 10.

La cepa B-6 presentó actividad contra las bacterias de prueba, únicamente en los medios 2 y 10; la R-7 en los medios 3, Cs y 10, y por último la cepa de **Streptomyces** 5014 tuvo actividad contra **Saccharomyces sp.** en los medios 2 y 5.

Los antibióticos producidos a las 72 horas de agitación mostraron una actividad que podía ser aumentada con una nueva agitación de 24 hrs. notándose que parte de estos antibióticos mejoraron su bioactividad y parte la perdieron totalmente. Estas pruebas nos permitieron observar que determinadas cepas de **Streptomyces** mostraban al elaborar sus antibióticos, una actividad satisfactoria a las 72 horas de agitación como se vé en el caso de la cepa 5014 (tabla II) que se presentó bioactiva únicamente contra **Saccharomyces sp.**, y al aumentar 24 hrs. de agitación no tuvo poder antimicrobiano para las bacterias de prueba (tabla III). En cambio la potencia que la cepa M-2 presentó frente a las bacterias, mejoró bastante en los diferentes medios líquidos (2, 3, 5, Cs y 10).

Así se tuvo oportunidad de observar que la mayoría de las cepas alcanzaron su máxima actividad a una agitación de 96 hrs.

tabla III, y en ambos casos los medios líquidos en que tuvieron los **Streptomyces** su mayor elaboración de antibiótico fueron los substratos 2 y 10.

Respecto a la cromatografía de la mayoría de los antibióticos, casi todos los aistemas solventes sirven, aún cuando en ciertos casos no son muy satisfactorios. Como ejemplo de lo anteriormente mencionado, tenemos el caso de la actinomicina, neomicina y viomicina, las cuales dan un valor exacto del Rf con un solvente apropiado, en éste caso específico es preparado con propanol-agua-ác. acético (12: 12: 1) y se puede notar que los mismos antibióticos dan valores Rf distintos con un solvente preparado a base de terbutanol-ác. acético y agua (65: 6: 29), pero los valores del Rf que este mismo solvente dió para la estreptotricina y viomicina son exactos. La actinomicina y estreptotricina, pueden obtener valores de Rf bastante exactos con un solvente de cloruro de amonio al 3%.

En general, por medio de la cromatografía se pueden identificar algunos antibióticos al mismo tiempo que es posible obtener las diferencias de algunos de ellos; cuando uno de los antibióticos tuviera cierta diferencia que pudiera alterar los valores del Rf, es factible determinarlo por comparación de las cromatografías como se observa en la figura 2 en la cual se notan dos distintos antibióticos que no pudieron ser reconocidos al emplear las claves de la figura 1.

Al determinar los antibióticos de la mezcla por medio de un revelado microbiológico como se indica en la figura 4 B, pudo apreciarse que al emplear como solvente la mezcla de ter-butanol-ác. acético agua (65: 6: 29) aparecieron dos antibióticos que probablemente comprenden a los mismos que previamente fueron identificados por la prueba de la ninhidrina, solo que a diferente Rf, debiéndose ésto quizá a algunas deficiencias técnicas que no pudimos controlar.

Algunos de los resultados obtenidos en la tabla IV, fueron obtenidos siguiendo el método que representa la figura 1.

Pudo notarse que las cepas de **Streptomyces** B-9 y B-12 dan valores del Rf parecidos con el revelado químico a base de ninhidrina; los valores son: 0.23 para el caso de B-9 y 0.20 para la B-12. Como se vió que estos caldos de cultivo daban Rf muy parecidos, se procedió a hacer una prueba microbiológica, usándose como solvente cloruro de amonio al 3% y como inóculo **B. subtilis** 42. Este

revelado nos dió como resultado un Rf de 0.21 para B-12 y 0.12 para B-9, con lo que se pudo observar que se encontraban entre los límites de valores Rf que representan a la actinomicina. Una prueba suficiente la dieron los valores obtenidos usando el solvente ter-butanol-ác. acético-agua y como inóculo la cepa B. 938 de B. **Megaterium**, valores con los que se comprobó que los caldos de cultivo obtenidos de las cepas de **Streptomyces** B-9 y B-12 dan como resultado el antibiótico actinomicina.

La neomicina se reconoció por los valores obtenidos del caldo de cultivo del **Streptomyces** M-2 en un revelado químico con ninhidrina.

En el caso de la cepa A los valores de Rf fueron perfectamente determinados en revelado químico y microbiológico, los cuales permitieron ver claramente que el caldo de cultivo contenía estreptotricina.

El valor de Rf obtenido por la cepa de **Streptomyces** B-6 en el revelado químico, no permitió la identificación del antibiótico según los valores incluídos en la marcha de la figura 1, operatoria que se siguió durante el desarrollo de este estudio. Al hacer el revelado microbiológico se obtuvieron resultados negativos.

Como se había dicho en el capítulo II el solvente preparado con la mezcla de ter-butanol-ác. acético nos permite aclarar diferentes valores del Rf para un mismo caldo de cultivo como ahora se puede ver en la figura 3 A. Esta figura nos muestra tres manchas dadas por la cepa 5014, estas manchas dieron valores del Rf de 0.48, 0.31 y 0.58. En el revelado microbiológico de esta misma cepa también se usó el solvente antes dicho y se obtuvo un valor de Rf 0.03-0.06 figura 5 B que nos indica que se trata de un solo antibiótico de las 3 substancias reveladas por la ninhidrina y que aparece a diferentes Rf.

Al hacer un nuevo revelado químico usando el solvente preparado, con la mezcla de propanol-agua-ác. acético, se vió que éste daba valores Rf entre 0.40 y 0.60, (Fig. 3 B) los cuales comprendían los límites en los que se puede encontrar el Rf de la viomicina, comprobando más tarde al hacer un revelado en placas de gelosa simple con inóculo de P-938, (Fig. 5 B) que los valores obtenidos conducían a la identificación de la viomicina puesto que los Rf dados en el revelado con placas de gelosa simple eran los correspondientes a este antibiótico.

TABLA I

ESPECTRO ANTIMICROBIANO DE LAS CEPAS ESTUDIADAS

(METODO DE LA ESTRIA CRUZADA DE GARRE)

Streptomyces	*MICROORGANISMOS DE PRUEBA (Inhibición en mm)*						
	Saccharomyces sp	*Candida albicans*	*Bacillus subtilis*	*M. Pyogenas var. aureus*	*Escherichia coli*	*Penicillium oxalycum*	*Mycobacterium phlei*
B-9	21	5	25	20	8	19	16
B-12	4	12	13	17	6	17	18
M-2	5	3	5	8	7	10	24
A	23	19	24	19	18	22	23
B-6	3	4	7	10	3	19	12
R-7	2	0	13	5	6	21	28
5014	3	0	23	24	20	0	32

TABLA II

ESPECTRO ANTIMICROBIANO DE LAS CEPAS ESTUDIADAS

(METODO DE LOS DISCOS, EN DIFERENTES MEDIOS LIQUIDOS A LAS 72 HS. DE AGITACION)

Streptomyces	*Saccharomyces sp.*							*Candida albicans*							*Penicillium oxalycum*						
	2	3	5	6	C	C-S	10	2	3	5	6	C	C-S	10	2	3	5	6	C	C-S	10
B-9	19	—	17	15	14	—	12	16	—	—	—	—	—	13	17	—	—	—	—	15	14
B-12	16	—	—	—	—	—	12	17	—	—	—	—	—	—	18	—	—	—	—	—	—
M-2	—	18	—	—	15	—	16	—	16	—	—	14	—	15	—	21	—	—	13	—	15
A	15	—	—	—	—	14	13	17	—	—	—	—	15	14	16	—	—	—	16	—	14
B-6	16	—	—	—	—	—	—	18	—	—	—	—	—	13	17	—	—	—	—	—	13
R-7	17	18	—	—	—	16	20	—	21	—	—	—	18	—	—	20	—	—	—	18	—
5014	15	—	15	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—

TABLA III

ESPECTRO ANTIMICROBIANO DE LAS CEPAS ESTUDIADAS

(METODO DE LOS DISCOS A LAS 96 HS. DE AGITACION EN DIFETENTES MEDIOS LIQUIDOS)

Streptomyces	*Saccharomyces sp.*							*Candida albicans*							*Penicillium oxalycum*						
	2	3	5	6	C	C-S	10	2	3	5	6	C	C-S	10	2	3	5	6	C	C-S	10
B-9	18	17	15	—	—	—	14	14	—	—	—	—	—	12	13	—	—	—	—	12	12
B-12	15	—	—	—	—	—	—	15	—	—	—	—	—	—	16	—	—	—	—	—	—
M-2	16	17	14	—	—	16	17	—	17	—	—	15	—	14	—	16	—	—	13	—	13
A	16	—	—	—	—	14	13	17	—	—	—	—	16	18	16	—	—	—	14	—	14
B-6	14	—	—	—	—	14	12	12	—	—	—	—	—	12	12	—	—	—	—	—	12
R-7	15	—	—	—	—	12	14	—	18	—	—	—	12	—	—	15	—	—	—	13	—
5014	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—

TABLA IV

CROMATOGRAFIA DE LOS CALDOS DE CULTIVO

Rf. A DIFERENTES SOLVENTES

Streptomyces	*Solv. 1: propanol agua-ac. acético Rev.: ninhidrina*	*Solv. 2: ter-butanol ac. acético-agua. Rev.: ninhidrina*	*Solv. 3: NH_4Cl 3% Rev.: B. subtilis 42*	*Solv.: ter-butanol ac. acético-agua. Rev.: B-938*	*Interpretación*
B-9	0.23	—	0.12	0	Actinomicina
B-12	0.20	—	0.21	0	Actinomicina
M-2	0.24	—	—	—	Neomicina
A	—	1.0 — 1.3	0.93 — 0.95	0.0 — 0.1	Estreptotricina
B-6	0.23	—	—	—	—
R-7	0.86	2 manchas { 0.35-042 > ; 0.77-0.78 < }	0.009	1.8 — 2.1	—
5014	0.40 — 0.60	3 manchas { 0.48 > ; 0.31 ; 0.58 < }	0.0	0.03 — 0.06	Viomicina

TABLA V

ORIGEN NATURALEZA QUIMICA Y ACTIVA DE ANTIBIOTICOS ANTIFUNGICOS

Antibióticos	*Producidos por*	*Naturaleza química*	*Actividad sobre*
Actidiona	Streptomyces griseus	Dicetona	Levaduras y hongos
Actinomicina	Streptomyces antibioticus	Cromopéptido	Bacterias y hongos
Actinomicina A	Streptomyces sp.	Fenol nitrogenado	Levaduras y hongos
Fradicina	Streptomyces fradiae	Base nitrogenada débil.	Levaduras y hongos
Musarina	Streptomyces sp.	Acido orgánico	Hongos y bacterias
Estreptotricina	Streptomyces levandulas	base orgánica	Hongos y bacterias
Nistatina	Streptomyces sp.	Polieno	Hongos y bacterias
Rimocidina	Streptomyces rimosus	Polieno	Hongos y bacterias
Antimicoina	Streptomyces aureus	Polieno	Hongos y bacterias
Candicidina	Streptomyces griseus	Polieno	Levaduras
	HONGOS		
Clavacina	Aspergillus clavatus	Cetona saturada	Bacterias y hongos
Gliotoxina	Trochoderma	Contiene azufre y nitrógeno	Bacterias y hongos
Tricotecina	Trochoderma roseum	Cetona no saturada	Hongos
Viridina	Trichoderma viride	Contiene carbono hidrógeno y oxígeno	Hongos
	BACTERIAS		
Eumicina	Bacilus subtilis	Alcohol soluble	Bacterias y hongos
Piocianina	Pseudomonas aeruginosa	A-cetofenacina	Bacterias y hongos
Hemipiocianina	Pseudomonas aeruginosa	A-oxifenacina	Bacterias y hongos
Tiotricina	Bacillas brevis	Polipéptidos	Bacterias y hongos

TABLA VI

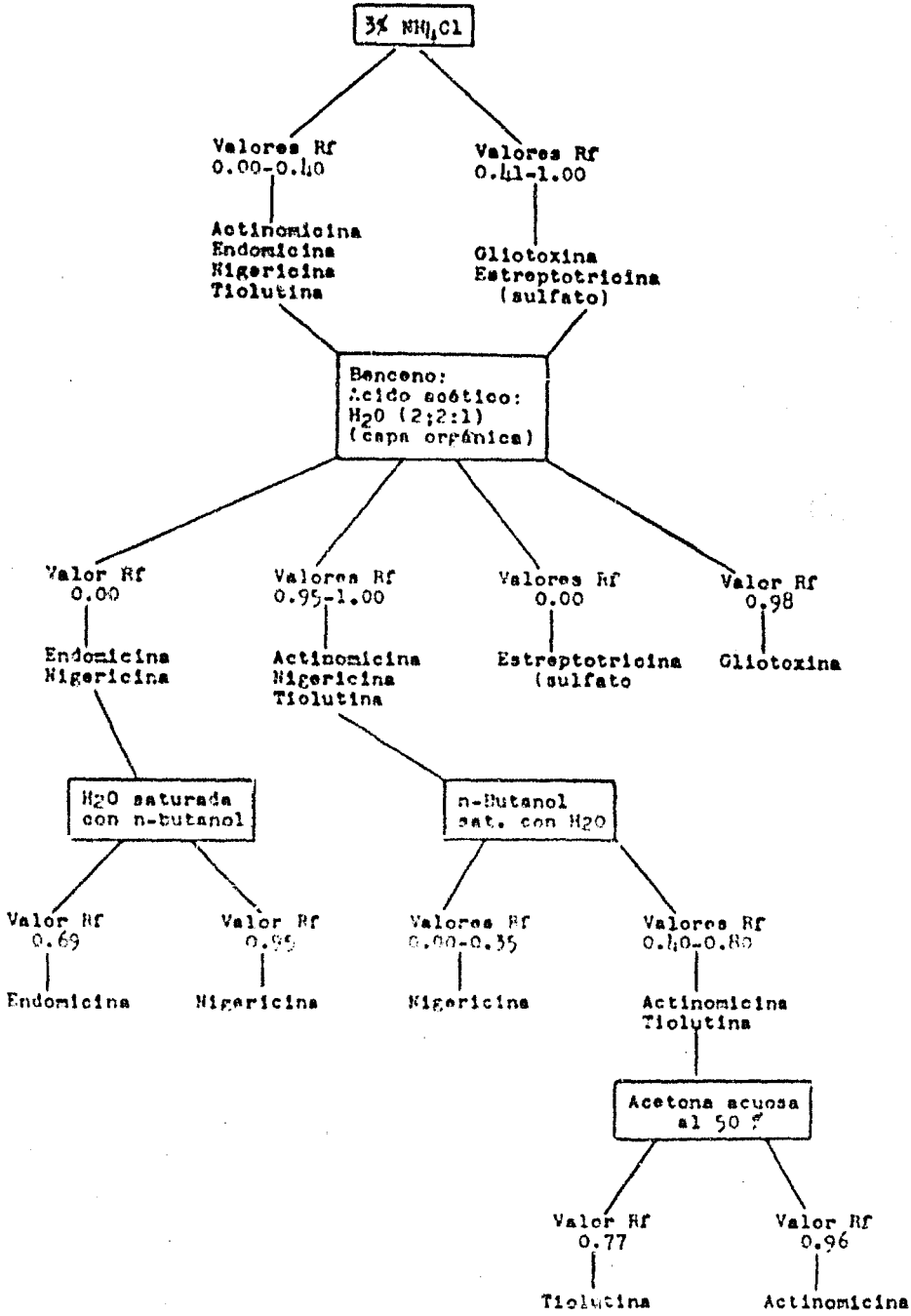
ANTIBIOTICOS ANTIFUNGICOS PRODUCIDOS POR BACTERIAS

Actividad preliminar contra hongos		*Actividad contra hongos y bacterias*	
Substancias	*Organismos*	*Substancias*	*Organismos*
Bacilomicina	B. subtilis	Fluvomicina	B. subtilis
Fumicina	B. subtilis	Poliptina	B. subtilis
Fungistatina	B. subtilis	Simplexina	B. subtilis
Micosubtilina	B. subtilis	Toximicina	B. subtilis

TABLA VII

ANTIBIOTICOS ANTIFUNGICOS PRODUCIDOS POR ACTINOMYCETES

Acción principal antifúngica		*Acción contra bacterias y hongos*	
Actinomicina	Streptomyces sp.	Actinomicina	S. antibioticus
Antimicina A	Streptomyces sp.	Aureotricina	S. celuloflavus
Antimicoina	S. aureus	Canfomicina	Streptomyces sp.
Ascosina	S. canescus	Endomicina	Streptomyces sp.
Cacaomicetina	S. cacaoi	Helixina	Streptomyces sp.
Candicidina	S. griseus	Microcina	Micronomospora sp.
Candidina	S. viridoflavus	Musarina	Streptomyces sp.
Cromicina	S. antibioticus	Micomicina	Nocardia acidophilus
Cicloeximida	S. griseus	Nigericina	Streptomyces sp.
Eumicetina	S. purpeochromogenes	Tiolutina	S. albus
Fradicina	S. fradiae		
Moldina	S. phaeochromogenus		
Nistatina	S. noursei		
Oligomicina	S. distatochromogenes		
Feofacina	S. phaeofaciens		
Rimocidina	Rimosus		
Rotaventina	S. reticuli		
Tricomicina	S. hachijoensis		



En 50 % de acetona acuosa el valor Rf es 0.86

Fig. 1.- Marcha para la separación de 6 antibióticos con actividad antifúngica y antibacteriana, tomando como base sus valores Rf en 5 sistemas solventes.

CROMATOGRAFIA EN PAPEL DE LA CEPA R-7
ANTIBIOTICO R-7

A y A'	Medio 2.—	Glucosa-extracto de carne
	Solvente.—	Ter-butanol-ác.acético-agua
	Revelador.—	Ninhidrina
B	Medio 2.—	Glucosa-extracto de carne
	Solvente.—	Propanol-agua-ác. acético
	Revelador.—	Ninhidrina

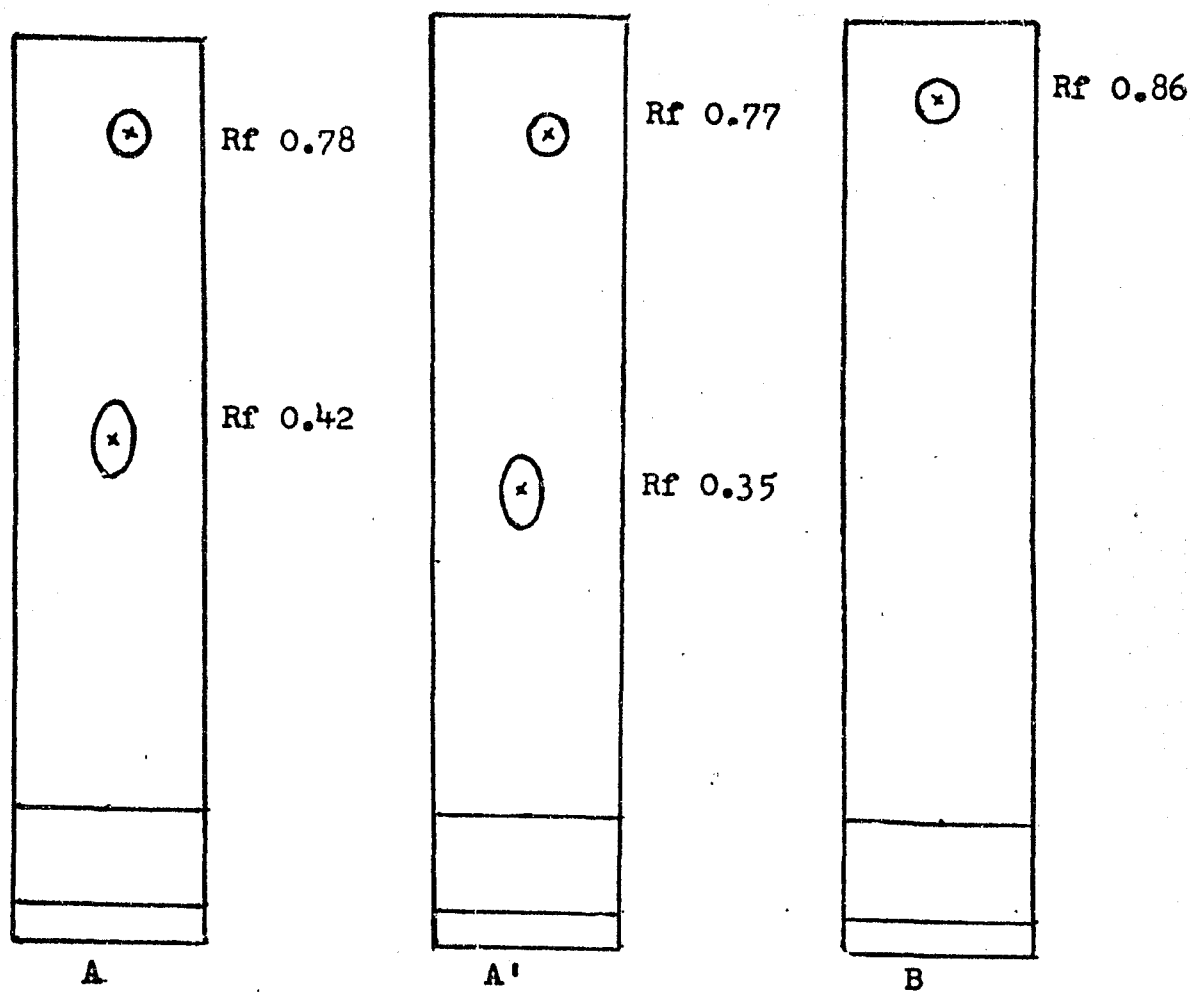


Fig 2

CROMATOGRAFIA EN PAPEL DE LA CEPA 5014
ANTIBIOTICO 5014

A
- Medio 2.— Glucosa-extracto de carne
- Solvente.— Ter-butanol-ác.acético-agua
- Revelador.— Ninhidrina

B
- Medio 2.— Glucosa-extracto de carne
- Solvente.— Propanol-agua-ác. acético
- Revelador.— Ninhidrina

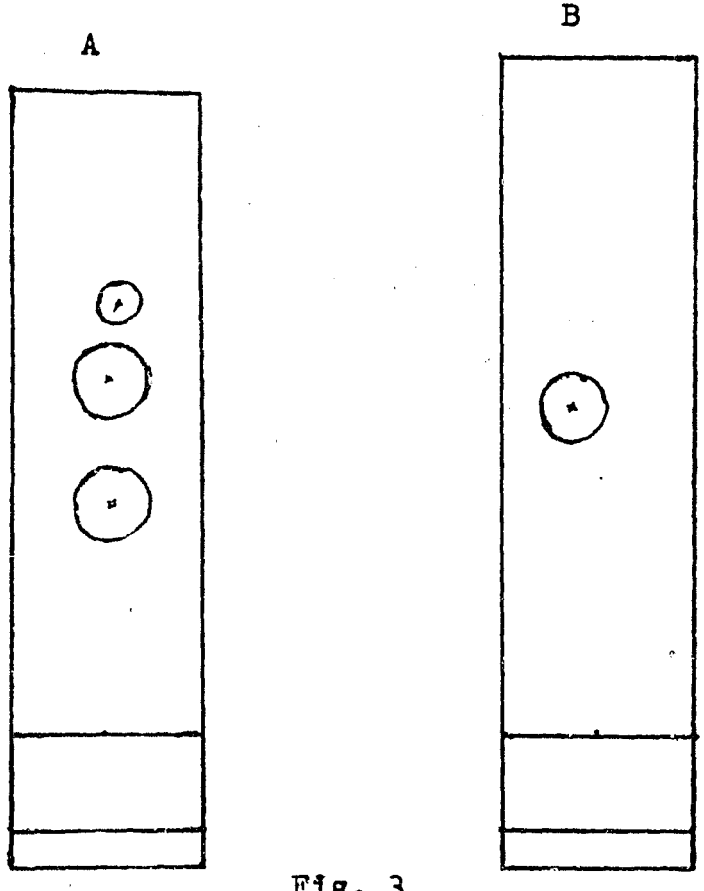


Fig. 3

BIAUTOGRAFIA DE LA CEPA R-7

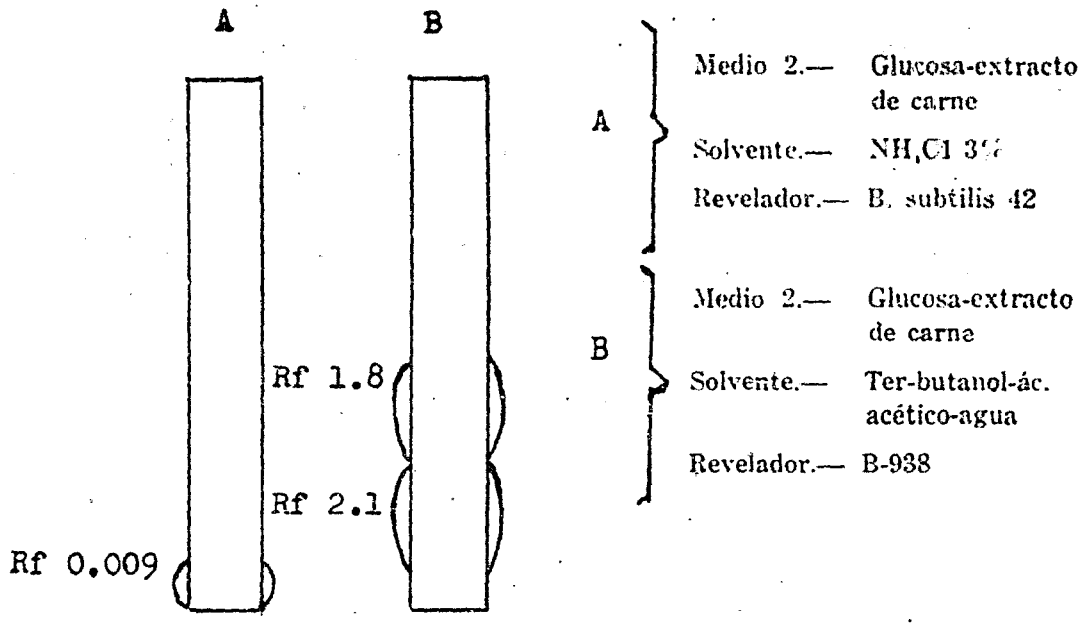
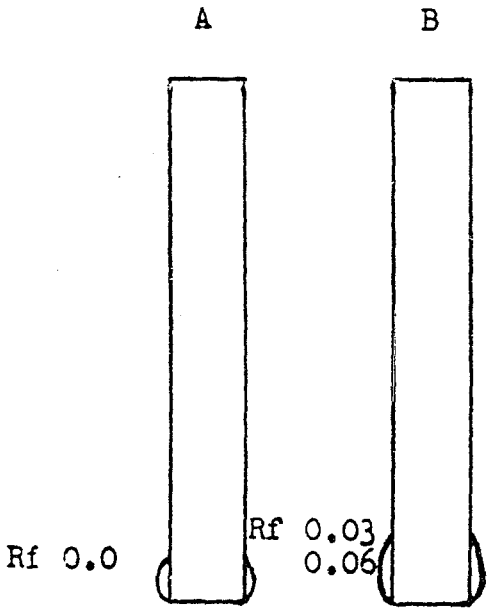


Fig. 4

BIAUTOGRAFIA DE LA CEPA 5014



A

Medio 2.— Glucosa-extracto de carne

Solvente.— NH_4Cl 3%

Revelador.— B. subtilis 42

B

Medio 2.— Glucosa-extracto de carne

Solvente.— Ter-butanol-ác. acético

Revelador.— B-938

Fig. 5

CAPITULO IV

RESUMEN Y CONCLUSIONES

Se efectuó la identificación cromatográfica de los factores antibióticos elaborados por siete cepas de Streptomyces designadas como: B-9, B-12, M-2, B-6, A, R-7, y 5014. Suministradas por el laboratorio de Microbiología de la E.N.C.Q. Este trabajo constó de las siguientes etapas.

1.—Conservación de las cepas durante el tiempo necesario para este trabajo, resembradas en Czapek a partir de medio de suelo, substrato que fue el más eficaz para que no menguara la potencia antimicrobiana de la especie.

2.—**Bioactividad preliminar** que se efectuó por el método de las estrías cruzadas (7). Viendose que todas las cepas de Streptomyces presentaban actividad frente a cada uno de los microorganismos-prueba.

3.—**Esporulación rápida** y abundante en tubos de máxima superficie inclinada conteniendo como substrato harina de trigo que fue el mejor medio para éste objeto y permaneciendo un tiempo mínimo, pues una permanencia prolongada de las esporas daba lugar a que después de resembrarlas dieran poca o ninguna actividad.

4.—**Biosíntesis de los antibióticos** después de obtener buenos desarrollos superficiales de los Streptomyces incubados a 28° C. efectuando cada veinticuatro horas control de actividad de los caldos de cultivo mediante la técnica de los discos de papel, escogiéndose a: **Saccharomyces sp, Candida albicans** y **Penicillium Oxalycum** como microorganismos-prueba.

5.—**Selección del medio de cultivo** que tuvo mayor actividad.

6.—**Identificación de los antibióticos.**—Ya seleccionados fueron sometidos a pruebas Cromatográficas que nos permitieron reconocerlos.

7.—Del presente trabajo es posible derivar las siguientes conclusiones:

a).—El medio de harina de trigo a saber constituye un buen substrato para la esporulación de los **Streptomyces** estudiados.

b).—Los medios líquidos 2, 10 y caldo simple con 0.2% de sacarosa resultaron ser los mejores para la producción del antibiótico por las cepas estudiadas.

c).—Es posible investigar por cromatografía en papel, el tipo de antibióticos estudiados. Así vemos que las cepas de **Streptomyces** B-9 y B-12 Produjeron actinomicina, la cepa M-2 neomicina, y las cepas A y 5014 estreptotricina y viomicina, respectivamente.

Además se encontró la producción de dos antibióticos por una misma cepa, la R-7, los cuales no fue posible identificar por los métodos y claves seguidas en el presente estudio.

CAPITULO V

BIBLIOGRAFIA

1.—Barzizza C. M. y Manso Soto A., Microbiología. Cía. Impresora Argentina, S. A. Buenos Aires. 1957.

2.—Baron A. L. Handbook of Antibiotics. Reinhold Pub. Co. New York. 1950.

3.—Binkley B. S. Biochemistry of Antibiotics, Annual Review of Biochemistry, 24: 597-608, 1955.

4.—Cooper, W. E. & Chilton, S. J. P. (1940) Phytopathology, 39: 5, Cit. por Waksman (25).

5.—De Beer R. E. J. and M. B. Sherwood. The paper-disc-agar-plate, Method for assay of antibiotic substances Jour, Bact., 50: 459. 1945.

6.—Emerson R. L., J. A. Whiffen, N. Bohonos and E. J. De Beer. Studfes on the production of antibiotics by Actinomycetes and molds. Jour. Bact., 52: 357, 1946.

7.—Garré Uber Antagonisten inter den Bakterie. Centr. Bakt. Parasitenk., 2: 312-313, 1887. Cit., por Wakman (24).

8.—Goodal R. R. and Levi A. A. Microchromatographic method for the dectection and aproximate determination of the diferent penicillins in a mixture, Nature 158: 675-76, 1946.

9.—Haight Thomas H. and Finland Maxwell. Observation on mode of action of erithromycin. Proc. of Soc. Exptl. Biol and Med, 81: 188-89, 1952

10.—Harries, H. J. J. Amer-med. Ass 142:161, 1950. Cit. por Waksman (25).

11.—Irving G. W. and H. T. Herrick, Antibiotics. Chem. Pub. Co., New York, 1949.

12.—Salle A. J., Fundamental Principles of Bacteriology. Mc Graw Hill Book Co. New York, 1948.

13.—Sánchez Marroquín A., Microbiología Agrícola e Industrial. México, D. F. 1950.

14.—Sánchez Marroquín A. Antagonismo Microbiológico de algunas cepas de Streptomyces, aisladas del suelo. Universidad Nacional Autónoma de México, D. F. 1951.

15.—Snell Neva, Ijichi Kosuke and Lewis J. C. Paper Chromatographic identification of polypeptidic gram-positive antibiotics. Appl. Microbiol: 4: 13-19, 1956.

16.—Toennies Gerrit and Kolb J. Joseph. Techniques and reagents for paper Chromatographic., Analytical Chemistry (American Chemical Soc.) 23: 823-26, 1951.

17.—Vicent J. G., Vicent, H. W. Filter paper-disc modification of the Oxford cup penilillin determination Proc. Explt. Biol, Med: 55: 162, 1944.

18.—Vining Leo C. and Waksman Selman. A. Technical Paper Chromatographic identification of the actinomycins. Science. 120: 389-90, 1954.

19.—Waksman, S. A., and Lechevalier, H. A. Neomycin, a New antibiotics active against Streptomyces resistant bacteria including tuberculosis organisms. Science 109: 305-307, 1949.

20.—Waksman, S. A., Microbial antagonisms and antibiotic substances. Commonwealth Fund. New York., 1947.

21.—Waksman, S. A. Antifungal antibiotics. Bull. Org. Mond. Santé, 6: 163-173, 1952.

22.—Waksman, S. A. "Outstanding problems in the study of antibacterial and antifungal antibiotics, with special reference to the antibiotics of Actinomycetes". En: Therapy of Fungus Diseases. Little, Brown & Co. Boston, 1955.