

Universidad Autónoma de México
Escuela Nacional de Ciencias Químicas

“Obtención de un Antibiotico
Tipo ACTINOMICINA”

TESIS QUE PRESENTA
Sylvette Crinberg Borensztajn
PARA OBTENER EL TITULO DE QUIMICO
MEXICO, D.F. 1959



Universidad Nacional
Autónoma de México



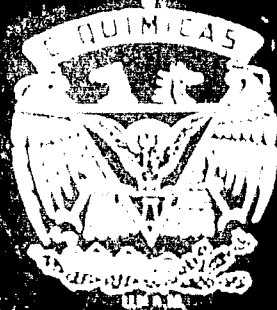
UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Ención de un Antibiótico Tipo
ACTINOMICINA _____



SYLVIE GRINBERG BORENSZTAJN

MEXICO, D. F.

1959

A mis queridos padres y hermanos.

A mi esposo.

A mis maestros.

A la consideración del H. Jurado.

El presente estudio se efectuó en el Laboratorio de Microbiología de la E. N. C. Q., bajo la dirección del Dr. Alfredo Sánchez Marroquín a quien hago presente mi especial agradecimiento.

S U M A R I O

- I).- Intraducción
- II).- Materiales y Métodos
- III).- Resultados y Discusión
- IV).- Resumen y Conclusiones
- V).- Bibliografía

Capítulo I

INTRODUCCION

[Diversas bacterias, hongos, actinomicetos y algas, tienen la propiedad de ejercer efectos antagónicos sobre el crecimiento de otros microorganismos; producen sustancias químicas, o antibióticos, que son los que provocan esa reacción.

Los antibióticos son sustancias químicas producidas por microorganismos, y tienen la capacidad de innibir, y aún de destruir, en soluciones diluídas, el crecimiento de las bacterias y de otros microorganismos.

La acción antimicrobiana de un antibiótico es selectiva por naturaleza (1), algunos organismos son afectados, y otros no lo son en absoluto o sólo en un grado limitado; cada antibiótico está, por lo tanto, caracterizado por un espectro antimicrobiano o rango de actividad característico contra diferentes microorganismos. La acción selectiva de un antibiótico, se manifiesta también contra células animales; los diferentes antibióticos varían grandemente en su toxicidad en animales y en -

su efecto sobre la sangre y otros fluidos corporales.

Los antibióticos varían mucho también en sus propiedades físicas y químicas y en su modo de acción sobre las bacterias y otros microorganismos. A consecuencia de estas características, algunos antibióticos tienen potenciales quimioterápicos muy elevados, y pueden ser usados para controlar varias infecciones microbianas en el hombre y en animales.

Desde el descubrimiento de la penicilina (7), los antibióticos más importantes que han encontrado aplicación como agentes quimioterápicos, provienen de los actinomicetos. Mas de quinientos compuestos han sido aislados o descritos (30). Algunos de estos han encontrado aplicación en el tratamiento de enfermedades infecciosas en el hombre y en animales. Estos antibióticos incluyen, entre otros, la estreptomina, actinomicina, cioranfencol, las tetraciclinas, eritromicina y neomicina. Algunos de estos antibióticos son activos contra bacterias; otros, como la actidiona, facidina y nistatina, son activos contra hongos; también hay algunos activos contra rickettsias y virus.

Han sido propuestos varios sistemas -

de clasificación para los antibióticos; estos sistemas están basados en el origen de los antibióticos, su solubilidad, toxicidad en animales o en su naturaleza química (28, 30). Este último sistema parece ser el más lógico. Los antibióticos han sido clasificados como lipoides, pigmentos, polipéptidos, compuestos sulfurados, quinonas y cetonas, o bases orgánicas. Basándose en su estructura química, los antibióticos se agrupan como sigue:

I.- Compuestos que contienen carbono, hidrógeno y oxígeno:

- 1.- Grupo $C_6 - C_6H_6O_4$ - ácido kójico
- 2.- Grupo $C_7 - C_7H_6O_4$ - cloracina
- 3.- Grupo $C_8 - C_8H_{10}O_4$ - ácido penicílico
- 4.- Grupo $C_{11} - C_{11}H_{10}O_5$ - ácido gladiólico
- 5.- Grupo $C_{15} - C_{15}H_{14}O_6$ - javacina
- 6.- Grupo $C_{32} - C_{32}H_{44}O_8$ - fumigacina
(ác. helvólico),
etc.

II.- Compuestos que contienen carbono, hidrógeno, oxígeno y nitrógeno:

- 1.- Grupo $C_{12}H_{20}O_2N_2$ - ác. aspergílico
- 2.- Grupo $C_{13}H_{10}O_2N_2$ - piocianina
- 3.- Grupo $C_{21}H_{39}O_{12}N_7$ - estreptomicina
- 4.- Grupo $C_{41}H_{56}O_{11}N_8$ - actinomicina

III.- Compuestos que contienen carbono, hidrógeno, oxígeno, nitrógeno y azufre:

- 1.- Grupo $C_9^+H_{11}O_4SN_2.R$ - penicilina
- 2.- Grupo $C_{13}H_{14}O_4N_2S_2$ - gliotoxina

IV.- Compuestos que contienen cloro:

- 1.- $C_{19}H_{15}O_5Cl_3$ - ustina
- 2.- $C_{17}H_{17}O_6Cl$ - griseofulvina
- 3.- $C_{11}H_{12}O_5N_2Cl_2$ - cloranfenicol

Gran número de antibióticos han sido obtenidos y aislados por fermentaciones, y algunos de ellos han podido sintetizarse, como la piocianina y la clavacina y, los más importantes de todos, penicilina y cloranfenicol. Sin embargo, toda la penicilina utilizada en quimioterapia, hasta 1954, fué producida biológicamente, así como el cloranfenicol usado en dicha -- ciencia, es sintético. Algunas de las modificaciones químicas de los antibióticos, también -- han encontrado gran aplicación.

Generalidades sobre Actinomicina.-

Es un antibiótico cristalino aislado de los cultivos filtrados de *Streptomyces antibioticus* y otros *Streptomyces* sp. (32). En un principio se creía que la actividad del antibiótico se encontraba en dos fracciones, A y B, -- mostrando diferentes acciones antimicrobianas -- (14). Ahora los investigadores opinan que la actividad de la llamada "actinomicina B" es debida a contaminaciones con la fracción A.

Este antibiótico es extraído de los filtrados con éter etílico, éter de petróleo, e tanol y cloroformo, y purificado por absorción y recristalización cromatográfica.

Los cristales rojos (P.f. 250°C) son solubles en éter etílico, etanol, agua, disulfuro de carbono, acetona, cloroformo, benceno, acetato etílico caliente y ácido clorhídrico al 10%; y es insoluble en éter de petróleo y en so luciones diluídas de ácidos y álcalis. Su peso molecular es de 768 - 1000. La actinomicina es estable a la luz, y no pierde actividad cuando se sujeta a ebullición por 30 minutos. Es mas estable en soluciones neutras o ligeramente áci das; la actividad perdida por alcalización, es

restaurada por la subsecuente neutralización.

La actinomicina es bactericida para -
Br. abortus, E. coli, B. subtilis y Sarcina lutea.

Este antibiótico ha resultado ser muy tóxico en animales experimentales, y los esfuerzos hechos para quitarle estas propiedades tóxicas y al mismo tiempo conservar su actividad antimicrobiana, han sido inútiles (12).

En el presente trabajo, se estudió la cepa DI-7 la cual pertenece indudablemente a la especie S. griseolus (26). En medios con harina de soya o con glucosa más extracto de levadura, produjo actinomicina.

Capítulo II

MATERIALES Y METODOS

Materiales.-

Las cepas utilizadas en las investigaciones de este trabajo, fueron proporcionadas por el Laboratorio de Microbiología de la Escuela Nacional de Ciencias Químicas. Dichas cepas de Streptomyces, aisladas de diferentes suelos de la República Mexicana y del Brasil fueron catalogadas con las claves: A-2, A-5, B-12, B-26, D1-7, mb-2, 473 y N.

El material de laboratorio empleado --
fué:

Matraces

Tubos de ensayo

Cajas Petri

Asa de platino

Pinzas

Discos de papel (Wathman No. 1)

Algodón

(Todo este material fué previamente esterilizado).

Los microorganismos de prueba que se emplearon fueron:

Bacillus subtilis

Candida albicans

Escherichia coli

Staphylococcus aureus

Saccharomyces sp.

Medios.-

Para el crecimiento de los microorganismos de prueba necesarios para el control de actividad, se usó el medio de Agar-glucosa-extracto de levadura (gelosa simple):

Extracto de levadura	10	gramos
Glucosa	10	"
Agar	15	"
Agua de la llave	1000	ml.

pH : 6.8

(tubos inclinados y cajas Petri)

Para la esporulación de los Streptomyces, se llevo a cabo la prueba en dos medios sólidos diferentes (E-3) y (E-4):

Medio E-3:

Harina de trigo	4	gramos
K_2HPO_4	0.6	"
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	0.002	"
Maltosa	2	"
Agar	4	"

Agua destilada 200 ml.
pH : 6.8 - 7.0
(tubos inclinados)

Medio E-4:

Avena 13 gramos
Agar 6 "
Agua destilada 200 ml.
pH : 6.8 - 7.0
(tubos inclinados)

Para la producción de antibióticos se utilizaron cinco medios líquidos: 1, 3, 5, 7 y 10 (19):

Medio 1:

Glucosa 25 gramos
Agua de cocimiento de maíz 20 "
Agua de la llave 1000 ml.
pH : 7.5

Medio 3:

Glucosa 25 gramos
Extracto de levadura 10 "
Agua de la llave 1000 ml.
pH : 7.5

(Este medio también fué probado enriquecido con K_2HPO_4 - 5 gramos y $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ - 0.01 gramos)

Medio 5:

Glicerol	25	gramos
Extracto de levadura	10	"
Agua de la llave	1000	ml.
pH : 7.5		

Medio 7:

Glucosa	25	gramos
Harina de soya	10	"
Agua de la llave	1000	ml.
pH : 7.5		

Medio 10:

Extracto de carne	10	gramos
Glucosa	10	"
NaCl	5	"
MgSO ₄	0.5	"
FeSO ₄ .7H ₂ O	0.01	"
Agua de la llave	1000	ml.
pH : 7.5		

Además de estos medios, se usó también suero fisiológico (solución salina al 0.8%) con el fin de hacer las suspensiones de *B. subtilis* necesarias para las pruebas de discos.

Métodos.-

Los Streptomyces son microorganismos

generalmente saprófitos, pero algunas especies son parásitos en plantas y animales (17); Sus colonias, sembradas en medios artificiales son elevadas y adheridas a dicho medio, y varían mucho según la edad del cultivo y del medio en -- que se encuentran. Pueden ser lisas o en forma de líquen y duras o de textura suave.

Estos microorganismos crecen, en condiciones favorables, en forma de micelios muy ramificados (6, 20, 23), los cuales no se fragmentan y se mantienen adheridos, lo cual causa su dureza (5). Los conidios se producen en ramificaciones aéreas en cadenas o en varas cortas y sencillas (9).

Como los Streptomyces tienen la facultad de formar esporas, esta cualidad se utiliza como medio para su reproducción. Si las condiciones del medio son favorables, cada espora -- forma una colonia; en caso contrario, las esporas permanecen como tales constituyendo verdaderas formas de resistencia con vida latente; estas formas ya no varían (3).

Los Streptomyces que se utilizaron en el presente trabajo, estaban conservados en medio de suelo en forma de esporas, por lo cual -- tuvieron que ser resembradas en los medios sóli

dos E-3 y E-4 para su desarrollo. El procedimiento seguido fué: estando el medio todavía líquido se vació en los tubos, inclinándolos de tal manera, que presentasen la mayor superficie de siembra posible. Ya que el medio estuvo sólido, con una asa de platino flameada se sembró del medio de suelo al medio sólido y se dejó incubar en una estufa a 28°C durante 8 días, siendo este el tiempo en que se obtuvo el crecimiento óptimo. (Para mayor seguridad, todas estas siembras se hicieron por duplicado).

A continuación, y para seleccionar -- las cepas más activas, se estudió el espectro antimicrobiano de cada una de ellas, contra diferentes gérmenes: Bacillus subtilis, Candida albicans, Escherichia coli, Staphylococcus aureus y Saccharomyces sp. El método elegido fué el de las estrías cruzadas de Garré o anaxograma.

Método de Garré (10).-

Se prepara una caja con gelosa simple; con el asa de platino doblada en ángulo recto - (un centímetro) y flameada, se arrastran las esporas de los medios sólidos y se siembra en forma de una estría en un lado de la caja. Se incuba en una estufa a 35-37°C durante 48 horas, --

que es el tiempo necesario para que el organismo se desarrolle y difunda su principio antagónico en el medio. A continuación se siembran perpendicularmente a la estría anterior, cada uno de los microorganismos de prueba antes mencionados, estos también en estrías, pero mucho más angostas (0.5 cm.). La placa se incubaba a 35-37°C durante 24-48 horas, y la actividad se observa en milímetros de inhibición del crecimiento de los gérmenes.

Extracción del antibiótico.- ✓

Después de haber seleccionado las cepas más activas, se procedió a la extracción -- del antibiótico por medio de agitación de los medios líquidos adecuados, previamente inoculados e incubados convenientemente, los cuales deben de ser ricos en sustancias indispensables para la producción del antibiótico, tales como Carbono, Nitrógeno, sales minerales, etc. También es de suma importancia el pH del medio, -- que debe ser ligeramente alcalino, y la aereación, la cual se efectúa como se indicó anteriormente, por medio de la agitación mecánica -- (en agitadores tipo Kahn) de los matraces con medio inoculado (2, 13, 16, 21).

En matraces Erlenmeyer de 250 ml., --
conteniendo 50 ml. de cada uno de los medios lí-
quidos anteriormente citados, se inoculó un mi-
lilitro de suspensión de esporas. Esta suspen-
sión se obtuvo raspando con una asa de platino
la superficie crecida de los tubos de cultivo y
agregando 10 ml. de suero fisiológico.

Los matraces así inoculados, se agita
ron durante 96 horas a temperatura constante --
(28-30°C) en una cámara cerrada. Cada 24 horas
se hicieron pruebas de actividad por el método-
de los discos de papel.

Métodos para probar la actividad de los antibió
ticos.-

Hay diferentes métodos para probar la
actividad de los antibióticos. Entre los más u
sados, que están basados en la sensibilidad de
algunas bacterias, se encuentran las pruebas de
dilución usando gelosa o medio líquido; las de
difusión en gelosa; la prueba lineal; el método
de los discos de papel; etc. (24).

En el presente estudio fué usada la -
prueba de los discos de papel, por considerarse
la más adecuada.

Método de los discos de papel en placas de agar (4).- 1

Este método es una modificación simplificada del método de las copas de Oxford, descrito por Fleming (7) y modificado posteriormente por Foster y Woodruff (8) y por Vicent y Vicent (27) que consiste en usar discos de papel filtro ordinario o bien discos de espesor y diámetro adecuados (Wathman No. 1), como los que se emplean para las determinaciones de estreptomycina (18) en lugar de las copas de metal o vidrio.

El procedimiento seguido consistió en humedecer un hisopo estéril en una suspensión hecha de un cultivo viejo del germen de prueba, (*B. subtilis*); con este hisopo se sembró uniformemente la superficie de una placa de gelosa simple, la cual se dejó invertida, durante una hora, en la incubadora a 28°C. Posteriormente, con una pinza flameada se tomaron los discos de papel, previamente esterilizados, y se humedecieron en el filtrado del líquido que contenía el antibiótico; a continuación se colocaron dichos discos en la placa sembrada anteriormente. Esta placa sembrada se colocó invertida en la estufa donde permaneció durante 24 hs.; la acti

vidad observada fué en forma de un halo de inhibición (lisis) alrededor del disco.

Aislamiento de Streptomyces.-

Dos métodos fueron ensayados para aislar los Streptomyces:

Método de las diluciones (24).-

Se hacen diluciones de la cepa de --- Streptomyces con agar estéril (1:100, 1:1000, - 1:10 000) sembrando en placas de agar, con el objeto de obtener colonias aisladas, las cuales se resiembran en medios sólidos adecuados para su conservación.

Método de Giolitti y Craveri (11).-

Con una espátula flameada se corta un pedazo de medio que contenga Streptomyces, este pedazo es colocado en la base del tapón de algodón del tubo que contiene el medio sólido, adhiriéndolo de tal manera que el micelio quede hacia afuera. Se tapa el tubo suavemente y a continuación se le inclina ligeramente para que de este modo las esporas queden uniformemente esparcidas. Este tubo es colocado dentro de la estufa donde permanece hasta que se desarrollen los Streptomyces. El tapón de algodón anterior

mente usado, puede ser cambiado a un segundo tubo en el cual el aislamiento será más marcado; y así es posible continuar hasta completar una serie de tubos con un número cada vez menor de colonias aisladas. Es pertinente aclarar que dicho método ha sido usado con bastante éxito en este trabajo.

Para conocer la actividad del antibiótico obtenido, se hizo la prueba de Waksman y Reilly:

Método de Waksman y Reilly (31).-

En una caja Petri estéril, se colocan cantidades conocidas del filtrado estéril que contiene el antibiótico (1 ml., 0.3 ml., 0.1 ml. 0.03 ml. y 0.01 ml.) quedando una caja como testigo. A cada caja se le añaden 10 ml. de gelosa simple, enfriada a una temperatura aproximada de 42°C, pero todavía en estado líquido. Se mueven las cajas suavemente para homogeneizar la mezcla; se dejan enfriar y solidificar, se divide la caja en tres secciones, y se siembra cada germen de prueba en su sector correspondiente, usando una asa de platino doblada en ángulo recto, inoculándola una sola vez para cada tres estrías. Las cajas se incuban a 37°C, ha--

ciéndose las lecturas a las 24 hs. La actividad se expresa en unidades obtenidas dividiendo el volúmen del medio agregado a la placa, entre el volúmen del filtrado estéril.

Capítulo III

RESULTADOS Y DISCUSION.

En las tablas I y II, se pueden observar las características de cultivo de las cepas en estudio, a los 4 y a los 8 días de sembradas. En estas mismas tablas puede apreciarse que el crecimiento de las cepas en los dos medios sólidos E-3 y E-4 no presenta una variación pronunciada, o sea, que en los dos medios mencionados el desarrollo de los Streptomyces fué semejante. Ya que el medio E-3 presentaba menos obstáculos fué el que se utilizó para la conservación de las cepas.

Según estas tablas, las cepas estudiadas pueden ser clasificadas en tres grupos: cepas no-pigmentadas, cepas pigmentadas pero que no difunden dicho pigmento en el medio sólido, y por último, cepas pigmentadas que sí difunden su pigmento.

La cepa A-2 presentó un pigmento rojo que se esparció en el sustrato; su micelio aéreo fué primero blanco, tornándose completamente gris después de ocho días. El crecimiento en ambos medios fué abundante. Las cepas A-5, B-26

mb-2 y 473, no presentaron pigmentación alguna, y su micelio aéreo fué blanco (las cepas A-5 y 473 presentaron en su micelio un color rosado y verdoso respectivamente). La cepa N pigmentó el medio de café y su micelio fué gris. La cepa - Di-7 presentó pigmento café, pero éste no fué - difundido en los medios sólidos (en medio de ge losa simple sí difundió el pigmento café); el micelio aéreo fué blanco. La cepa B-12 no creció en el medio E-3, y en el medio E-4 su crecimiento fué casi nulo, por lo cual quedó eliminada.

En la tabla III se muestra el espectro antimicrobiano de cada una de las cepas antes citadas, contra cinco gérmenes de prueba diferentes: Saccharomyces sp., Candida albicans, Bacillus subtilis, Staphylococcus aureus y Escherichia coli. Todas las cepas, con excepción de la 473 (eliminada por no haber presentado -- reacción contra ninguno de los gérmenes de prueba), mostraron gran actividad contra B. subtilis y C. albicans. Saccharomyces sp. fué poco - sensible a las cepas A-2, B-26 y Di-7, pero mostró gran sensibilidad al antibiótico de las cepas A-5, mb-2 y N. Staphylococcus aureus fué - resistente a la cepa A-2, no así a todas las de

más, hacia las cuales mostró gran sensibilidad. E. coli fué sensible frente a las cepas A-5, -- B-26, DI-7 y mb-2, siendo resistente a las cepas A-2 y N.

En la tabla No. IV, se muestra la actividad de las cepas en cinco medios líquidos diferentes, contra un solo germen de prueba: B. subtilis, que fué el que se escogió, debido a su sensibilidad a todas las cepas estudiadas, -- según quedó asentado en la tabla III.

Cada una de las cepas se probó (por duplicado) en los cinco medios líquidos descritos en el capítulo anterior y, para saber durante qué tiempo se alcanzaba la actividad máxima, se hizo la prueba de los discos cada 24 hs. Generalmente el punto culminante de actividad se encontró entre las 72-96 hs. de agitación. Al aumentar la temperatura ambiente a 28-30°C, el tiempo necesario para dar la mayor actividad, se redujo a la mitad.

El medio no. 1 quedó eliminado, debido a que, con excepción de la cepa N, ninguna otra cepa difundió su principio activo en dicho medio.

Los medios que dieron mejores resultados fueron, respectivamente, el medio No. 7, el

No. 5 y el No. 3.

La cepa que fué seleccionada para la obtención del antibiótico fué la DI-7, por haber sido la más constante en las pruebas de actividad que se llevaron a cabo. Esta cepa fué conservada en medio E-3.

Resuspendiendo la cepa DI-7 y agregando a las esporas suero fisiológico, se hizo una suspensión la cual fué sembrada en un matraz Erlenmeyer conteniendo 50 ml. del medio líquido No. 7. Se dejó agitando a la temperatura ambiente durante 24 hs.; y después de transcurrido este tiempo, el contenido del matraz anteriormente indicado, se vació en un matraz Erlenmeyer de 1000 ml. el cual contenía 750 ml. del medio No. 7 enriquecido con las siguientes sales : K_2HPO_4 (3 gramos), y $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ (0.01 gramos). Este matraz se dejó agitando durante 48 hs. mas en una cámara cerrada, con temperatura constante de $28-30^{\circ}C$.

Como el medio No. 7 contiene harina de soya fué difícil separar el micelio de la parte líquida por medio de filtración y, además se perdía la actividad, por lo cual se procedió a separarlos por centrifugación.

Para la extracción final del antibió-

tico, se trataron separadamente el micelio y el líquido con las sustancias siguientes: éter etílico, metanol, formol, acetona, acetato de amilo, etanol y acetato de etilo. El micelio fué desechado pués registró una actividad muy leve. De la parte líquida, el alcohol etílico sólo extrajo una pequeñísima parte. El metanol y los acetatos no lo extrajeron. La acetona formó un precipitado que contuvo toda la actividad, y el éter etílico fué el que mejores resultados dió extrayendo la mayor parte.

El procedimiento final consistió en ajustar a pH 8.2 la parte líquida clara y adsorber con carbón activado tipo Norita "A" (0.5%), agitándolo a la temperatura ambiente durante una hora. Después de este tiempo se efectuó la filtración.

El adsorbente se mezcló con una cantidad de etanol (al 70%) igual a la décima parte, del volumen original adsorbido. Se volvió a fijar el pH a 8.2 y se agitó otra vez durante una hora. Como el antibiótico es de naturaleza ácida, se procuró conservar siempre un pH ligeramente alcalino para su mejor extracción (22). - El eluato se concentró por medio de evaporación al vacío a una temperatura constante de 0°C. Al

probarse su actividad por el método de Waksman-Kelly se encontró una actividad de 250 U.W.R.

El producto crudo obtenido fué posteriormente purificado en el Laboratorio de Microbiología de la Escuela Nacional de Ciencias Químicas e identificado como Actinomicina. (Fig.1)

Tabla 1

Características de cultivo de las cepas estudiadas
(después de incubadas 4 días)

CEPAS	MEDIO E-3			MEDIO E-4		
	Crecimiento	Pigmento del micelio sub-stratal	Micelio aéreo	Crecimiento	Pigmento del micelio sub-stratal	Micelio aéreo
A-2	+++	Rojo	Blanco grisáceo	++	Rojo	Blanco
A-5	+	--	Blanco	+	--	Blanco rojizo
B-12	-	--	--	+	--	Blanco
B-26	+	--	Blanco	++	--	Blanco
Di-7	++	Café	Blanco	+++	Café	Gris
mb-2	++	--	Blanco	++	--	Blanco
473	++	--	Blanco verdoso	+	--	Verde
N	+	Café	Gris amarillento	+	Café	Gris

Tabla II
 Características de cultivo de las cepas estudiadas
 (después de incubadas 8 días)

CEPAS	MEDIO E-3			MEDIO E-4		
	Crecimiento	Pigmento del micelio substratal	Micelio aéreo	Crecimiento	Pigmento del micelio substratal	Micelio aéreo
A-2	++++	Rojos	Gris	++++	Café rojizo	Gris
A-5	++	--	Blanco	++	--	Rosado
B-12	--	--	--	+	--	Gris
B-26	+++	--	Blanco grisáceo	+++	--	Blanco
DI-7	+++	Café	Blanco	++++	Café	Blanco
MB-2	++	--	Blanco	++	--	Blanco
473	+	--	Blanco verdoso	+	--	Verde
N	++	Café	Gris	++	Café	Gris

Tabla III

Espectro antimicrobiano de las cepas estudiadas
(Método de las estrias de Carré, inhibición en mm.)

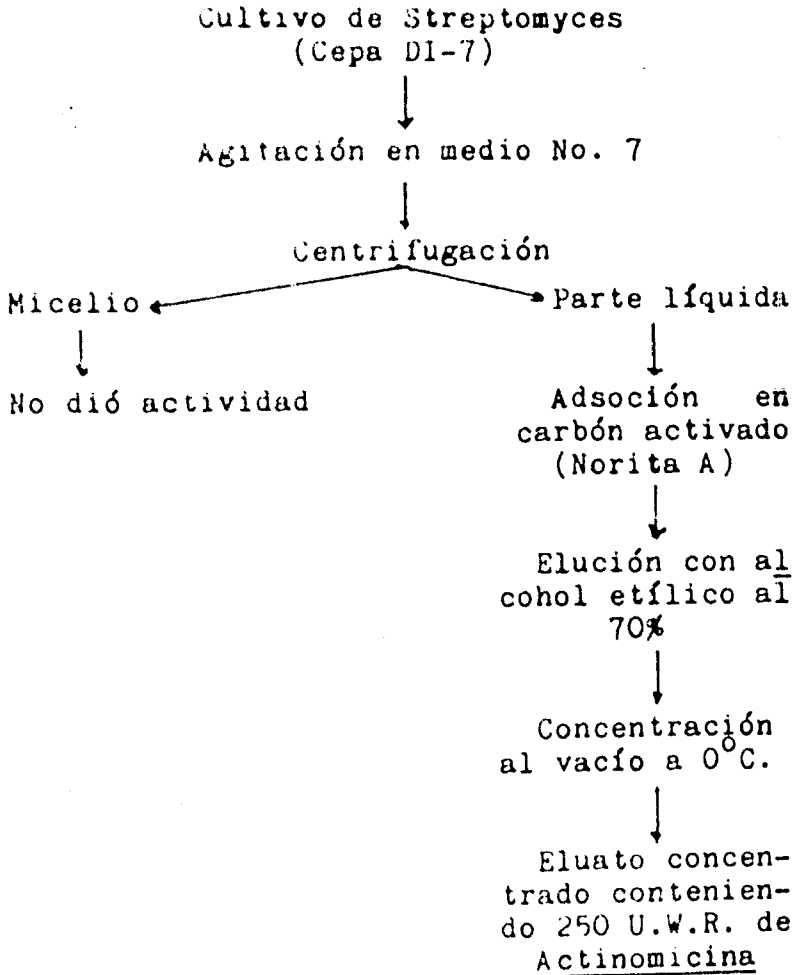
CEPAS	MICROORGANISMOS DE PRUEBA				
	Saccharomyces sp.	Candida albicans	Bacillus subtilis	Staphylococcus aureus	Escherichia coli
A-2	5	11	22	--	--
A-5	15	13	17	14	15
B-26	2	20	15	9	12
DI-7	2	15	18	7	17
mb-2	8	6	10	7	8
473	--	--	--	--	--
N	11	3	16	11	--

Tabla IV

Actividad de las cepas contra *B. subtilis* en diversos medios líquidos
(mm. de inhibición por el método de los discos)

CEPAS	MEDIOS DE CULTIVO														
	1			3			5			7			10		
ns.	48	72	96	48	72	96	48	72	96	48	72	96	48	72	96
A-2	--	--	--	--	13	15	--	--	--	--	--	--	--	14	15
A-5	--	--	--	--	--	--	19	22	26	17	20	19	--	15	23
B-26	--	--	--	--	15	21	--	20	20	--	--	--	--	--	--
D1-7	--	--	--	--	18	23	--	17	20	15	20	25	--	--	--
mb-2	--	--	--	--	16	16	--	19	20	--	16	17	--	15	15
N	--	14	15	--	--	15	--	15	14	--	--	--	12	14	--

Fig. No.1
Marcha para la separación del
antibiótico



Capítulo IV

RESUMEN Y CONCLUSIONES

1.- Se estudiaron ocho cepas de Streptomyces clasificadas bajo las siguientes claves: A-2, A-5, B-12, B-26, DI-7, mb-2, 473 y N.

2.- Estas cepas, se conservaron en -- dos medios sólidos adecuados para su cultivo: - E-3 y E-4.

3.- Se estudió el espectro antimicrobiano de dichas cepas contra cinco microorganismos de prueba: Bacillus subtilis, Candida albicans, Escherichia coli, Staphylococcus aureus y Saccharomyces sp. Dos de las cepas anteriormente nombradas (B-12 y 473), quedaron eliminadas, por no haber presentado actividad.

4.- Se investigó la actividad de las seis cepas restantes en cinco medios líquidos, denominados con los números: 1, 3, 5, 7 y 10. - Se seleccionó la cepa DI-7 para la extracción del antibiótico.

Dicha extracción se hizo por adsorción de los filtrado en carbón activado (Norita "A"), y elución posterior con etanol al 70%. El

eluato se concentró por medio de evaporación al vacío, a una temperatura constante de 0°C.

Capítulo V

BIBLIOGRAFIA

- 1).- Binkley, B.B. "Biochemistry of Antibiotics" Ann. Rev. Biochem. 25: 579-615 (1955).
- 2).- Carter, H.E. y J.H. Ford. Ann.Rev. Biochem. 19: 487 (1950).
- 3).- De Lille, J. "Biología General" E.C.L. A.L. y Porrúa Hnos. México. 78-79 (1948).
- 4).- Edwin, J.B. y M.B. Sherwood. "The paper disc agar plate for the assay of -antibiotic substances". Jour. Bact 50: 459-467 (1945).
- 5).- Emerson, R.L., J.A. Whiffen, N. Bohonos y E.J. DeBeer. "Studies on the production of antibiotics by Actinomyces and Molds" Jour. Bact. 52: 357 (1946).
- 6).- Erikson, D. "The morphology, cytology - and taxonomy of the Actinomyces". Ann. Rev. Microbiol. 3: 23 (1949)
- 7).- Fleming, A. "In vitro test of Penicillin" Lancet 1: 732-733 (1942).

- 8).- Foster, J.W. y H.B. Woodruff. "Improvements in the cup assay of Penicillin" Jour. Biol. Chem. 148: -- 723-724 (1944).
- 9).- Probisher, M. "Fundamentals of Microbiology" W.B. Saunders Co. 394-395. (1953).
- 10).- Garré, C. "Über antagonisten unter den bakterien" Entr. Bak. Parasitenk. 2: 312-313 (1887). Cit. por Waksman.
- 11).- Giolitti, G. y R. Craveri. "A method for isolating Streptomyces". Jour. -- Gral. Microbiol. 17: 649 (1957).
- 12).- Herrell, W.E. "Penicillin and other antibiotic agents" W.B. Saunders Co 321-322 (1946).
- 13).- Irving, G.W. y H.T. Herrick. "Antibiotics" Chem. Pub. Co. Nueva York. (1949).
- 14).- Karel, L. y R.E. Spences. "A dictionary of Antibiosis". Columbia University Press, 9. Nueva York (1951).
- 15).- Kavanagh, F. "Activities of 22 antibacterial substances by serial dilution methods" Bull Torrey Bot. -- Club 74: 303-320 (1947).

- 16).- Kirby, W.M.M. "Antibiotics" Ann. Rev. Microbiol. 6: 387-410 (1952).
- 17).- Krueger, W.W. "Principles of Microbiology" W.B. Saunders Co. 113-114 -- (1953).
- 18).- Loo, Y.A., P.S. Shell, H.H. Thonberry, J. C. Sylvester, J. Ehrlich, J.M. McGuire y G.M. Savage. "Assay of - Streptomycin by the paper-disc plate method" Jour. Bact. 50: 701 -- 709 (1945).
- 19).- Martínez Rosas, A. "Identificación cromatográfica de antibióticos anti-fúngicos" (Tesis) E.N.C.Q. (1957).
- 20).- Ferlman, D. "Physiological studies in - the Actinomycetes" Bot. Rev. 19: 46-47 (1953).
- 21).- Pratt, E. y J. Dufrenoy. "Antibiotics". J.B. Lippincott Co. Filadelfia --- (1949).
- 22).- Ramírez Peralta, M.T. "Obtención y Cromatografía de un antibiótico polipeptídico" (Tesis) E.N.C.Q. (1959)
- 23).- Salle, A.J. "Fundamental principles of Bacteriology". McGraw Hill Book Co Nueva York. 362, 483. (1955).

- 24).- Sánchez Marroquín, A. "Antagonismo microbiológico de algunas especies de *Streptomyces* aislados del suelo" U.N.A.M. Esc. de Grad. (1951).
- 25).- Sánchez Marroquín, A. Revista do Instituto de Antibióticos 1: 53-56 (Univ. do Recife, Brasil) (1958).
- 26).- Sánchez Marroquín, A. "Microbiología Agrícola e Industrial" 2-11, 70-80 (1954).
- 27).- Vicent, J.G. y H.W. Vicent "Filter paper-disc modification of the Oxford cup penicillin determination" Proc. Soc. Expt. Biol. Med. 55: 162-169 (1944).
- 28).- Waksman, S.A. "Antibiotics" Collier's Encyclopedia. Nueva York. (1956).
- 29).- Waksman, S.A. "The Actinomycetes" Chronica botanica Co. Mass. (1950).
- 30).- Waksman, S.A. y M.P. Lechevalier. "Actinomycetes and their antibiotics". The Williams & Wilkings Co. Baltimore. (1955).
- 31).- Waksman, S.A. y A.C. Reilly "Agar streak method for assaying antibiotic substances" Ind. Eng. Chem. Anal.

Ed. 17: 556 (1945).

32).- Waksman, S.A. y A.B. Woodruff. "Bacte--
riostatic and bactericidal substances
produced by soil Actinomyces"
Proc. Soc. Expt. Biol. Med. 45: --
609-614 (1940).