

UNIVERSIDAD AUTONOMA METROPOLITANA

UNIDAD IZTAPALAPA



DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD  
POSGRADO EN BIOTECNOLOGÍA

**“Identificación y caracterización parcial de un antibiótico  
proveniente de *Streptomyces paucisporogenes*”**

TESIS

Que para obtener el grado de  
**MAESTRO EN BIOTECNOLOGÍA**

Presenta:

***Omar Edgar Peralta Valle***

**Director**

Dr. Armando Mejía Álvarez.

**Asesores:**

Dr. José Guillermo Ávila Acevedo

Dr. Javier Barrios González

Dr. Francisco Fierro Fierro

México, D.F; Junio 2013

## COMITÉ TUTORAL

Director

**Dr. Armando Mejía Álvarez**

Departamento de Biotecnología

División de Ciencias Biológicas y de la Salud.

Universidad Autónoma Metropolitana - Iztapalapa

Asesores

**Dr. José Guillermo Ávila Acevedo**

Laboratorio de Fitoquímica.

UBIPRO, FES-Iztacala. UNAM.

**Dr. Javier Barrios González**

Departamento de Biotecnología

División de Ciencias Biológicas y de la Salud.

Universidad Autónoma Metropolitana - Iztapalapa

**Dr. Francisco Fierro Fierro**

Departamento de Biotecnología

División de Ciencias Biológicas y de la Salud.

Universidad Autónoma Metropolitana - Iztapalapa



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA *Iztapalapa*

---

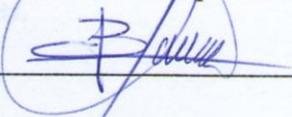
La maestría en Biotecnología de la Universidad Autónoma Metropolitana, está incluida en el programa Nacional de Posgrados de calidad (PNCP) del CONACyT, con número de referencia 001465.

Los miembros del jurado designados por la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa, abajo firmantes, aprobaron la tesis titulada: **“Identificación y caracterización parcial de antibiótico proveniente de *Streptomyces paucisporogenes*”**, con fecha 17 junio del 2013.

JURADO DE EXAMEN

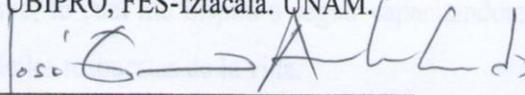
*Presidente:*

**Dr. Javier Barrios González**  
Departamento de Biotecnología  
División de Ciencias Biológicas y de la Salud.  
Universidad Autónoma Metropolitana - Iztapalapa



*Secretario:*

**Dr. Guillermo Ávila Acevedo**  
Laboratorio de Fitoquímica.  
UBIPRO, FES-Iztacala. UNAM.



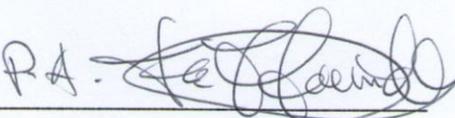
*Vocal:*

**Dr. Ángel Eduardo Absalón Constantino**  
Centro de investigación en Biotecnología Aplicada.  
Instituto Politécnico Nacional.



*Vocal:*

**Dra. Ana Gisela Reyes Alvarado**  
Laboratorio de Biología molecular.  
Química Agronómica de México, S. de R. L. de C. V.



## DEDICATORIAS

### *A mi linda esposa.*

Dedico este trabajo a Leslye Sámano, por su apoyo y animo, que día a día fue la fuerza motivadora para la realización de este trabajo.

### *A mis compañeros y amigos.*

Que me dedicaron tiempo para orientarme en momentos difíciles, con quienes aprendí que el trabajar también divierte y me mostraron que existen personas con gran calidad humana que ayudan desinteresadamente, lo cual me inspira a seguir capacitándome y avanzar día tras día para encontrar las difíciles respuestas de la vida.

Muchas Gracias a todos

### *A mis profesores.*

Por su tiempo y dedicación, porque al enseñarme a ser critico de mi trabajo me permitieron ver nuevos horizontes llenos de posibilidades.

## AGRADECIMIENTOS

A *CONACyT* por el apoyo económico proporcionado durante la realización de este trabajo. (Becario 211716).

A *CONACyT* y Química Agronómica de México S.A. de C.V. Convenio de colaboración: COVIA-0445-2010 Aplicación agronómica de diferentes actinomicetos (2009-2011).



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA *Iztapalapa*

---

El azar solo favorece a los espíritus preparados

Louis Pasteur (1822-1895)



## INDICE

Comité tutorial.....	i
Dedicatorias .....	iv
Agradecimientos .....	v
<b>Indice .....</b>	<b>vii</b>
Índice de figuras.....	ix
Índice de Tablas.....	xi
<b>Introducción .....</b>	<b>1</b>
Clasificación de los antibióticos.....	3
Clasificación según la tinción de Gram de las bacterias.....	3
Clasificación según el mecanismo de acción .....	4
Clasificación de los antibióticos según su estructura química .....	7
Producción de Antibióticos.....	9
Metabolitos secundarios.....	10
Importancia de encontrar nuevos antibióticos que replacen los existentes. .....	13
Actinomicetos .....	13
<i>Streptomyces</i> .....	15
Características genéticas del género <i>Streptomyces</i> .....	16
<i>Streptomyces</i> y sus metabolitos secundarios .....	17
<i>Streptomyces paucisporogenes</i> .....	18
<b>Justificación .....</b>	<b>19</b>
<b>Objetivos .....</b>	<b>21</b>
<b>Materiales y métodos.....</b>	<b>22</b>
Crecimiento y conservación .....	23
Medios de cultivo .....	24
Bioensayos para determinar actividad antimicrobiana. ....	24
“Bioensayo de cobertera” para <i>Streptomyces</i> en medio MS agar en placa. .	25
“Bioensayo de inmersión de fitopatógenos en agar LB suave para monitorear actividad inhibidora de crecimiento” .....	25
“Bioensayo de inmersión de fitopatógenos” en agar LB suave para probar fracciones provenientes de las extracciones líquido-líquido.....	26
“Bioensayo de extensión en superficie” .....	26



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

*Iztapalapa*

---

Extracción de principio activo por precipitación por pH y extracción líquido-líquido por solventes orgánicos. ....	26
“Extracción del principio activo con solventes orgánicos grado reactivo” .....	27
Separación de principio activo por cromatografía en capa fina .....	27
Espectroscopia de infrarrojo cercano .....	27
Cromatografía de líquidos de alta resolución. ....	28
<b>Resultados.....</b>	<b>29</b>
Bioensayos: .....	29
Bioensayo para determinar actividad antimicrobiana. ....	29
Autobiógramas.....	37
Espectrometría de infrarrojo cercano .....	38
Los resultados de cromatografía HPLC. ....	39
Resonancia magnética nuclear de hidrógeno (RMNH) .....	42
<b>Discusión de resultados.....</b>	<b>43</b>
<b>Conclusiones .....</b>	<b>48</b>
<b>Bibliografía .....</b>	<b>49</b>

## Índice de figuras

- Figura 1: Clasificación según la tinción de gram (Cué, 1998)..... 3
- Figura 2: imagen tomada en microscopio Olympus de fluorescencia con objetivo 100X de *Streptomyces coelicolor* A3. Forma un abundante micelio aéreo, filamentos ramificados, crecidos en medio Phage..... 13
- Figura 3: Muestra la forma en que se inoculó *Streptomyces* en medio MS agar en presencia de algunos microorganismos indicadores en agar LB suave en bioensayo por cobertera. *Streptomyces* de color oscuro en el centro de la placa y el crecimiento de colores que se encuentra en la periferia pertenece a los diferentes indicadores usados amarillo *Xanthomonas* sp y blanco con *B. subtilis*. ..... 31
- Figura 4: A) Cajas Petri obtenidas de bioensayo de inmersión de fitopatógenos en agar LB suave para monitorear actividad inhibidora de crecimiento de inmersión donde se muestra los diferentes medios probados arriba medio AN, abajo medio UP y en medio MS con *Xanthomonas* sp. Como indicador de crecimiento. B) Se muestra un acercamiento de los resultados que presentan mayor actividad de los medios AN (arriba) y UP (abajo) a los tiempos 46 horas y 72 horas..... 33
- Figura 5: Extracción con pH y solventes orgánicos. pH de 1-2, 3-4, 5-6, 7-8, 9-10 11-12 consecutivamente de izquierda a derecha. A) Fitopatógenos *Xanthomonas* sp. Como microorganismo sensible con 3 solventes utilizados en la extracción líquido-líquido. Benceno arriba, cloroformo en medio y acetato de etilo abajo. B) *B. subtilis* como microorganismo sensible con 3 solventes utilizados en extracción líquido-líquido. Cloroformo arriba, acetato de etilo en medio y dicloro metano abajo. .... 35
- Figura 6: Cromatofolios de silicagel 60 factor UV<sub>254</sub> donde se utilizó una fase móvil de diclorometano: acetona en proporción 6:4. A) Cromatoplasmas de 6 cm de largo que muestra los extractos obtenidos con acetato de etilo. B) Cromatoplasma de 6 cm de largo que muestra extractos obtenidos dicloro metano. C) Comparación de las fracciones extraídas con diferentes solventes. Del lado izquierdo muestra el extracto que se obtuvo con acetato de etilo, derecha muestra el extracto con diclorometano. .... 37
- Figura 7: Bioensayo de extensión de superficie con *B. subtilis*. Muestra la actividad del principio activo después de ser eluidas con fase móvil de diclorometano: acetona en proporción de 6:4. Del lado izquierdo es una fracción proveniente de la extracción líquido-líquido con acetato de etilo y del lado derecho es una muestra proveniente del caldo de producción (control positivo). ..... 38

- Figura 8: Comparación de espectros de infrarrojo de 650 a 4000 nm en transmitancia entre gentamicina comercial diluida (2mg/ml) con extracto concentrado de medio de cultivo donde la línea que se encuentra por encima es la gentamicina comercial diluida a 2 mg/mL y la línea de abajo muestra la muestra purificada resuspendida en agua para tener concentración de 2 mg/mL..... 39
- Figura 9: Muestra los reportes de masa de las diferentes fracciones separadas en la cromatografía con HPLC – ESI se separó en columna Eclipse C18 con fase móvil de MeOH/agua 55/45 con flujo de 0.2 mL/min..... 41
- Figura 10: Espectros de resonancia magnética nuclear de hidrógeno disuelto en piridina a 25 °C de la estructura proveniente de *Streptomyces paucisporogenes*..... 42
- Gráfica 1: Muestra el comportamiento de crecimiento de *Streptomyces paucisporogenes* en medio líquido Phage ( $\phi$ ). A 30°C y 150 RPM. .... 32

## Índice de tablas

Tabla 1: Antibióticos que inhiben la síntesis de proteínas (Macarulla, 1994). .....	5
Tabla 2: Clasificación de los antibióticos según su estructura química, se muestra un ejemplo representativo de cada grupo (Madigan, 2006).....	7
Tabla 3: Antibióticos producidos comercialmente (Madigan, 2006).....	12
Tabla 4: Actinomicetos y géneros relacionados (Madigan, 2006). .....	14
Tabla 5: características de genomas secuenciados de <i>Streptomyces</i> (Martínez, 2007). ..	17
Tabla 6: Ejemplos de algunos antibióticos producidos por el género <i>Streptomyces</i> (Ribelles, 2008). .....	17
Tabla 7: Productos naturales del género <i>Streptomyces</i> con otras aplicaciones distintas a la de antibióticos (Ribelles, 2008).....	18
Tabla 8: Antibióticos agrícolas comúnmente usados (Modificado de Mcmanus, 1999). ....	20
Tabla 9: Microorganismos utilizados.....	22
Tabla 10: medios de cultivo utilizados para el crecimiento de <i>Streptomyces</i> y otras bacterias fueron tomados de Keise <i>et al</i> , (2000):.....	24
Tabla 11: Muestra resultados de bioensayo de cobertera para <i>Streptomyces</i> en medio MS agar en placa donde si = inhibición de crecimiento. No = sin actividad. Parcial = inhibición de crecimiento parcial. ....	29
Tabla 12: Descripción aparente producida por el cambio de pH. ....	33
Tabla 13: extracto obtenido con diferentes solventes orgánicos resuspendido en agua a pH 7 y puesto en contacto con de <i>Xanthomonas sp.</i> en ensayo con cobertera. Donde “si” = inhibición es total o el número de UFC es menor a 50 por caja, parcial” = una inhibición de crecimiento UFC superior a 100, inferior a 200. “y “no” = mayor de 400 UFC por caja Petri. ....	34

## INTRODUCCIÓN

Desde la aparición del hombre se ha librado una lucha para combatir enfermedades infecciosas, lo que ha generado la búsqueda de sustancias que puedan ayudar a preservar la vida e incrementar la salud, lo que llevó a encontrar terapias con medicamentos, antibióticos, entre otros. La definición de antibiótico se conoce como compuesto químico producido por un ser vivo o producido por síntesis utilizado para eliminar o inhibir el crecimiento de organismos infecciosos, tiene un origen griego "*anti*" y "*bios*", que significan "contra" y "vida" respectivamente. El uso de los antibióticos se conoce desde la antigüedad, el primer registro de uso de estos fue encontrado en una tableta de barro proveniente de Sumeria, cuya antigüedad corresponde al tercer milenio antes de Cristo. En ella se describe como mezclarse vino, ciruelas y aceite para aplicar sobre la piel o heridas. (Ponce de León, 1998). Mediante el método de "ensayo-error", el hombre prehistórico fue encontrando plantas y sustancias minerales que resultaban eficaces frente a las infecciones y construyó poco a poco una auténtica farmacopea para el tratamiento de los procesos infecciosos basada en conocimientos –rudimentarios si se quiere– acerca de la desinfección. Así sucede, por ejemplo, con los aborígenes australianos, de los cuales es bien conocido el uso que han hecho; desde los tiempos más remotos, con las hojas de té para tratar heridas, mordeduras y todo tipo de infecciones cutáneas (García J, 2006; García Rodríguez José Ángel, 2006). Los extractos de ciertas plantas medicinales se han utilizado durante siglos, en la civilización egipcia era común el uso de aceite de ricino, menta, opio, aloe, así como distintos minerales. También era conocido el uso de la ipecacuana por los indios del Amazonas, o de la quinina y la cocaína por los incas (Alanís, 2007), a su vez el uso de miel combinada con otras sustancias para curar afecciones de la piel en Circa Egipto (Ponce de León, 1998).

Las primeras observaciones de lo que hoy en día se denominaría efecto antibiótico fueron realizadas por J. Henle, quien en 1840 defendió desde un punto de vista científico el origen microbiano de las enfermedades contagiosas y la especificidad de los gérmenes. Después, J. Davaine describió el bacilo causante del carbunco (1855) y produjo experimentalmente la

enfermedad (1860). Por esas mismas fechas, L. Pasteur mostró la interacción entre un *Penicillium* y algunas bacterias y señaló que las bacterias (*infusoria*) no se desarrollaban en un caldo de cultivo cuando estaba presente el *Penicillium*. Sería también L. Pasteur quien descubriera la vida anaerobia, desmintiera mediante pruebas experimentales la teoría de la generación espontánea, demostrara la teoría microbiana de la infección y formulara la ley fundamental de la acción antibiótica (García, 2006). Estos trabajos fueron las bases que trazaron el desarrollo del uso, aplicación y producción de antibióticos que han beneficiado a la humanidad en el último siglo.

De los antibióticos que se han descubierto el porcentaje utilizado en medicina y/o veterinaria es del 1% (Madigan, 2006). Menos del 0.1% usados para el control de enfermedades en plantas (McManus, 1999). No obstante el impacto que han tenido los antibióticos contra las infecciones es fundamental. La eficacia de algunos se ha modificado químicamente en el laboratorio, obteniendo así antibióticos semisintéticos que modifican su modo de acción favoreciendo su actividad en contra de su microorganismo diana (García, 2006).

Los antibióticos han contribuido decisivamente tanto al aumento de la esperanza de vida de la población como a la mejora de la calidad de vida de las sociedades. Los antibióticos han sido, como probablemente ningún otro grupo de medicamentos una fuente de bienestar, pero, el uso y abuso de los mismos han traído consigo importantes problemas sanitarios y medioambientales, a la cabeza de los cuales hay que situar la aparición y desarrollo de las resistencias bacterianas (García, 2006). El impacto de esta aparición de resistencia a terapias con medicamentos en humanos ha generado el desuso de los antibióticos restringiendo así la aplicación en uso veterinario y/o agrícola.

## Clasificación de los antibióticos

Una primera clasificación depende de su mecanismo de acción frente a los organismos infecciosos. Algunos lesionan e inhiben la formación de la pared celular, otros alteran la membrana celular y afectan su permeabilidad, la mayor parte de ellos inhiben la síntesis proteica, es decir inhiben la transcripción y traducción de material genético, otras inhiben la formación de ácidos nucleicos y polímeros constituyentes de la célula bacteriana (Cordiés, 1998). Otra clasificación agrupa a los antibióticos en función de las bacterias contra las que son eficaces, estafilococos, estreptococos y *Escherichia coli*. Otra clasificación toma como base su estructura química (Cordiés, 1998). Se diferencian así las penicilinas, las cefalosporinas, los aminoglucósidos, las tetraciclinas, los macrólidos y las sulfamidas, entre otros

### Clasificación según la tinción de Gram de las bacterias.

Dependiendo de la actividad que tienen los antibióticos frente a las bacterias gram positivas y gram negativas que pueden clasificarse de la siguiente manera (Figura 1) (Sande, 1993).

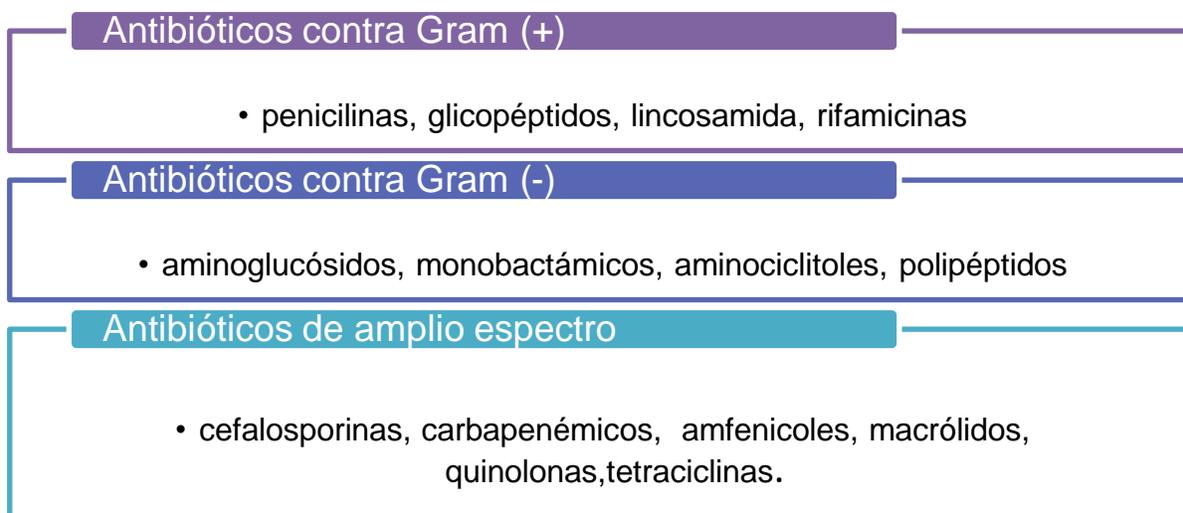


Figura 1: Clasificación según la tinción de gram (Cué, 1998).

La sensibilidad de los microorganismos a los antibióticos varía. Las bacterias gram positivas son generalmente más sensibles a los antibióticos que las bacterias gram negativas, aunque algunos antibióticos sólo actúen en bacterias gram negativas. Un antibiótico que actúe tanto en bacterias gram positivas como gram negativas se denomina *antibiótico de amplio espectro* (Madigan, 2006).

### Clasificación según el mecanismo de acción

Es el mecanismo por el cual un antibiótico es capaz de inhibir el crecimiento o destruir una célula bacteriana. Se dividen en inhibidores de la formación de la pared bacteriana impidiendo la formación de peptidoglicano, inhibidores de la síntesis proteica que afectan a nivel ribosomal, inhibidores de la duplicación de ácidos nucleicos, agentes anti metabólicos que afectan rutas metabólicas y agentes que actúan directo sobre de la membrana (Cué, 1998).

#### **Inhibidores de la formación de la pared bacteriana**

Varias clases de antibióticos actúan inhibiendo la síntesis del peptidoglucano, ya sea por bloqueo directo del lugar catalítico de alguna enzima, o mediante la formación de complejos con determinados sustratos (Martínez, 2007).

Penicilinas, cefalosporinas y otros antibióticos betalactámicos (todos los betalactámicos actúan en el último paso de la síntesis del peptidoglucano, e inhiben las reacciones de transpeptidación catalizadas por varias proteínas fijadoras de penicilina), agentes disímiles, como vancomicina, bacitracina, cicloserina, inhibidores de betalactamasa y los antimicóticos imidazólicos, miconazol, ketoconazol y clotrimazol (Cué, 1998).

#### **Inhibidores de la síntesis proteica**

Varios antibióticos inhiben la síntesis proteica y la mayoría lo hacen uniéndose a distintas bases nitrogenadas del ARN ribosómico (ARNr) que forman parte del centro de

decodificación, que son parte fundamental de la formación de enlaces peptídicos (peptidiltransferasa) o de la región próxima de la entrada al túnel de salida del péptido recién sintetizado (Hermann, 2005; Tenson y Mankin, 2006).

En el ribosoma bacteriano, el centro de decodificación se halla en una pequeña región del ARNr 16S de la subunidad 30S, mientras que el lugar de formación de péptidos y la entrada al túnel de salida de la proteína recién formada están constituidos por nucleótidos contenidos en un bucle del dominio V del ARNr 23S de la subunidad 50S. El ácido fusídico actúa por un mecanismo distinto, se une al factor de elongación G y estabiliza el complejo formado entre ese factor y el difosfato de guanosina, lo cual impide que el ARNt pueda desplazarse desde el centro de decodificación al centro de formación de enlaces peptídicos. Constituye otra excepción la mupirocina, un antibiótico de uso exclusivamente tópico que inhibe la sintetasa de isoleucil-ARNt, una enzima que cataliza la formación de isoleucil-ARNt a partir de isoleucina y ARNt. La mupirocina impide la incorporación de isoleucina a los péptidos en formación y determina el bloqueo de la síntesis proteica (Martínez, 2007)

Tabla 1.

Tabla 1: Antibióticos que inhiben la síntesis de proteínas (Macarulla, 1994).

<b>Antibiótico</b>	<b>Microorganismo productor</b>	<b>Acción</b>	<b>Organismos sensibles</b>
<b>Estreptomicina</b> (Schneider y col., 2011)	<i>Streptomyces griseus</i>	Se une al Rb 30s. Inhibe la iniciación y provoca errores de lectura de tripletes.	Procariotas
<b>Tetraciclinas</b> (Rodríguez y 1998)	<i>Streptomyces rimosus</i>	Inhiben la iniciación.	Procariotas
<b>Cloramfenicol</b> (Morales, 2007)	<i>Streptomyces venezuelae</i>	Inhibe la peptidiltransferasa del Rb 50s.	Procariotas
<b>Cicloheximida</b> (Kominek, 1975)	<i>Streptomyces griseus</i>	Inhibe la peptidiltransferasa del Rb 60s.	Eucariotas
<b>Eritromicina</b> (Gómez, 2007)	<i>Streptomyces erythreus</i>	Se une al Rb 50s e inhibe la translocación.	Procariotas
<b>Puomicina</b> (Espinosa, 1999)	<i>Streptomyces alboniger</i>	Provoca terminación prematura del péptido.	Procariotas y Eucariotas

## **Inhibidores la síntesis de ácidos nucleicos**

Dos familias de antibióticos clínicamente relevantes, las quinolonas y las rifamicinas (rifampicina y análogos) tienen como dianas específicas varias enzimas involucradas en la síntesis de ácidos nucleicos. Las quinolonas inhiben la actividad de las topoisomerasas de tipo 2 bacterianas después de que éstas se han unido al ADN. La mayoría de bacterias contienen 2 clases de topoisomerasas de tipo 2, la girasa y la topoisomerasa IV. Ambas son tetrámeros constituidos por 2 tipos de subunidades. El voluminoso ADN bacteriano cabe en el interior de la célula gracias a que se encuentra densamente enrollado sobre sí mismo. Sin embargo, para que el ADN pueda replicarse y transcribirse es preciso contar con la actividad de enzimas que relajen su estructura superhelicoidal y separen las moléculas hijas que, de otra manera, quedarían encadenadas. La girasa se encarga del “desenrollado” y la topoisomerasa IV de la separación de las moléculas hijas. El proceso incluye la ruptura de la doble cadena de ADN y su sellado posterior. Las rifamicinas se fijan a la subunidad beta de la polimerasa del ARN dependiente del ADN y bloquean la elongación del ARNm cuando ésta alcanza 2 o 3 nucleótidos. Todos los derivados comparten el mismo mecanismo de acción y la resistencia suele ser cruzada (Martínez, 2007).

### **Antibióticos que actúan en la membrana externa de bacterias gram negativas o en la membrana citoplasmática**

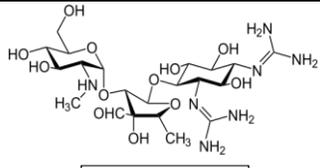
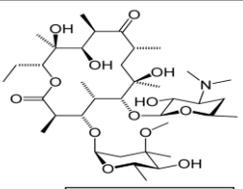
Las bacterias gram positivas tienen una cubierta de peptidoglucano gruesa situada por fuera de la membrana citoplasmática. Los microbios gram negativos poseen también una capa de peptidoglucano, más fina que la de los gram positivos, pero disponen además de una membrana exterior de composición asimétrica. La lámina interna de esta membrana está constituida por fosfolípidos, mientras que la externa contiene un lípido glucosilado especial denominado lipopolisacárido o endotoxina. Varios derivados de naturaleza lipopeptídica tienen la capacidad de insertarse en las membranas lipídicas. Este mecanismo de acción es completamente distinto al de otros antibióticos y, por tanto, no hay resistencia cruzada. Las polimixinas actúan específicamente en la cubierta externa de las bacterias gram negativas.

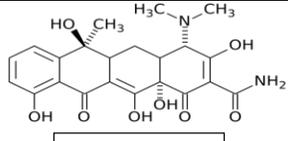
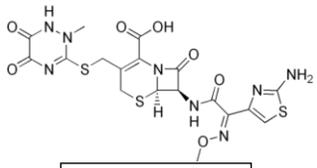
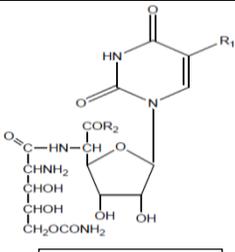
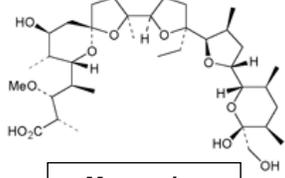
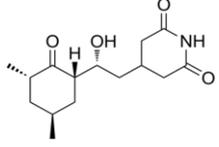
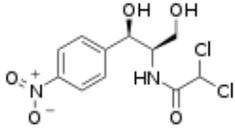
Las polimixinas, en su estado policatiónico, determinan la destrucción de la membrana externa de las bacterias gramnegativas mediante el desplazamiento de los puentes de  $Ca^{++}$  y  $Mg^{++}$  que estabilizan las moléculas de lipopolisacárido. La inserción del fármaco en la membrana exterior está facilitada por la interacción entre el lípido del lipopolisacárido y el ácido graso de la polimixina. El resultado es un aumento de la permeabilidad de la membrana externa y la muerte rápida de la bacteria, con independencia del estado metabólico en que se encuentre (Evans y col., 1999; Li y col., 2006; Martínez, 2007).

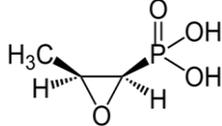
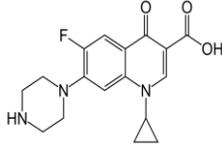
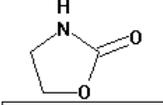
### Clasificación de los antibióticos según su estructura química

Esta clasificación es la más utilizada en la literatura científica. Se fundamenta en la similitud química de algunos antibióticos, según los núcleos base de sus estructuras, los cuales les confieren cierta semejanza en sus propiedades físico-químicas y farmacológicas, en dependencia también de las adiciones de grupos químicos que posean en dichos núcleos base, Tabla 2 (Cué, 1998).

Tabla 2: Clasificación de los antibióticos según su estructura química, se muestra un ejemplo representativo de cada grupo (Madigan, 2006).

Clasificación del antibiótico	Subclasificación	Ejemplo	Estructura representativa
I. Compuestos que contienen carbohidratos (Núñez, 2006)	Azúcares puros Aminoglicósidos Ortosomicinas N-Glicósidos C-Glicósidos Glicolípidos	Nojirimicina Estreptomina Everninomicina Estreptotricina Vancomicina Moenomicina	 <b>Estreptomina</b>
II. Lactos macrocíclicas (Giner, 1995) (Caballero, 2007)	Antibióticos macrólidos. Antibióticos poliénicos. Ansamicinas. Macrotetrólidos.	Eritromicina Candidina Tetranactina	 <b>Eritromina</b>

Clasificación del antibiótico	Subclasificación	Ejemplo	Estructura representativa
III. Quinonas y compuestos relacionados	Tetraciclinas. Antraciclinas. Naftoquinonas. Benzoquinonas.	Tetraciclina Adriamicina Actinorrodina Mitomicina	 <p style="text-align: center;"><b>Tetraciclina</b></p>
IV.  Aminoácidos y análogos peptídicos	Derivados aminoacídicos. Antibióticos β-lactámicos.  Antibióticos peptídicos. Cromopéptidos. Depsipéptidos. Péptidos formadores de quelato.	Cicloserina.  Penicilina ceftriaxona  Bacitracina Actinomicina Valinomicina Bleomicina.	 <p style="text-align: center;"><b>Ceftriaxona</b></p>
V.  Compuestos heterocíclicos que contienen nitrógeno. (Becker y col., 1983)	Antibióticos nucleosídicos.	Polioxinas.	 <p style="text-align: center;"><b>Polioxinas</b></p>
VI. Compuestos heterocíclicos que contienen oxígeno	Antibióticos poliéter.	Monensina.	 <p style="text-align: center;"><b>Monensina</b></p>
VII. Derivados alicíclicos.	Derivados del cicloalcano.  Antibióticos esteroides.	Cicloheximida  Ácido fusídico.	 <p style="text-align: center;"><b>Cicloheximida</b></p>
VIII.  Compuestos aromáticos	Derivados del Benceno. Aromáticos condensados.  Éter aromáticos.	Cloranfenicol.  Griseofulvina.  Novobiocina.	 <p style="text-align: center;"><b>Cloranfenicol</b></p>

Clasificación del antibiótico	Subclasificación	Ejemplo	Estructura representativa
IX. Compuestos alifáticos (Gobenardo, 2003)	Compuestos que contienen fósforo	Fosfomicina	 <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">Fosfomicina</div>
X. Compuestos quinolónicos.	4-Quinolona. Fluoro-4-quinolonas.	Ácido nalidíxico. Ciprofloxacino.	 <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">Ciprofloxacino</div>
XI. Oxazolidinona	Lactona cíclica.	2-Oxazolidinona	 <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">2-Oxazolidinona</div>

### Producción de Antibióticos.

De todos los productos de origen biológico producidos a escala industrial, los antibióticos son probablemente los más importantes desde el punto de vista sanitario. Los antibióticos son compuestos orgánicos de bajo peso molecular producidos por ciertos microorganismos para eliminar o inhibir el crecimiento de otros microorganismos. El hábitat natural de la mayoría de los microorganismos productores de antibióticos es el suelo. Entre los productores más importantes figuran hongos filamentosos (*Aspergillus*, *Penicillium* y *Cephalosporium*), bacterias Gram (+) formadoras de endosporas (*Bacillus*), bacterias filamentosas (*Streptomyces*), animales como los sapos productores de margininas, insectos productores de defensinas y algunas plantas. Desde el punto de vista metabólico, son productos del metabolismo secundario (Evangelista, 2007).

## Metabolitos secundarios.

Existen dos tipos básicos de metabolitos microbianos: primarios y secundarios. Un metabolito primario es el que se forma durante la fase exponencial de crecimiento y que es fundamental para el crecimiento y mantenimiento en esta fase, mientras que un metabolito secundario es difícil de definir en palabras concretas pero podemos definirlo como las moléculas que se forman casi al final de la fase exponencial de crecimiento, con frecuencia muy cerca de o ya en la fase estacionaria de crecimiento. Las características más importantes de los metabolitos secundarios (Madigan, 2006):

1. No son esenciales para el crecimiento y la reproducción.
2. Su formación depende fundamentalmente de las condiciones de cultivo, sobre todo de la composición del medio.
3. A menudo se producen como un grupo de estructuras relacionadas.
4. Se puede incrementar su producción.

De esta forma, los metabolitos secundarios producidos por bacterias son moléculas generalmente más pequeños que el tamaño promedio de las macromoléculas biológicas; son producidas por un número limitado de cepas, que al parecer no tienen una función determinada en el crecimiento celular. De hecho, las cepas productoras de éstos, que por alguna mutación han perdido su capacidad de producirla, presentan crecimiento y características normales (Evangelista, 2007).

Un aspecto metabólico importante de las plantas y los hongos es la capacidad de producir sustancias que no son esenciales para su supervivencia, como son los metabolitos secundarios. Existen gran cantidad de tipos de metabolitos secundarios en plantas y se pueden clasificar según la presencia o ausencia de nitrógeno en su composición, no obstante, los tres grupos de metabolitos secundarios más importantes en plantas son los terpenoides (o isoprenoides), fenilpropanoides (o compuestos fenólicos) y los alcaloides (este último grupo lleva nitrógeno en su estructura).

Antibióticos naturales son, dentro del grupo de los compuestos fenólicos, algunos isoflavonoides de leguminosas; de los terpenos están los sesquiterpenos tales como el capsidiol, sintetizado por la planta de tabaco. Mientras que son pocos los alcaloides que puedan actuar como antibióticos, como ejemplo está el del benzofenantridina alcaloide escoulerina. Las plantas también utilizan los metabolitos secundarios como agentes de señalización durante la interacción con patógenos. Tras la infección con un patógeno, algunas especies vegetales, tales como el tabaco, trigo, pepino y arroz, desarrollan una resistencia hacia otros patógenos (Bourgaud, 2001).

Los metabolitos secundarios vegetales también pueden actuar como valiosos anticancerígenos. La vincristina y la vinblastina son indol alcaloides sintetizados por la vincapervinca *Catharanthus roseus* de Madagascar y es utilizada para tratar la enfermedad de Hodgkin y la leucemia. Otro importante anticancerígeno de reciente descubrimiento es el terpenoide taxol, producido por el Tejo del Pacífico. Algunos metabolitos secundarios tales como los flavonoides y otros compuestos fenólicos, actúan como antioxidantes, capturando especies reactivas de oxígeno previniendo así de la oxidación celular. Otros, tales como los glucosinolatos, parecen ser tóxicos selectivamente sólo para las células pre-cancerosas reduciendo el riesgo de formación de carcinomas (Rao y Ravishankar, 2002).

En contraste a los metabolitos secundarios producidos por las plantas, cuyo uso contra enfermedades tiene sus raíces en la medicina tradicional, los compuestos de importancia farmacéutica obtenidos de microorganismos son el resultado de intensas investigaciones de la naturaleza como fuente de compuestos bioactivos llevados a cabo por un gran número de laboratorios en todo el mundo. La identificación y caracterización biológica y molecular de microorganismos, útiles como agentes de biocontrol, productores de compuestos bioactivos o sustitutos de antibióticos, ha sido de gran interés para la medicina y la agricultura moderna. En este contexto se han evaluado microorganismos, se han aislado y caracterizado química y biológicamente sus metabolitos secundarios, y se ha estudiado el papel que estos juegan en el control de enfermedades y en las respuestas de defensa (Evangalista, 2007).

La propiedad que hace que los antibióticos sean considerados como “fármacos maravillosos”, es la selectividad de su mecanismo de acción, que los distingue de germicidas y desinfectantes sintéticos. Su toxicidad selectiva contra algunas clases de organismos, con pocas excepciones, los ha convertido en los compuestos más utilizados para la terapia contra microorganismos patógenos. A continuación se muestran algunos de los antibióticos producidos comercialmente (Tabla 3).

Tabla 3: Antibióticos producidos comercialmente (Madigan, 2006).

Antibiótico	Microorganismo productor	Tipo de microorganismo
Bacitracina (Sáenz, 2005)	<i>Bacillus licheniformis</i>	Bacteria formadora de endosporas
Cefalosporina (Lizarbe, 2009)	<i>Cephalosporium sp.</i>	Hongo
Cefamicina (De la Fuente y col., 2002)	<i>Streptomyces clavuligerus</i>	Actinomiceto
Cloranfenicol (Morales, 2007)	<i>Streptomyces venezuelae</i>	Actinomiceto
Cicloheximida (Kominck, 1975)	<i>Streptomyces griseus</i>	Actinomiceto
Eritromicina (Gómez, 2007)	<i>Streptomyces erytreus</i>	Actinomiceto
Estreptomina (Schneider y col., 2011)	<i>Streptomyces griseus</i>	Actinomiceto
Gentamicina (Oliveira, 2006)	<i>Micromonospora equinospora</i>	Actinomiceto
Griseofulvina (Edward, 1938)	<i>Penicillium griseofulvin</i>	Hongo
Kanamicina (Yanai y col., 2006)	<i>Streptomyces Kanamyceticus</i>	Actinomiceto
Lincomicina (Du y col., 2012)	<i>Streptomyces Lincolnesis</i>	Actinomiceto
Neomicina (Dulmage, 1953)	<i>Streptomyces fradiae</i>	Actinomiceto
Nistatina (Jonsbu y col., 2000)	<i>Streptomyces noursei</i>	Actinomiceto
Penicilina (Sanjurjo, 1997)	<i>Penicillium chrysogenum</i>	Hongo
Polimixina B (Ruf y col., 2013)	<i>Bacillus polymyxa</i>	Bacteria formadora de endosporas
Rifamicina (Verma y col., 2011)	<i>Amycolatopsis mediterranei</i>	Actinomiceto
Tetraciclina (Rodríguez y 1998)	<i>Streptomyces rimosus</i>	Actinomiceto

## Importancia de encontrar nuevos antibióticos que replacen los existentes.

Los actinomicetos, son ampliamente reconocidos por la capacidad que tienen de producir una gama variada de metabolitos secundarios, que son relevantes por su uso como fármacos (Baltz y Hosted, 1996).

### Actinomicetos

Los actinomicetos son un grupo de microorganismos filamentosos, con un crecimiento en forma de red llamado *micelio* (fig 2). La mayoría de los actinomicetos forman esporas y la manera en que éstas se forman y se agrupan, se usa en la separación de los subgrupos (Madigan, 2006).

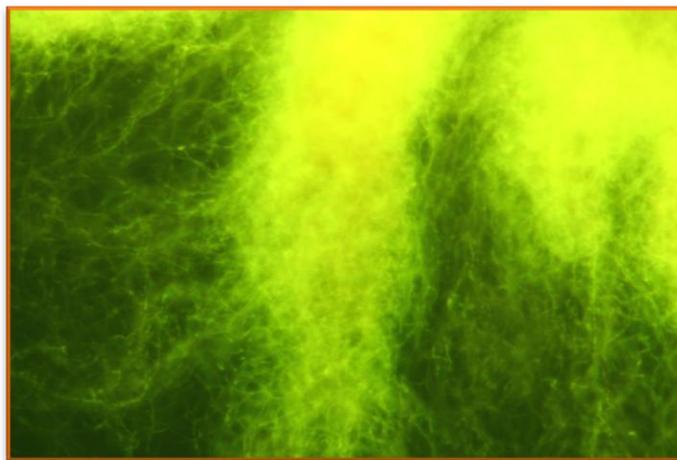


Figura 2: imagen tomada en microscopio Olympus de fluorescencia con objetivo 100X de *Streptomyces coelicolor* A3. Forma un abundante micelio aéreo, filamentos ramificados, crecidos en medio Phage.

Tabla 4: Actinomicetos y géneros relacionados (Madigan, 2006).

Grupo I : aerobios facultativos; sin micelio, bacilos.

- *Actinomyces*
- *Arachnia*

Grupo II: filamentos transitorios.

- *Mycobacterium*

Grupo III: fijadores de nitrógeno simbiotes de plantas.

- *Frankia*

Grupo IV: se produce verdadero micelio, esporulado con esporas dentro de esporangios.

- *Actinoplanes*
- *Streptosporangium*

Grupo V: los filamentos miceliales se dividen transversalmente en dos planos, ocasionalmente responsable de infecciones epidérmicas

- *Dermatophilus*

Grupo VI: contenido lipídico de pared celular muy alto.

- *Nocardia*

Grupo VII: micelio permanece intacto , abundante micelio aéreo y cadenas largas de esporas.

- *Streptomyces*

Grupo VIII: micelio intacto, esporas únicas, pares o cadenas muy cortas, algunas termofílicas

- *Micromonospora*
- *Thermobispora*

Entre las características más importantes de las bacterias que pertenecen al *Streptomyces*, se encuentran, que son microorganismos que tienen como hábitat principal el suelo, presentan dos atributos inusuales, uno de ellos es su complejo ciclo de vida, y el otro es su habilidad de producir un gran número de metabolitos secundarios.

Desde un punto de vista biotecnológico el género *Streptomyces*, posee un interés muy particular, debido a que alrededor de dos tercios de los antibióticos producidos industrialmente son sintetizados por miembros de este género.

La diversidad funcional de los compuestos sintetizados es amplia ya que se pueden encontrar con actividad antibacterial, inmunosupresores, anticancerígenos, antihelmínticos, herbicidas, fungicidas entre otros (Hopwood, 2003).

### *Streptomyces*

La palabra *Streptomyces* fue propuesta por Waksman y colaboradores en el año 1943. El género *Streptomyces* pertenece a la familia *Streptomycetaceae* y al orden de los Actinomicetales. Engloba bacterias filamentosas, miceliarias, Gram-positivas, aerobias, capaces de utilizar un gran número de compuestos orgánicos como fuente de carbono y energía y con un elevado contenido en guaninas y citocinas (74% G + C) en su genoma (Woese, 1987). Están ampliamente distribuidos en la naturaleza, siendo el suelo su hábitat más común, aunque también se han hallado en lechos marinos (Zhong y col., 2002). Estas bacterias son capaces de colonizar la rizosfera y tejidos vegetales (Castillo y col., 2002; Tokala y col., 2002), donde aprovechando su producción de antibióticos, podría establecer relaciones simbióticas con la planta.

La importancia de estos organismos radica en su capacidad de producir una gran diversidad de metabolitos secundarios entre los que se encuentran desde análogos de metabolitos primarios (aminoácidos, nucleótidos o polipéptidos) hasta antibióticos. De igual manera se caracterizan por ser productores de una gran cantidad de enzimas de interés en el sector industrial, entre las que destacan: proteasas, celulasas, nucleasas, amilasas, lipasas, quitinasas y xilanasas (Madigan, 2006).

*Streptomyces coelicolor* es una bacteria representativa del género. Es muy útil como modelo de estudio de la biosíntesis de metabolitos secundarios; por una parte esporula bien, es relativamente fácil de transformar y hay una gran cantidad de herramientas genéticas desarrolladas para su manipulación. Su genoma ha sido secuenciado (Bentley y col., 2002) y produce cuatro tipos de antibióticos: actinorrodina (codificada en el *act cluster*); undecilprodigiosina (*red cluster*); metilénomicina (*mmr cluster*) y antibiótico dependiente de calcio (CDA, del inglés “*cluster dependent antibiotic*”; codificado por el *cda cluster*).

Es interesante destacar que en 40 años de experimentos de genética molecular clásica solo se descubrieron esos cuatro *clusters* de biosíntesis y desde que se ha publicado el genoma, simples búsquedas de homología con policétido sintetasas y péptido sintetasas, han revelado otros 18 metabolitos secundarios (poliquétidos, terpenos, esteroides, butirolactonas) (Thompson y col., 2002).

### Características genéticas del género *Streptomyces*.

Una propiedad del ADN genómico de *Streptomyces* es el alto porcentaje de G+C (guaninas y citocinas), esta característica es de gran importancia para la identificación de genes ya que hace inevitable que los codones ricos en GC, tengan mayor posibilidad de ser usados, se ha observado que en 9 de cada 10 codones la tercera posición es una G o una C (Mariano, 2009).

La distribución de los genes en el genoma no es aleatoria, se ha visto que los genes que resultan esenciales, se encuentran en el centro del cromosoma, mientras que los genes codificantes para funciones tales como la síntesis de metabolitos secundarios o enzimas hidrolíticas, se localizan en los brazos del cromosoma. Se cree que con esta organización génica se evita la pérdida de genes esenciales a causa de deleciones que puedan ocurrir en los extremos de los brazos (Hopwood, 2003). Los elementos extracromosomales son frecuentes en *Streptomyces*. Se han encontrado plásmidos circulares y lineales con proteínas asociadas a sus extremos (Kinashi y Shimaji, 1987), así como plásmidos capaces de integrarse en sitios específicos del cromosoma de *Streptomyces* (Combes y col., 2002). También se ha descrito la existencia de fagos y elementos genéticos transponibles. (Lomovskaya y col., 1980).

La secuenciación de genomas completos de organismos como *S. coelicolor*, *S. avermitilis* y *S. griseus*, ha permitido tener un conocimiento más amplio sobre las características genéticas del género *Streptomyces*. En la tabla 5 se presenta una relación comparativa entre los diferentes genomas secuenciados del género (Bentley y col., 2002; Ohnishi y col., 2008).

Tabla 5: características de genomas secuenciados de *Streptomyces* (Martínez, 2007).

Especie	Cromosoma	Longitud (pb)	Contenido de G+C (%)	ORFs (marcos abiertos de lectura)	Genes del metabolismo secundario
<i>S. coelicolor</i>	Lineal	8,667,507	72.1	7,825	20 grupos
<i>S. avermitilis</i>	Lineal	9,025,608	70.7	7,574	30 grupos
<i>S. griceus</i>	Lineal	8,545,929	72.2	7,138	34 grupos

### Streptomyces y sus metabolitos secundarios

Como ya se mencionó, la principal característica del género *Streptomyces*, junto con la diferenciación morfológica, es la producción de una gran variedad de metabolitos secundarios con diferentes actividades biológicas: antibacteriana (Tabla 6), antiviral, antitumoral, antifúngica, herbicida, antihelmíntica e incluso inmunosupresora (Tabla 7) (Demain, 1999).

Tabla 6: Ejemplos de algunos antibióticos producidos por el género *Streptomyces* (Ribelles, 2008).

Antibiótico	Organismo productor	Diana
Cloranfenicol	<i>S. venezuelae</i>	Ribosoma bacteriano
Ácido clavulánico	<i>S. clavuligerus</i>	Inhibidor $\beta$ -lactamasa
Fosfomicina	<i>S. wedmorensis</i>	Pared celular bacteriana
Novomicina	<i>S. niveus</i>	Girasa bacteriana

Tabla 7: Productos naturales del género *Streptomyces* con otras aplicaciones distintas a la de antibióticos (Ribelles, 2008).

Producto	Organismo productor	Diana	Aplicación
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Mitomicina</li> <li>• Anfotericina</li> <li>• Avermectina</li> <li>• Rapamicina</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>S. caespitosus</i></li> <li>• <i>S. nataensis</i></li> <li>• <i>S. avermitilis</i></li> <li>• <i>S. hygroscopicus</i></li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Replicación del DNA</li> <li>• Esteroles de membrana</li> <li>• Neurotrans. invertebrados</li> <li>• Linfocitos</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Anticancerígeno</li> <li>• Antifúngico</li> <li>• Antiparasítico</li> <li>• Inmunosupresor</li> </ul>

Los genes cuyos productos intervienen en su biosíntesis están físicamente agrupados en *clusters*. El tamaño de estos suele ser variable, extendiéndose desde 15 Kb hasta 100 Kb, y los genes implicados en resistencia, transporte y regulación también suelen incluirse en dichas agrupaciones génicas (Ribelles, 2008).

### *Streptomyces paucisporogenes*

El número de estos microorganismos se ha incrementado hasta alcanzar aproximadamente 1900 especies identificadas en la actualidad según el buscador NCBI (National Center for Biotechnology Information). De las cuales son responsables de al menos 10 000 moléculas bioactivas de interés industrial o académico (Anderson, 2001).

Una de las especies reportadas es *Streptomyces paucisporogenes*, de la cual se han descrito al menos 2 compuestos de interés, tran glutaminasa (Nagy y Szakacs, 2008), antifongina (Hagemann, 1962) que presenta actividad en contra de algunos hongos y levaduras.

La clasificación taxonómica de *Streptomyces paucisporogenes* es:

*Bacteria; Actinobacteria; Actinobacteria; Actinobacteridae; Actinomycetales; Streptomyceinae; Streptomycetaceae, Streptomyces paucisporogenes*

## JUSTIFICACIÓN

Los actinomicetos son importantes en la producción de medicamentos y antibióticos con aproximadamente el 55% proveniente de *Streptomyces* y el 11% de *Actinomyces*, fuera de este grupo el 12% para bacterias no filamentosas y 22% proveniente de hongos filamentosos (Marinelli, 2009). El número de compuestos reportados producidos por las especies de este género se vio incrementado casi de manera exponencial desde el descubrimiento de la estreptomina en 1942 hasta tener un máximo en los años 70's con un substancial decaimiento en la década de los 80's y 90's (Milind, 2001). En los próximos años seguirán encontrándose nuevos antibióticos provenientes del género de *Streptomyces* que suplan a los ya utilizados en el mercado, sin que presenten las desventajas propias del mismo.

Las desventajas encontradas en los tratamientos terapéuticos son derivadas del uso excesivo o incorrecto de los antibióticos, que genera el desarrollo de nuevas cepas resistentes, provocando un problema público de salud debido a la capacidad de las bacterias de mutar, transferir genes entre ellas, sin importar si estas son patógenas o no patógenas propiciando una selección de cepas que contengan en su genoma este tipo de información de resistencia a antimicrobianos (Milind, 2001).

Por otro lado, muchos cultivos de plantas alimenticias y ornamentales son susceptibles a enfermedades causadas por bacterias. Las enfermedades bacterianas en las plantas son muy difíciles de controlar y con frecuencia resultan en repentinas y devastadoras pérdidas financieras para los agricultores. La diversidad y cantidad de antibióticos usados para el control de enfermedades en plantas son menores, en comparación con el uso médico y veterinario, pero se han desarrollado agentes patógenos de plantas resistentes a los antibióticos. (Mcmanus, 1999).

Tabla 8: Antibióticos agrícolas comúnmente usados (Modificado de Mcmanus, 1999).

<b>Antibiótico</b>	<b>Microorganismo productor</b>	<b>Nombre comercial</b>	<b>Uso</b>
<b>Estreptomicina</b>	<i>Streptomyces griseus</i>	Agrimycin 17 Agri-strep	Control de bacteriosis foliares de manzana, pera, chile, tomate y apio.
<b>Cicloheximida</b>	<i>Streptomyces griseus</i>	Acti-dione Acti-spray	Aplicada al suelo y ser absorbida por raíces.
<b>Terramicina</b>	<i>Streptomyces rimosus</i>	Agrymycin	Enfermedades causadas por micoplasmas en durazno, manzana, nectarina.

Este trabajo se desarrolló con el fin de encontrar nuevas moléculas que presenten actividad antimicrobiana, que a su vez sean producidas por algún microorganismo proveniente de *Streptomyces*, o bien que sean antibióticos conocidos pero a partir de microorganismos no reportados con esta capacidad. Lo que nos permitirá encontrar ya sea nuevos compuestos que puedan ser utilizados en agronomía o medicina para combatir enfermedades que presentan cepas mutadas con resistencia a antibióticos conocidos, o bien nuevos microorganismos productores (Milind, 2001).

## OBJETIVOS

Objetivo general:

- Identificar una sustancia con actividad antimicrobiana proveniente de una colección de actinomicetos aislados de diferentes muestras de suelo

Objetivos particulares:

- Determinar, mediante bioensayos con fitopatógenos, la actividad antimicrobiana de los diferentes actinomicetos de la colección a evaluar.
- Identificar a los fitopatógenos sensibles al metabolito antimicrobiano encontrado.
- Seleccionar el actinomiceto productor.
- Probar diferentes medios conocidos para favorecer la producción del metabolito de interés.
- Obtener el metabolito de interés por extracción líquido-líquido.
- Separar por cromatografía en capa fina los diferentes compuestos obtenidos en el extracto.
- Identificar la fracción que contiene el principio activo.
- Determinar el peso molecular del antibiótico mediante cromatografía de alta resolución acoplado a masas.
- Elucidar la estructura química por resonancia magnética nuclear.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Los microorganismos usados en este trabajo se mencionan en la siguiente tabla, así como los medios de cultivo utilizados.

Tabla 9: Microorganismos utilizados

Cepa	Fermentación líquida	Fermentación sólida	Conservación -20°C
<i>B. subtilis</i> <i>P. aurofaciens</i> <i>P. florescens</i> <i>Ralstonia</i> <i>P. syringae</i> <i>Xanthomonas</i>	Medio LB	LB Agar	Glicerol 40% y medio LB
<i>Streptomyces badius</i> <i>Streptomyces platensis</i> <i>Streptomyces paucisporogenes</i> <i>Streptomyces spectabilis</i>  <i>Streptomyces lividans TK 24</i>  <i>Streptomyces violaceusniger</i> <i>S. flavor</i> <i>Streptomyces flavoviridis</i> <i>Streptomyces gedanensis</i>	Medio MS (mannitol soya flour medium), medio AN (actinorodina), medio Phage, medio UP.	Medio MS agar	Suspensión esporas glicerol 40% Tween 1%, suspensión micelio. Glicerol 40%.

Las cepas de *Streptomyces* fueron usadas de colección de aislados de suelos de diferentes orígenes. Mientras que las bacterias usadas como testigo, fueron cepas fitopatógenas silvestres aisladas de campos de cultivo del estado de Chihuahua.

## Crecimiento y conservación

Las cepas silvestres de fitopatógenos se crecieron a 30°C en medio sólido y se conservaron como suspensiones celulares en glicerol 20% concentración final a una temperatura de -20°C. Las cepas utilizadas con mayor frecuencia también se conservaron mediante resiembra periódica en placas de LB agar. Las placas se mantuvieron selladas con papel Parafilm a 4°C.

Las cepas de *Streptomyces* se crecieron en medio MS agar, y medios tanto de crecimiento (MS y Phage  $\phi$ ) como de producción (AN y UP) a la temperatura de 30°C, a una agitación de 150 rpm para los medios líquidos. En matraces Erlen-Mayer de vidrio (500 ml con 50 ml de medio).

Las cepas de *Streptomyces* se conservaron como suspensiones de esporas y/o células de micelio en glicerol 40% a temperatura de -20°C.

## Medios de cultivo

Tabla 10: medios de cultivo utilizados para el crecimiento de *Streptomyces* y otras bacterias fueron tomados de Keise *et al*, (2000):

### Medio Phage ( $\phi$ ):

- 0.5 g/L sulfato de magnesio heptahidratado. J.T. Baker.
- 0.74 g/L cloruro de calcio dihidratado. J.T. Baker.
- 10 g/L glucosa. J.T. Baker.
- 5 g/L bacto triptona. BD Difco.
- 5 g/L extracto de levadura. BD Bioxon.
- 5 g/L lab. Lemco powder

### Medio MS:

- 10 g/L Harina de soya. Nutricasa
- 20 g/L manitol. J.T. Baker.

### Medio MS agar:

- 10 g/L Harina de soya. Nutricasa
- 20 g/L manitol. J.T. Baker.
- 20 g/L Bacto Agar. BD Difco.

### Medio Undecilprodigiosina (UP):

- 5 g/L bacto peptona. BD Difco.
- 1% glicerol. J.T. Baker.

### Medio Actinorrodina (AN):

- 1 g/L extracto de carne. BD Bioxon.
- 2 g/L extracto levadura. BD Bioxon.
- 5 g/L bacto peptona. BD Difco.
- 5 g/L cloruro de sodio. J.T. Baker.

### Medio LB:

- 10 g/L bacto peptona. BD Difco.
- 5 g/L extracto de levadura. BD Bioxon.
- 5 g/L cloruro de sodio. J.T. Baker.
- Ajustar pH a 7.2.

### Medio LB agar:

- 10 g/L bacto peptona. BD Difco.
- 5 g/L extracto de levadura. BD Bioxon.
- 5 g/L cloruro de sodio. J.T. Baker.
- Ajustar pH a 7.2.

## Bioensayos para determinar actividad antimicrobiana.

Se trabajo con un cepario de colección de muestras que se obtuvieron en suelo, y que fueron clasificadas taxonómicamente para la realización de este trabajo. Las cuales, se sembraron en placa Petri.

Posteriormente mediante bioensayos que nos permitieran definir a las especies con actividad antimicrobiana, se pusieron dichas especies en contacto con diferentes bacterias fitopatógenas recolectadas en campos de cultivo del estado de Chihuahua.

#### “Bioensayo de cobertera” para *Streptomyces* en medio MS agar en placa.

Las especies de *Streptomyces* que presentaron actividad antimicrobiana, se hicieron crecer en medio MS agar en un área no mayor a 3 cm de diámetro en el centro de la caja Petri, hasta presentar morfología de esporas y se encontraban en una etapa de envejecimiento considerable para garantizar la producción de metabolitos secundarios. Aproximadamente 10 días a 30°C.

Transcurrido este tiempo, se prepara una mezcla de agar LB suave (50% agua con 50 % de agar LB) que se deja enfriar hasta 40 °C para inocular con microorganismos indicadores suficientes (*Xanthomonas sp.* o *B. subtilis*) para tener 30 a 300 colonias por placa de Petri. Esta suspensión se agrega sobre las cajas y se incuba a 30 °C por 48 horas. Los resultados se muestran en la tabla 10 y figura 3.

#### “Bioensayo de inmersión de fitopatógenos en agar LB suave para monitorear actividad inhibidora de crecimiento”

Con la finalidad de monitorear la producción del metabolito secundario con actividad inhibidora se realizaron bioensayos que permitan ver la inhibición de crecimiento del microorganismo indicador (*Xanthomonas sp.* y *B. subtilis*) sin la presencia de *Streptomyces* (sin micelio) en cinética de producción 24 hr a 144 hr.

Las condiciones de bioensayo en LB suave fueron: 50% del extracto de fermentación sin micelio, con 50% de LB agar inoculado con una concentración final de UFC de 30-300 colonias por placa Petri que se almacenaron a 30 °C por 48 horas, para observar actividad antimicrobiana.

---

### “Bioensayo de inmersión de fitopatógenos” en agar LB suave para probar fracciones provenientes de las extracciones líquido-líquido.

La muestra previamente purificada obtenida de la extracción líquido-líquido se deseco a temperatura ambiente en campana de extracción hasta eliminar residuos de solventes orgánicos (dicloro metano o acetato de etilo) dicha muestra se rehidrató y esterilizó por filtración en membrana de 0.45 $\mu$ m hasta tener un volumen de 10 mL suficiente para mantener la relación 1:1 en placa Petri (muestra: agar LBsuave ). Con concentración de UFC de microorganismo indicadores (*Xanthomonas sp.* y *B. subtilis*) final de 30-300 por caja Petri.

### “Bioensayo de extensión en superficie”

Se sembró en agar LB suave (50% LB agar con 50% agua) suspensión de bacterias suficiente para cubrir por césped; es decir, que la cantidad de UFC no pueda ser determinado debido a la cercanía de las colonias.

Este tipo de bioensayo se utilizó para poner en contacto discos de papel filtro whatman # 5 (sensidiscos) con el extracto obtenido, para monitorear el principio activo purificado. A su vez se usó este bioensayo para técnica de autobiogramas, donde se coloca en contacto la placa de cromatografía en capa fina con la superficie y así observar halos de inhibición.

### **Extracción de principio activo por precipitación por pH y extracción líquido-liquido por solventes orgánicos.**

Antes de extraer el principio activo se requiere retirar la biomasa que surgió de la fermentación de los medios de producción (AN y/o UP).El primer paso de eliminación es por centrifugación a 10,000 g por 30 minutos a temperatura ambiente para garantizar la eliminación de restos celulares del medio.

Precipitación con ácido clorhídrico concentrado para tener la solución a pH fijo de 1, 2, 3, 4, 5 y 6. Hidróxido de sodio para llevar la solución a pH fijo de 7, 8, 9, 10, 11 y 12.

### “Extracción del principio activo con solventes orgánicos grado reactivo”

En esta etapa se usaron 2 volúmenes de trabajo por uno de muestra en embudos de separación operando a 80% de su capacidad máxima, los solventes utilizados los siguientes: Acetato de etilo, dicloro metano, cloroformo, tolueno, hexano y benceno.

De la extracción se conservaron ambas fases (orgánica y acuosa) para experimentos posteriores de actividad por bioensayo, e identificar fracción que mantiene el principio activo.

### **Separación de principio activo por cromatografía en capa fina**

Todas las cromatoplacas se corrieron en silicagel 60 con factor  $UV_{254}$  usando mezclas dicloro metano – acetona 6:4, para separar la mezcla del extracto crudo. Siendo revelados por luz UV a 254 y 363 nm y/o sulfato sérico.

### **Espectroscopia de infrarrojo cercano**

Se trabajó en un espectro Perkin Elmer FTIR 14000 y se analizaron muestras líquidas para determinar el infrarrojo cercano de 650 a 4000 nm, con gentamicina comercial diluida en agua calidad HPLC a concentración de 2 mg/ml y muestra purificada proveniente de fermentación con concentración final de 2mg/ml.

## Cromatografía de líquidos de alta resolución.

Las muestras se analizaron en columna Eclipse plus C18 Fase móvil MeOH/agua 55/45 flujo 0.2 mL/min analizando los siguientes parámetros.

Ion source type	ESI	Ion polarity	Positive	Alternating ion polarity	Off
Mass Range Mode	Std /normal	Scan begin	%0m/z	Scan end	1000 m/z
Capilarity exit	128.5 volts	Skim 1	40 volts	Trap drive	65.3
Accumulation time	20951 $\mu$ s	Averages	10 Spectra	Auto MS/MS	off

## RESULTADOS

### Bioensayos:

#### Bioensayo para determinar actividad antimicrobiana.

Se probaron 9 diferentes especies del género *Streptomyces* en medio sólido MS, con bioensayo por cobertera con agar LB suave con 6 fitopatógenos: *Pseudomonas aureofaciens*, *Pseudomonas fluorescens*, *Ralstonia sp.*, *Pseudomonas. syringae*, *Xanthomonas sp.* Y un no fitopatógenos *B. subtilis*. Identificando cuál de ellos presentaba sensibilidad a los productos excretados por los actinomicetos.

Los datos del bioensayo después del crecimiento por 10 días de los *Streptomyces* en medio MS se muestran en la siguiente tabla.

Tabla 11: Muestra resultados de bioensayo de cobertera para *Streptomyces* en medio MS agar en placa donde si = inhibición de crecimiento. No = sin actividad. Parcial = inhibición de crecimiento parcial.

cepa	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>P. aureofaciens</i>	<i>P. fluorescens</i>	<i>Ralstonia sp.</i>	<i>P. syringae</i>	<i>Xanthomonas sp.</i>
<i>S. badius</i>	No	no	no	no	no	no
<i>S. platensis</i>	si	parcial	no	no	parcial	si
<i>S. paucisporogenes</i>	si	no	parcial	no	parcial	si
<i>S. spectabilis</i>	si	si	parcial	no	parcial	si
<i>S. lividans tk 24</i>	no	no	no	no	no	no
<i>S. violaciuniger</i>	no	no	no	no	no	no
<i>S. flavo</i>	no	no	no	no	no	no
<i>S. flavoviridis</i>	no	no	no	no	no	no
<i>S. gedanensis</i>	no	no	no	no	no	no

Las placas que mostraron inhibición de crecimiento parcial o total se tomaron como muestras de análisis y se pusieron en crecimiento en medio líquido, utilizando 3 medios conocidos para la obtención actinorodina, undecilprodigiosina (ya que estos 2 medios

favorecen la formación de metabolitos secundarios) y un medio para esporular actinomicetos (MS agar, descrito anteriormente), tomando una muestra de dichos medios cada 24 horas en un periodo de 144 horas para identificar en que momento se presentó la mayor actividad inhibidora de crecimiento. Cada punto analizado se congeló a  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$  para conservar el principio activo, el cual mostró su actividad al ser analizado por bioensayo de inmersión de fitopatógenos en agar LB suave (descrito anteriormente) con extracto de la fermentación libre de micelio, en una proporción 1:1 (extracto:agar).

Para eliminar el micelio producido en la fermentación, fue necesario centrifugarlo con una fuerza relativa de 10,000 g hasta 35,000 g para eliminar todo residuo celular (el caldo de cultivo al ser decantado arrastra parte del micelio ya que se disgrega con facilidad, debido a esto y tratando de obtener la mayor cantidad de caldo de fermentación la muestra que presentaba este problema se centrifugó hasta en 3 ocasiones para formar *pellets* más consistentes). Para posteriormente realizar bioensayos con los productos solubles excretados al medio durante la fermentación.

Para realizar el bioensayo con el extracto sin restos celulares se tomó solo un fitopatógeno que fuera representativo en la inhibición de crecimiento de los diferentes fitopatógenos, siendo *Xanthomonas sp.* la cepa seleccionada para dicho ensayo, sin embargo los resultados fueron corroborados con una cepa no patógena que tenía los mismos resultados *B. subtilis*, esto con la finalidad de tener otro microorganismo indicador de más fácil manipulación para las pruebas posteriores.

Se inocularon las diferentes especies de *Streptomyces*; es decir que, en una placa que contenía medio MS se formó un círculo con el inóculo y se dejó crecer para tener esporas y/o micelio aéreo bien formado garantizando además la producción de metabolitos secundarios.

Teniendo este crecimiento, se realizaron bioensayos de cobertera con fitopatógenos inmersos en el agar LB suave, suficientes UFC para tener césped de crecimiento. Las fotografías correspondientes a los resultados se muestran en la fig 3.

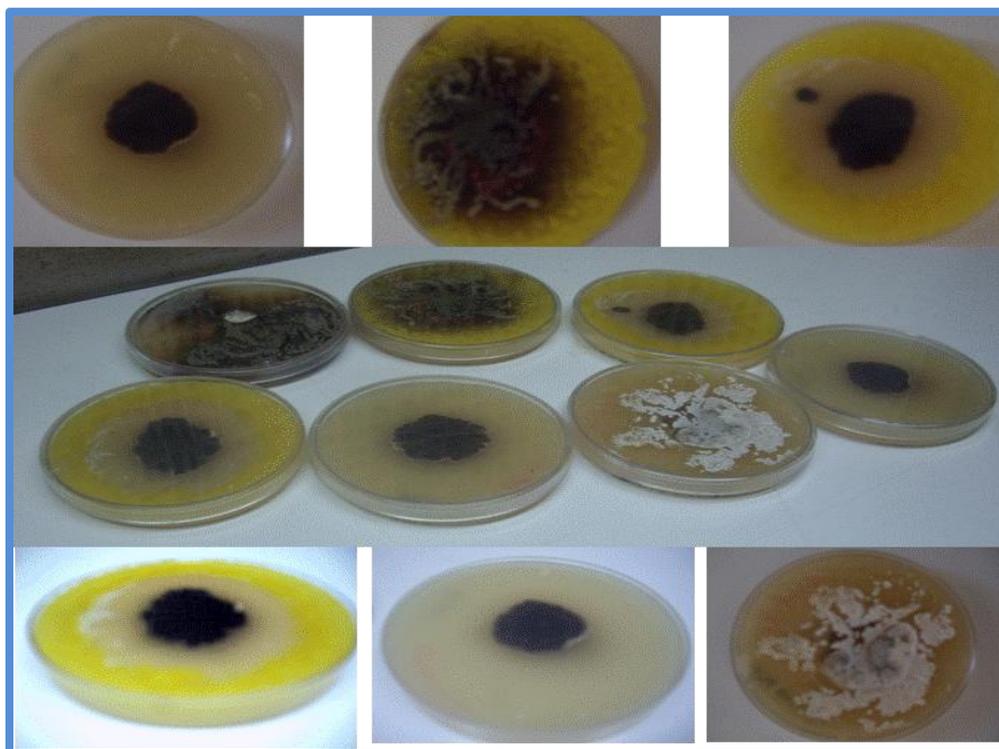
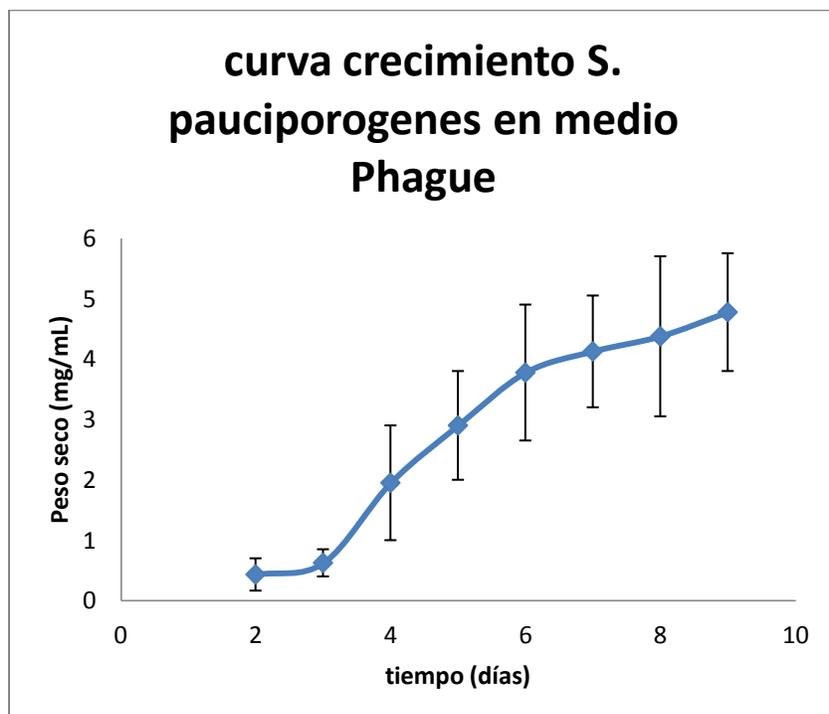


Figura 3: Muestra la forma en que se inoculó *Streptomyces* en medio MS agar en presencia de algunos microorganismos indicadores en agar LB suave en bioensayo por cobertera. *Streptomyces* de color oscuro en el centro de la placa y el crecimiento de colores que se encuentra en la periferia pertenece a los diferentes indicadores usados amarillo *Xanthomonas* sp y blanco con *B. subtilis*.

Conociendo que existe diferencia en la actividad inhibidora de crecimiento, se sugirió que era posible mejorar la producción del metabolito con un medio de producción optimizado. Según Keiser et al existen 2 medios conocidos que favorecen la producción de los antibióticos coloreados de actinomicetos, siendo estos: la Actinorodina y la Undecilprodigiosina. Estos pigmentos están asociados a rutas diferentes de producción de metabolitos secundarios, por lo que se buscaron medios que fueran utilizados en dicha producción.

Los medios encontrados en la literatura se conocen como AN (ActiNorodina) y Undecil Prodigiosina (UP) (Hoopwood, 1985).

Sin embargo, este proceso de producción requiere ser inoculado con un 10% de preinoculo del actinomiceto proveniente de un medio de crecimiento y estar en la fase logarítmica tardía, para así garantizar un máximo de actividad y de crecimiento celular. Este preinoculo fue crecido en medio Phage ( $\phi$ ) y el comportamiento del crecimiento se muestra en la gráfica 1.



Gráfica 1: Muestra el comportamiento de crecimiento de *Streptomyces paucisporogenes* en medio líquido Phage ( $\phi$ ). A 30°C y 150 RPM.

Sabiendo que el preinoculo en medio phage ( $\phi$ ) tiene un periodo para llegar a la fase exponencial tardía de 6 días, posterior a ese periodo se inocularon los diferentes medios (MS, AN y UP) para poder comparar la inhibición de crecimiento de *Xanthomonas sp.*

El bioensayo se diseñó de la siguiente manera para poder identificar la presencia de la actividad inhibidora de crecimiento; debido a que desconocemos la concentración necesaria para inhibir el crecimiento del metabolito. Se decidió tomar una muestra de 10 mL de medio líquido sin restos celulares y 10 ml de medio LB al 2% de agar.

Mezclarlos en presencia de *Xanthomonas sp.* (En cantidad necesaria para formar un césped). Las imágenes se muestran a continuación (fig 4).

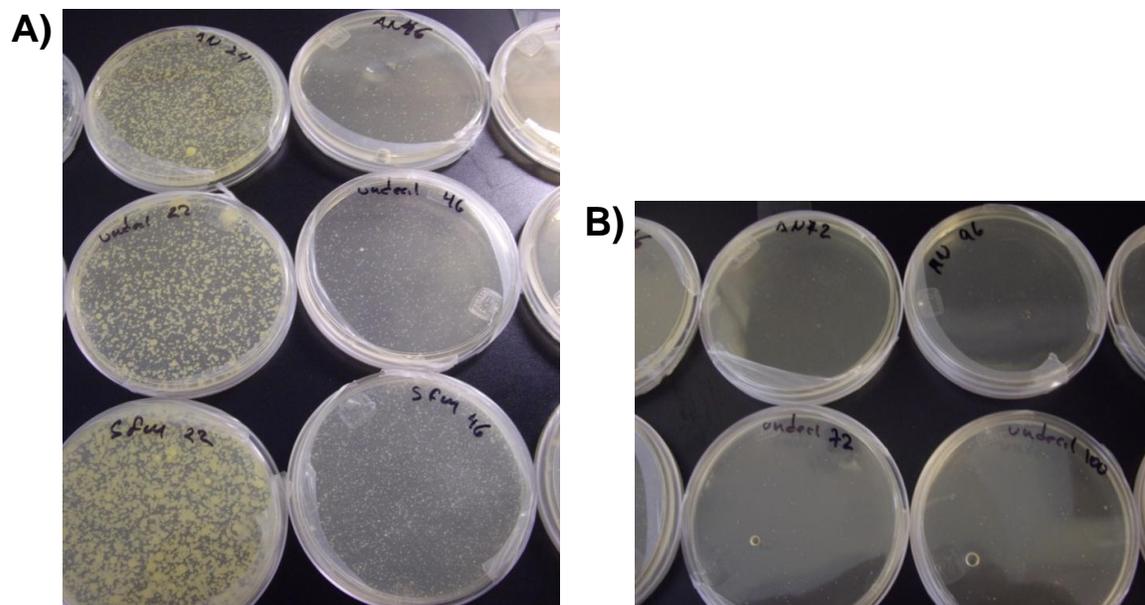


Figura 4: **A)** Cajas Petri obtenidas de bioensayo de inmersión de fitopatógenos en agar LB suave para monitorear actividad inhibitora de crecimiento de inmersión donde se muestra los diferentes medios probados arriba medio AN, abajo medio UP y en medio MS con *Xanthomonas sp.* Como indicador de crecimiento. **B)** Se muestra un acercamiento de los resultados que presentan mayor actividad de los medios AN (arriba) y UP (abajo) a los tiempos 46 horas y 72 horas.

Tomando en cuenta que el extracto presenta actividad, se intentó extraer el principio activo con solventes orgánicos. Generando los siguientes datos mostrados en la tabla 12.

Tabla 12: Descripción aparente producida por el cambio de pH.

pH	1-2	3-4	5.6	7-8	9-10	11-12
Descripción	Precipitado, disminución de color, cambio de color del medio	Poco precipitado, ligero cambio de color.	Sin cambio	Sin cambio	Sin cambio	Sin cambio

Sabiendo que el pH podría modificar la solubilidad del compuesto activo del caldo de fermentación se hizo extracción líquido-líquido como se observa en la tabla 13 que se muestra a continuación.

Tabla 13: extracto obtenido con diferentes solventes orgánicos resuspendido en agua a pH 7 y puesto en contacto con de *Xanthomonas sp.* en ensayo con cobertera. Donde “**si**” = inhibición es total o el número de UFC es menor a 50 por caja, **parcial**” = una inhibición de crecimiento UFC superior a 100, inferior a 200. “y **no**” = mayor de 400 UFC por caja Petri.

pH/ solventes	1-2	3-4	5.6	7-8	9-10	11-12
<b>Acetato de etilo</b>	No	Parcial	Si	Si	Si	parcial
<b>Dicloro metano</b>	No	No	parcial	No	No	No
<b>Cloroformo</b>	No	No	parcial	No	No	No
<b>Tolueno</b>	No	No	No	No	No	No
<b>Hexanos</b>	No	No	No	No	No	No
<b>Benceno</b>	No	No	No	No	No	No
<b>Control</b>	No	No	No	No	No	No

Para determinar qué fracción extraída presentaba la actividad inhibidora de crecimiento se realizó un bioensayo de inmersión del fitopatógeno en el que se inoculó con *Xanthomonas sp.* como indicador, la fracción purificada fue resuspendida en agua ajustando el pH a 7. Los resultados se muestran en la tabla 13 y en la figura 5.

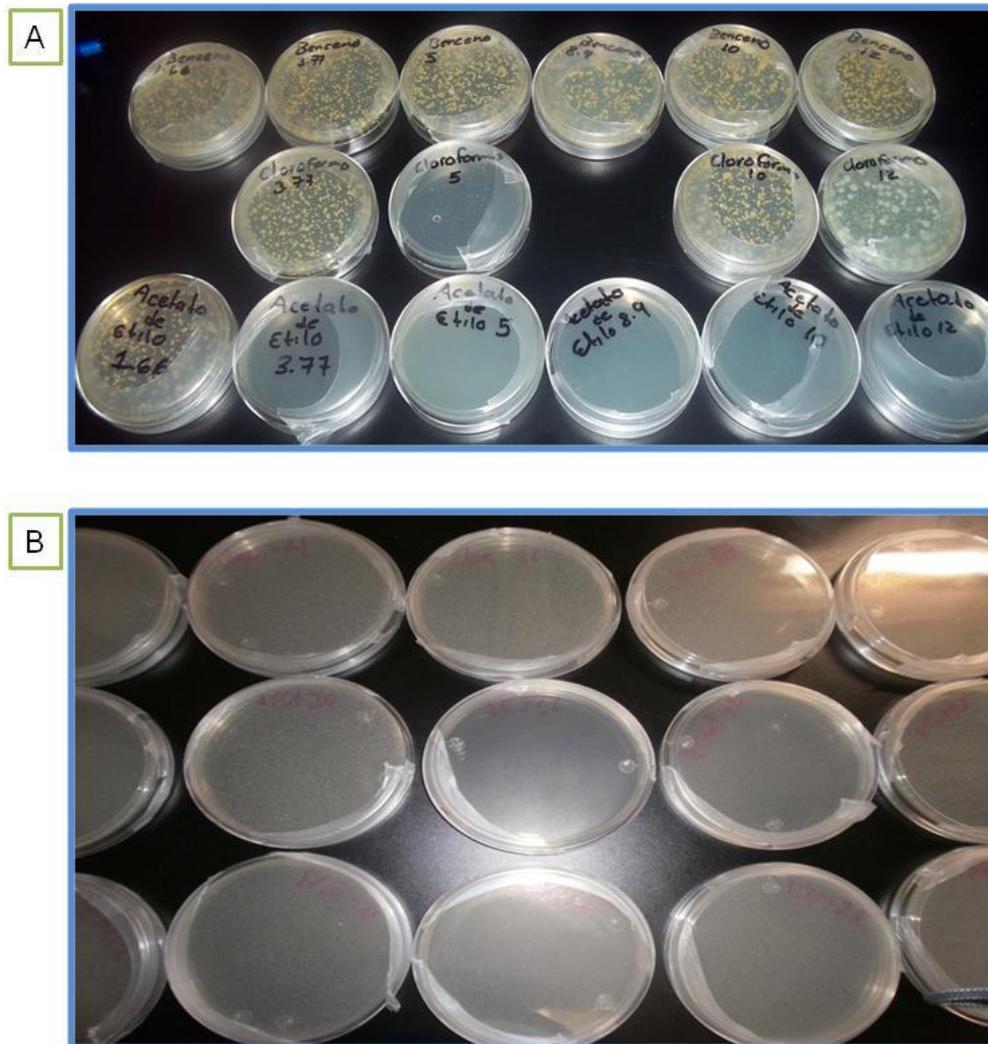


Figura 5: Extracción con pH y solventes orgánicos. pH de 1-2, 3-4, 5-6, 7-8, 9-10 11-12 consecutivamente de izquierda a derecha. **A)** Fitopatógenos *Xanthomonas sp.* Como microorganismo sensible con 3 solventes utilizados en la extracción líquido-líquido. Benceno arriba, cloroformo en medio y acetato de etilo abajo. **B)** *B. subtilis* como microorganismo sensible con 3 solventes utilizados en extracción líquido-líquido. Cloroformo arriba, acetato de etilo en medio y dicloro metano abajo.

Conociendo que el principio activo se extrae bien con acetato de etilo se decidió hacer extracciones exhaustivas con este solvente para concentrar el posible antibiótico.

Sin embargo, al hacer extracciones posteriores con volúmenes mayores de fermentación se forma un sub-producto de la extracción, es decir que la formación de ácido acético fue

inevitable en estas extracciones, lo que resultaría en errores en los bioensayos ya que el ácido acético por si mismo inhibe el crecimiento microbiano.

Teniendo esto en cuenta y conociendo la serie eluotrópica, se decidió hacer la extracción con un solvente con polaridad similar y que sea más estable al estar en contacto con muestras acuosas siendo el dicloro metano el solvente usado debido a que no forma subproductos al calentarse o estar en contacto con agua.

El extracto de dicha fracción se corrió en cromatoplasas de silicagel 60 con factor  $UV_{254}$  con diferentes mezclas de solventes para probar la polaridad de los compuestos del extracto. De esta forma poder separarlos eficientemente para examinar cada compuesto purificado en estudios posteriores como espectro infrarrojo, cromatografía de alta resolución acoplado a masas, resonancia magnética nuclear, autobiógramas entre otros.

La mejor separación se dio con una mezcla de dicloro metano-acetona en una proporción de 6:4. Dando las siguientes cromatoplasas. Donde A) muestra cromatoplasa de 6 cm con extracto de acetato de etilo en extracción líquido-líquido, y muestra 8 compuestos que se separaron debido a su polaridad. B) cromatoplasa de 6 cm con extracto de dicloro metano en extracción líquido-líquido, y muestra 12 compuestos que se separaron debido a su polaridad. y C) muestra la comparación de estas dos fracciones en una cromatoplasa de 10 cm.



Figura 6: Cromatofolios de silicagel 60 factor UV<sub>254</sub> donde se utilizó una fase móvil de diclorometano: acetona en proporción 6:4. **A)** Cromatoplasmas de 6 cm de largo que muestra los extractos obtenidos con acetato de etilo. **B)** Cromatoplasma de 6 cm de largo que muestra extractos obtenidos dicloro metano. **C)** Comparación de las fracciones extraídas con diferentes solventes. Del lado izquierdo muestra el extracto que se obtuvo con acetato de etilo, derecha muestra el extracto con diclorometano.

### Autobiógramas

Se realizó una cromatografía en capa fina en silica gel 60, la cual después de ser eluida con la fase móvil se puso en contacto con un bioensayo de crecimiento en superficie lo que permitió observar si la actividad se mantuvo (método conocido como autobiograma). Esta técnica se realiza con bioensayo por extensión en superficie. Los resultados se muestran en la figura 7.

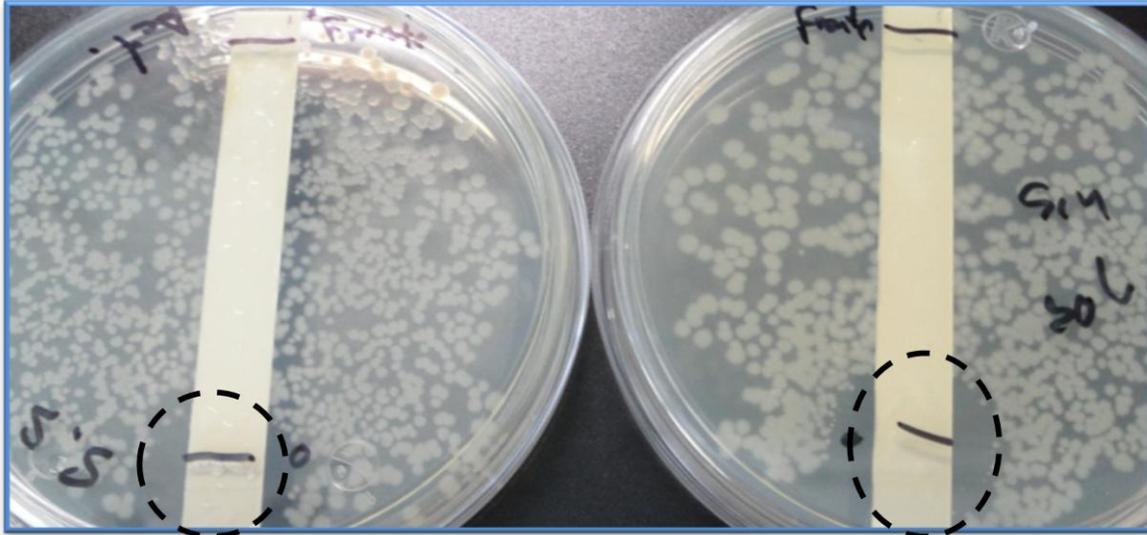


Figura 7: Bioensayo de extensión de superficie con *B. subtilis*. Muestra la actividad del principio activo después de ser eluidas con fase móvil de diclorometano: acetona en proporción de 6:4. Del lado izquierdo es una fracción proveniente de la extracción líquido-líquido con acetato de etilo y del lado derecho es una muestra proveniente del caldo de producción (control positivo).

El principio activo se queda en el punto de aplicación como se ve en la figura 7, debido a su alta afinidad con la silica gel.

### Espectrometría de infrarrojo cercano

Se trabajó en un espectro Perkin Elmer FTIR 14000 y se analizaron muestras líquidas para determinar el infrarrojo cercano de 650 a 4000 nm. Como se ve en la figura 8.

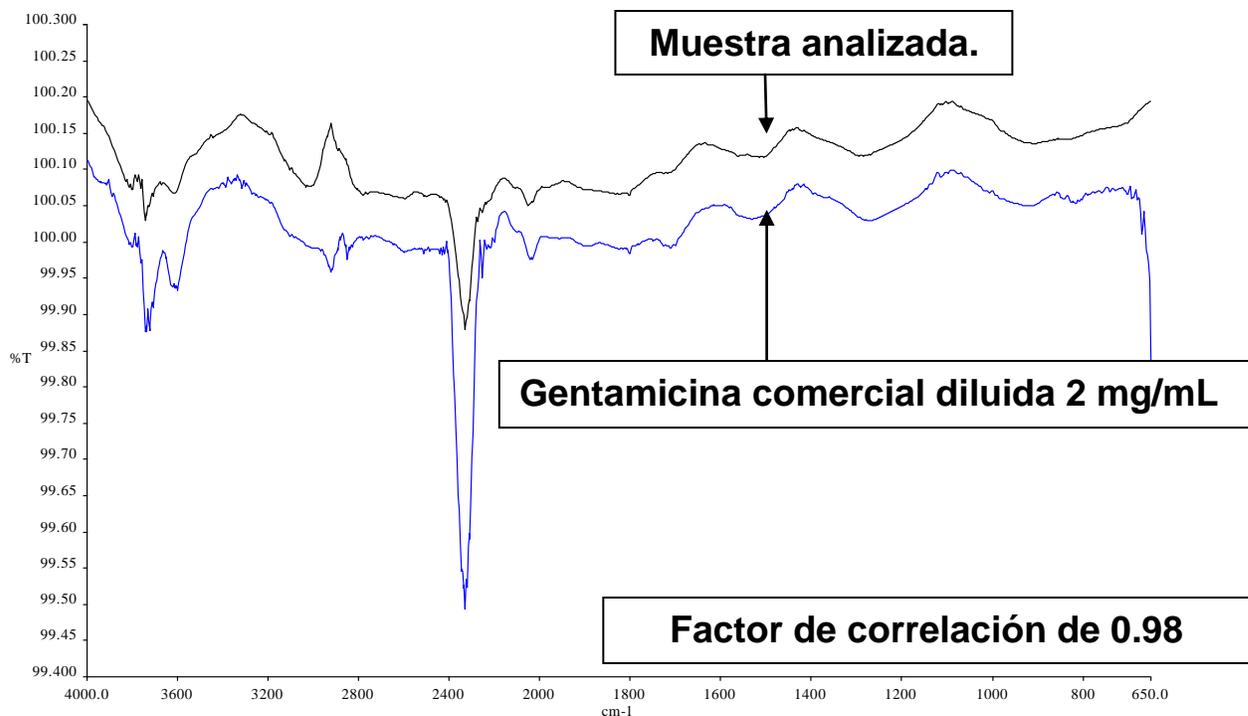
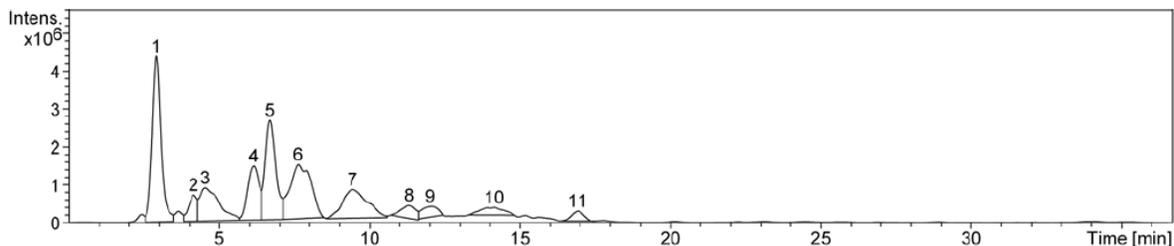


Figura 8: Comparación de espectros de infrarrojo de 650 a 4000 nm en transmitancia entre gentamicina comercial diluida (2mg/ml) con extracto concentrado de medio de cultivo donde la línea que se encuentra por encima es la gentamicina comercial diluida a 2 mg/mL y la línea de abajo muestra la muestra purificada resuspendida en agua para tener concentración de 2 mg/mL.

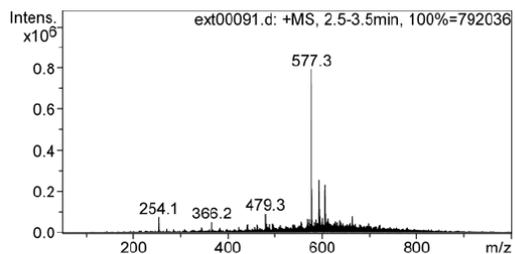
### Los resultados de cromatografía HPLC.

En análisis de masa obtenido con HPLC – ESI se separó en columna Eclipse C18 con fase móvil de MeOH/agua 55/45 con flujo de 0.2 mL/min



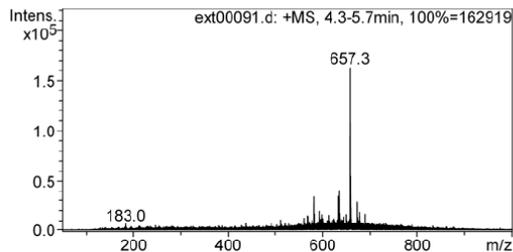
#	RT [min]	Area	Area Frac %
1	2.9	88422861	22.3
2	4.1	12950228	3.3
3	4.5	39811768	10.0
4	6.1	37065627	9.3
5	6.7	64091111	16.2
6	7.6	70436953	17.8
7	9.4	43708575	11.0
8	11.3	11274002	2.8
9	12.0	10477381	2.6
10	14.1	11093693	2.8
11	16.9	7201340	1.8

**Cmpd 1, 2.9 min**



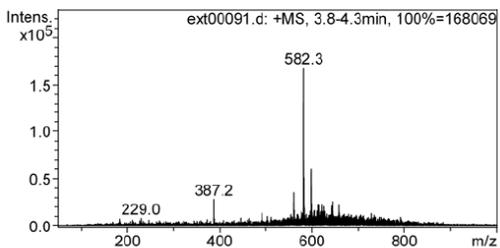
#	m/z	I
1	254.1	72293
2	479.3	89467
3	577.3	792036
4	578.3	210740
5	593.3	252759
6	594.3	113239
7	595.3	73951
8	605.4	230480
9	606.4	91705
10	664.3	75572

**Cmpd 3, 4.5 min**



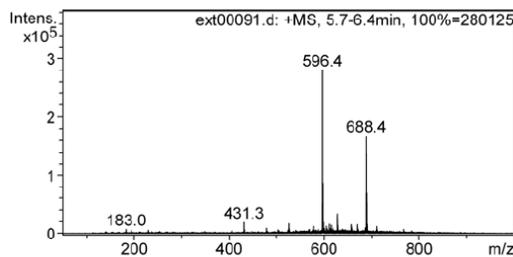
#	m/z	I
1	582.3	33690
2	593.3	19618
3	633.3	34267
4	635.3	40783
5	636.3	17452
6	657.3	162919
7	658.3	54874
8	659.3	22914
9	673.2	28519
10	678.3	18464

**Cmpd 2, 4.1 min**



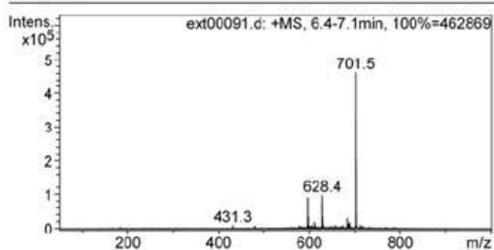
#	m/z	I
1	387.2	28396
2	560.3	35496
3	582.3	168069
4	583.3	51340
5	598.3	60002
6	599.3	23810
7	612.3	23080
8	622.3	23122
9	644.3	25957
10	657.3	22804

**Cmpd 4, 6.1 min**



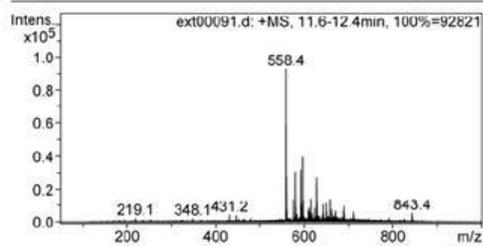
#	m/z	I
1	431.3	19158
2	525.3	16988
3	596.4	280125
4	597.4	87105
5	598.3	19428
6	610.4	16317
7	628.4	33703
8	688.4	167566
9	689.4	68075
10	690.4	15908

**Cmpd 5, 6.7 min**



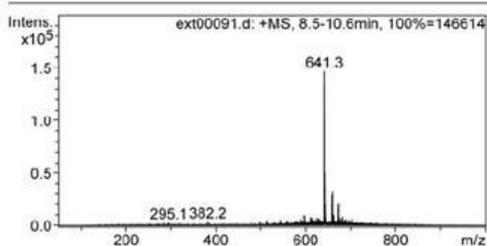
#	m/z	I
1	596.4	90424
2	597.4	34381
3	610.4	18797
4	628.4	96912
5	629.4	33576
6	683.5	30212
7	688.4	18698
8	701.5	462869
9	702.5	204567
10	703.5	44106

**Cmpd 9, 12.0 min**



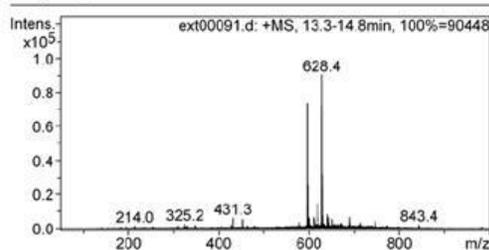
#	m/z	I
1	558.4	92821
2	559.4	27478
3	574.3	13934
4	580.3	30658
5	592.3	31801
6	596.4	39416
7	597.4	13784
8	614.3	14558
9	628.4	27177
10	657.4	14006

**Cmpd 7, 9.4 min**



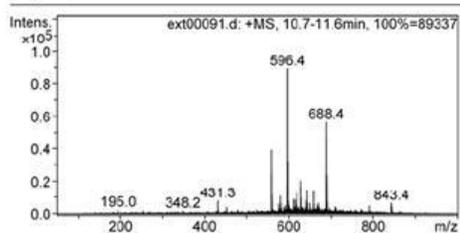
#	m/z	I
1	641.3	146614
2	642.3	50002
3	643.3	19855
4	657.2	29697
5	658.2	11975
6	659.3	32425
7	660.4	11428
8	663.3	9789
9	672.3	18203
10	673.3	20742

**Cmpd 10, 14.1 min**



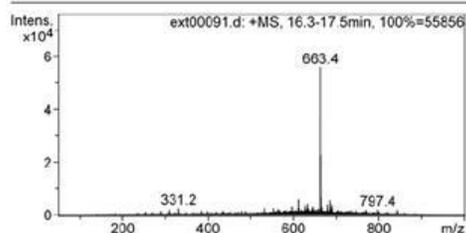
#	m/z	I
1	596.4	73375
2	597.4	25089
3	610.4	6465
4	618.4	14595
5	619.3	6523
6	628.4	90448
7	629.4	31881
8	630.4	7216
9	640.3	8313
10	689.4	6643

**Cmpd 8, 11.3 min**



#	m/z	I
1	558.4	39204
2	559.3	11372
3	596.4	89337
4	597.4	32056
5	618.3	12584
6	628.4	20283
7	642.4	14930
8	657.4	13435
9	688.4	56458
10	689.4	23858

**Cmpd 11, 16.9 min**



#	m/z	I
1	611.4	5697
2	628.4	3265
3	633.3	3974
4	645.3	3046
5	663.4	55856
6	664.3	22562
7	665.3	6454
8	679.3	3694
9	685.3	5291
10	689.4	3609

Figura 9: Muestra los reportes de masa de las diferentes fracciones separadas en la cromatografía con HPLC – ESI se separó en columna Eclipse C18 con fase móvil de MeOH/agua 55/45 con flujo de 0.2 mL/min.

## Resonancia magnética nuclear de hidrógeno (RMNH)

Él principio activo que se separó y concentró de las extracciones se disolvió en piridina deuterada y se analizó por RMNH tratando de identificar su estructura química.

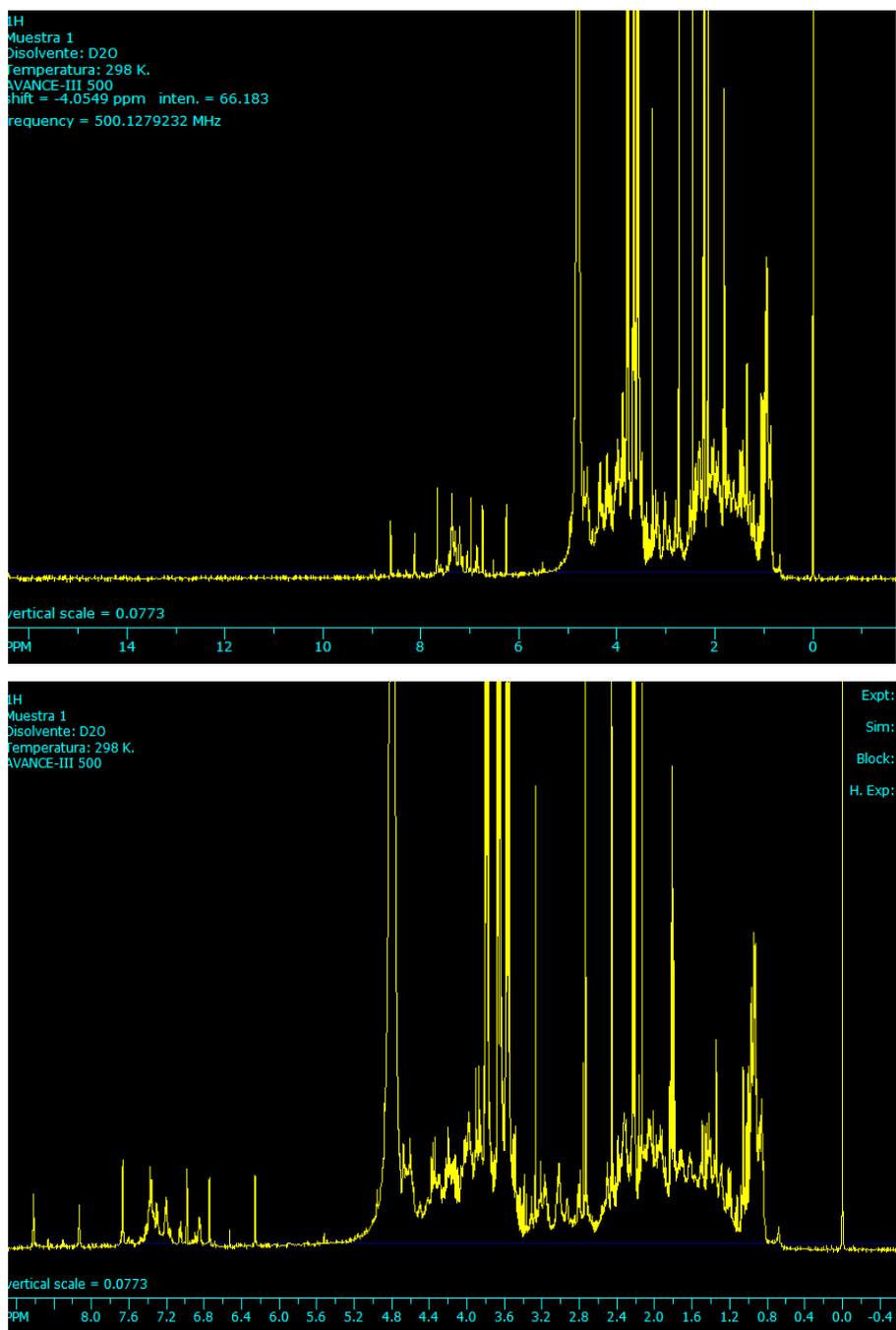


Figura 10: Espectros de resonancia magnética nuclear de hidrógeno disuelto en piridina a 25 °C de la estructura proveniente de *Streptomyces paucisporogenes*.

## DISCUSIÓN DE RESULTADOS

En el primer bioensayo se sembraron *S. badius*, *S. platensis*, *S. paucisporogenes*, *S. spectabilis*, *S. lividans*, TK 24, *S. violaceusniger*, *S. flavo*, *S. flavoviridis*, *S. gedanensis* en placas de medio MS agar, se pusieron en contacto con indicadores fitopatógenos tales como *Xanthomonas sp.*, *P. aurofaciens*, *P. flurescens*, *P. syringae* y *Ralstonia sp.* y no fitopatógenos *B. subtilis*. Como se mostró en la tabla 11, solo 3 cepas presentaron actividad inhibidora de crecimiento en contra de *Pseudomonas syringae*, *Xanthomonas sp.* y *B. subtilis*: esto difiere un poco de las referencias encontradas ya que según Evangelista en el 2007 indica que por lo menos el 50% de los microorganismos del género *Streptomyces* deben de producir al menos un compuesto que tenga actividad antibiótica gram positiva. Sin embargo, la actividad hallada fue en contra de algunas *Pseudomonas* y *Xanthomonas sp.* Las cuales son bacterias gram negativas y *B. subtilis* que es gram positiva lo que nos podría dar el indicio de que se trate de un antibiótico de amplio espectro ya que actúa en contra de gram positivas y gram negativas.

Por lo tanto cuando *Streptomyces spectabilis*, *Streptomyces platensis* y *Streptomyces paucisporogenes* presentaron actividad antimicrobiana, se realizó una búsqueda en las bases de datos National Center for Biotechnology Information, NCBI y metabolic pathways and enzymes, MetaCyc. Para saber que antibióticos reportan para estas especies y así comparar los resultados obtenidos en la tabla 11. Donde se encontró que los antibióticos platensiomycina, kanamicina y streptomycina provenientes de *S. platensis* y *S. spectabilis* respectivamente son producidos de manera comercial por estos microorganismos (Rodríguez, 1998). Por lo que estas especies fueron descartadas, debido a que posiblemente la actividad encontrada sea causada por estos antibióticos ya conocidos.

Sabiendo que *S. paucisporogenes* presenta actividad inhibitoria de crecimiento en contra de algunos fitopatógenos (*Pseudomonas syringae* y *Xanthomonas sp.*) y no fitopatógenos (*B. subtilis*), y que además no se encuentran reportes que indiquen actividad antimicrobiana, nos dimos a la tarea de buscar un medio de producción que favorezca la producción de este posible antibiótico para poder identificarlo y caracterizarlo.

Los medios de producción más conocidos y más usados para *Streptomyces* son los reportados en el libro “Practical *Streptomyces* Genetics” (Kieser, 1985) los cuales favorecen la formación de pigmentos, tales como la actinorodina y la undecilprodigiosina, puesto que dirigen la formación de metabolitos secundarios descritos en el apartado de medios. Dichos medios se nombraron AN y UP.

La primer prueba de actividad que se realizó sobre un medio llamado MS agar nos permitió identificar la actividad de inhibición de crecimiento antes mencionada, por lo que nuestro diseño experimental debía contener los 2 medios encontrados en bibliografía (AN y UP) así como una modificación del medio MS agar (que no debería contener agar) y ver si es posible obtener la misma actividad en medio líquido, al cual llamamos medio control (MS). Cabe señalar que durante el proceso de búsqueda de condiciones óptimas para la producción del metabolito de interés, no se modificaron ni la temperatura, la velocidad ni tipo de agitación, por lo que se mantuvieron las fermentaciones líquidas en matraces Erlenmayer a 30°C y 150 RPM.

De acuerdo a los resultados mostrados (figura 5) tras monitorear las cinéticas de producción, se determinó que el metabolito de interés se produce solamente cuando el cultivo de *Streptomyces* esta envejecido (aproximadamente 10 días en caja Petri y al tercer día en caldo de fermentación en medio de producción; lo que indica que se produce en la idiofase y por lo tanto, puede tratarse de un metabolito secundario como los antibióticos. Este supuesto antibiótico se produjo en 3 medios diferentes que mostraron similitudes en la actividad antimicrobiana con los indicadores *Xanthomonas sp* y *B. subtilis*, sin embargo, el tiempo necesario para ver la formación de halos de inhibición es menor en *B. subtilis* que se obtuvo a las 24 horas, mientras que con *Xanthomonas sp*, los resultados se obtuvieron a las 48 horas, por lo que se concluyó que es mejor trabajar con *B. subtilis* y con el medio UP el cual tiene menor cantidad de compuestos que podrían interferir en la extracción con solventes orgánicos que los medios MS y AN.

Durante una fermentación microbiana se deben monitorear ciertos factores ambientales para garantizar que el proceso ocurra de forma correcta y reproducible (Madigan 2006) los factores descritos en la bibliografía son; temperatura, agitación, concentración de oxígeno, masa celular y concentración de productos y sustratos. Asumiendo estas variables se fijaron algunas de ellas con los siguientes parámetros, 30° C, 150 RPM, medio UP, 10% de preinoculo, pH inicial de 7.2 y evitando superar 500 mL de caldo de fermentación para evitar problemas de aireación en matraces Erlenmeyer. Lo que dio como resultado en fermentaciones que variaban en niveles de inhibición de crecimiento, que después de analizar porque variaba la producción de antibióticos se observó que lo matraces tenían diferentes pH (5.5-7.6) al terminar las fermentaciones se determinó que la fermentación que tenía pH final de 5.5 tenía mayor actividad que el resto de matraces. Como se corrobora en los resultados en la figura 5 imagen B).

Conociendo que el medio de producción UP favorece la producción del antibiótico de interés, se buscaron las características del sistema de extracción de 2 fases. De acuerdo con Felder (1991), se modificó la polaridad del principio activo modificando pH, que nos permite incrementar el coeficiente de reparto, para variar la distribución entre las fases con diferentes solventes tales como cloroformo, dicloro metano, acetato de etilo, tolueno y hexano. Lo que resultó en 2 buenos modelos de extracción con solventes como acetato de etilo y dicloro metano.

Los productos extraídos en ambos sistemas de extracción fueron analizados y separados por cromatografía en capa fina para identificar la cantidad de compuestos presentes en los extractos concentrados. Observando que el mejor solvente para hacer extracciones líquido-líquido es el acetato de etilo, debido a que sólo arrastra 8 compuestos aparentes separados por cromatografía en capa fina, sin embargo este compuesto presenta algunos inconvenientes, ya que al estar en contacto con alguna fuente térmica y pH ácido, puede generar compuestos que enmascaran la actividad antimicrobiana, es decir que el acetato de etilo se descompone en ácido acético y etanol (ambos compuestos producen actividad antimicrobiana), por lo que se trabajo simultáneamente con dicloro metano y acetato de etilo para corroborar los resultados de actividad.

Es importante mencionar que los compuestos separados presentan un olor y color característico a azúcares (tipo melaza). Que después de ser analizado por el método de Fisher de punto de fusión obtuvimos que la mezcla de compuestos tiene un punto de fusión inicial a los 80 °C y se consume en su totalidad a 90 °C, por lo que podemos asegurar que se trata de un compuesto orgánico el que produce la actividad antimicrobiana.

Conociendo que se trata de una mezcla intentamos separar los compuestos que estaban presentes y que presentaran diferentes coeficientes de reparto (Felder, 1991)., haciendo lavados secuenciales de acetato de etilo, dicloro metano y agua, (aproximadamente medio mililitro) posteriormente se filtraron en membrana de nylon de 0.45  $\mu\text{m}$

Las fracciones separadas de la mezcla se analizaron por autobiogramas en cromatoplasmas y sabiendo que la muestra ya no presentaba impurezas que pudieran afectar otros estudios (IR, HPLC-ESI y resonancia magnética nuclear de hidrógeno RMNH), se realizó un espectro infrarrojo cercano de transmitancia, (figura 8), en donde los resultados muestran la comparación del patrón de infrarrojo de la gentamicina comercial con el espectro de infrarrojo de la muestra analizada, lo que dio como resultado una similitud en los picos de transmitancia, así como el patrón absorción de longitud de onda. Por lo que podemos esperar que el compuesto analizado sea algún aminoglucósido.

Los resultados de HPLC-ESI mostraron que a pesar de que se intento separar la mezcla que contenía al principio activo, se encontró en el cromatograma que por lo menos se encuentran 11 compuestos con polaridad muy similar al antibiótico que se pudieron separar en un flujo de 0.2 mL/minuto de metanol/agua 55/45.

Los picos más significativos, es decir que parecen ser mayoritarios son 1(22%) y 5 (16.2%) donde el peso molecular más probable sea de 577.3 g/mol y 701.5 g/mol respectivamente, pero como sabíamos que la fase reversa tuvo que eluir los compuestos más polares al inicio del cromatograma, sabemos que el peso molecular del antibiótico es de 577.3 g/mol.

Al observar estos 2 compuestos con un 36% de la muestra previamente purificada. Nos dice que la máxima concentración obtenida fue menor a un 50 %. Pero al hacer los estudios comparativos de la muestra con concentración final 10 mg/mL, tiene efecto similar a la gentamicina comercial con concentración de 40mg/mL. Por lo que es probable que este antibiótico sea 6-8 veces más potente que la gentamicina.

Por otra parte al analizar los espectros de resonancia magnética nuclear, se vio que existen diferentes magnitudes en los picos en los espectros es decir, al encontrarse grupos de señales con diferentes intensidades indica que existen compuestos diferentes en concentraciones diferentes. Los picos se encuentran en el rango de 3.6 lo cual indica que existe un alto contenido de glicerol. Por otra parte los picos encontrados en 2.3 que también presenta una magnitud similar a los picos de glicerol, indican la presencia de por lo menos 3 compuestos con la misma polaridad en la muestra por lo que es imposible identificar la estructura química con estos experimentos.

A pesar de que no se logro encontrar la estructura química del compuesto debido a los múltiples factores es importante mencionar que las comparaciones realizadas fueron limitadas a los antimicrobianos utilizados de manera habitual en el laboratorio. Esto nos permite plantear las perspectivas al comparar mediante diferentes grupos de antibióticos ya existentes para descartar que se trate de un aminoglucósido ya conocido.

## CONCLUSIONES

1. *Streptoyces paucisporogenes* produce un metabolito con actividad antimicrobiana en contra de *B. subtilis*, *Xanthomonas* y *P. syringe*.
2. El medio de mejor producción es el medio UP usado para la producción de Undecilprodigiosina.
3. El máximo de producción se observa durante la fase estacionaria (idiofase), típica de metabolitos secundarios.
4. El tamaño del compuesto de interés es menor a 3 KDa.
5. El principio activo es polar.
6. El espectro IR indica que el compuesto es un aminoglucósido.
- 7.- El peso molecular más probable es 577.3 g/mol.
- 8.- No es posible determinar su estructura química por RMNH debido a que existen por lo menos 2 compuestos en la muestra.

## BIBLIOGRAFÍA

- Alanís, R. J. (2007). Revisión bibliográfica sobre los antibióticos macrólidos y su interés en medicina veterinaria. Veterinaria y zootecnia. Michoacan, Universidad Michoacana de San Nicolas de Hidalgo. **Licenciatura:** 68.
- Anderson, T. B. B., P. Champness, W.C., (2001) Genetic and transcriptional analysis of *absA*, an antibiotic gene cluster-linked two-component system that regulates multiple antibiotics in *Streptomyces coelicolor*, *Mol. Microbiol*, **39**: 13.
- Baltz, R. H. y Hosted, T. J., (1996) Molecular genetic methods for improving secondary-metabolite production in actinomycetes, *Trends Biotechnol*, **14**: 245-250.
- Becker, J. M., Covert, N. L., Shenbagamurthi, P. y col., (1983) Polyoxin D inhibits growth of zoopathogenic fungi, *Antimicrob Agents Chemother*, **23**: 926-929.
- Bentley, S. D., Chater, K. F., Cerdeno-Tarraga, A. M. y col., (2002) Complete genome sequence of the model actinomycete *Streptomyces coelicolor* A3(2), *Nature*, **417**: 141-147.
- Bourgaud, F. G., A. Milesi, S., (2001) Production of plant secondary metabolites: a historical perspective., *Plant Sci.*: 13.
- Caballero, J., (2007) Macrólidos, *Revista Papeña de Medicina Familiar.*, **4**: 5.
- Castillo, U. F., Strobel, G. A., Ford, E. J. y col., (2002) Munumbicins, wide-spectrum antibiotics produced by *Streptomyces* NRRL 30562, endophytic on *Kennedia nigricans*, *Microbiology*, **148**: 2675-2685.
- Combes, P., Till, R., Bee, S. y col., (2002) The streptomyces genome contains multiple pseudo-attB sites for the ( $\phi$ )C31-encoded site-specific recombination system, *J Bacteriol*, **184**: 5746-5752.
- Cordiés, J. M., RL. Hamilton, CM., (1998) Principios generales de la terapéutica antimicrobiana., *Acta medica*, **8**: 15.
- Cué, B. M. M., García M., (1998) Antibacterianos de acción sistémica parte I., *Rev.Cubana Medicina General Integral*, **14**: 15.
- De la Fuente, A., Lorenzana, L. M., Martin, J. F. y col., (2002) Mutants of *Streptomyces clavuligerus* with disruptions in different genes for clavulanic acid biosynthesis produce large amounts of holomycin: possible cross-regulation of two unrelated secondary metabolic pathways, *J Bacteriol*, **184**: 6559-6565.
- Demain, A. L., (1999) Pharmaceutically active secondary metabolites of microorganisms, *Appl Microbiol Biotechnol*, **52**: 455-463.
- Du, L., Liu, R. H., Ying, L. y col., (2012) An Efficient Intergeneric Conjugation of DNA from *Escherichia coli* to Mycelia of the Lincomycin-Producer *Streptomyces lincolnensis*, *Int J Mol Sci*, **13**: 4797-4806.
- Dulmage, H. T., (1953) The production of neomycin by *Streptomyces fradiae* in synthetic media, *Appl Microbiol*, **1**: 103-106.
- Edward, A. R., H. (1938). Griseofulvin  $C_{17}H_{17}O_6Cl$ , a metabolic product of *penicillium griseo-fulvum*. . London.
- Espinosa, J. T., J. Rubio, M. Jiménez, A., (1999) The *pur7* Gene from the Puromycin Biosynthetic *pur* Cluster of *Streptomyces alboniger* Encodes a Nudix Hydrolase, *Journal of Bacteriology*, **181**: 5.
- Evangelista, M. M., EA., (2007) Metabolitos secundarios de importancia farmaceutica, *Bioteconología*, **11**: 14.

- Evans, M. E., Feola, D. J. y Rapp, R. P., (1999) Polymyxin B sulfate and colistin: old antibiotics for emerging multiresistant gram-negative bacteria, *Ann Pharmacother*, **33**: 960-967.
- Felder, M. (1991). Principios elementales de los procesos químicos. México, Pearson education.
- García Rodríguez José Ángel, B. L. J., Gonzales Núñez José, Orezo Gonzalez Ana, Prieto Prieto José (2006). La otra historia de los antimicrobianos. Barcelona, Grupo Ars XXI de comunicación, S.L.
- Giner, S. C., M. Rodilla, F. Ferrer, C., (1995) Nuevos macrolidos. ¿Superan a eritromicina?, *Farm hosp*, **19**: 7.
- Gobenardo, M., (2003) Fosfomicina, *RFevista española de quimioterapia*, **16**: 26.
- Gómez, R. M., G. , (2007) La aminación reductiva sobre eritromicina como ruta alternativa para la obtención de eritromicina, intermediario en la síntesis de diritromicina., *Revista del centro de Investigación. Universidad La Salle.*, **7**: 9.
- Hagemann (1962). fungicidal compound and process of making same. United States Patent Office. **3.052.605**: 12.
- Hermann, T., (2005) Drugs targeting the ribosome, *Curr Opin Struct Biol*, **15**: 355-366.
- Hopwood, D. A., (2003) Streptomyces genes: from Waksman to Sanger, *J Ind Microbiol Biotechnol*, **30**: 468-471.
- Jonsbu, E., Ellingsen, T. E. y Nielsen, J., (2000) Effects of nitrogen sources on cell growth and production of nystatin by Streptomyces noursei, *J Antibiot (Tokyo)*, **53**: 1354-1362.
- Kieser, T. B., M. Buttner, M. Chater, K. Hopwood, D. (1985). Practical *Streptomyces* genetics. England, John Innes Foundation.
- Kinashi, H. y Shimaji, M., (1987) Detection of giant linear plasmids in antibiotic producing strains of Streptomyces by the OFAGE technique, *J Antibiot (Tokyo)*, **40**: 913-916.
- Kominek, L. A., (1975) Cycloheximide production by Streptomyces griseus: alleviation of end-product inhibition by dialysis-extraction fermentation, *Antimicrob Agents Chemother*, **7**: 861-863.
- Li, J., Nation, R. L., Turnidge, J. D. y col., (2006) Colistin: the re-emerging antibiotic for multidrug-resistant Gram-negative bacterial infections, *Lancet Infect Dis*, **6**: 589-601.
- Lizarbe, M. A., (2009) Bacterias y Virus. ¿Cómo nos defendemos?, *Rev.R.Acad.Cienc.Exact.Fis.Nat.(esp)*, **103**: 58.
- Lomovskaya, N. D., Chater, K. F. y Mkrtumian, N. M., (1980) Genetics and molecular biology of Streptomyces bacteriophages, *Microbiol Rev*, **44**: 206-229.
- Macarulla, J. G., Félix. (1994). Bioquímica humana, curso básico. España, Reverté.
- Madigan, M. T. M., Jhon M. Parker, Jack . (2006). Brock Biología de los Microorganismos. Madrid, Pearson Prentice Hall.
- Mariano, M. A. (2009). Herramientas para el mejoramiento genético de *S. violaceusniger* YCED-9 enfocadas a producción de metabolitos secundarios. Centro de Investigación en Biotecnología aplicada. México, Instituto Politécnico Nacional. **Maestría**: 117.
- Marinelli, F., (2009) Antibiotics and *Streptomyces*: the future of antibiotics discovery., *Microbiology today*.: 4.
- Martínez, J. S., F., (2007) Mecanismo de acción de los antibióticos, *Jano Medicina y Humanidades*, **1660**: 7.

- Mcmanus, P., (1999) Uso de los antibioticos en el control de enfermedades de las plantas., *Enfermedades infecciosas y microbiología*, **19**: 192-196.
- Milind, G. R., T. Maithili, M., (2001) How many antibiotics are produced by the genus *Streptomyces*?, *Arch Microbiol.*: 5.
- Morales, Y. H., Ma. Muñoz, J., (2007) Cloranfenicol, un antibiótico clásico como alternativa en el presente. , *Revista Mexicana de ciencias farmacéuticas*, **38**: 13.
- Nagy, V. y Szakacs, G., (2008) Production of transglutaminase by *Streptomyces* isolates in solid-state fermentation, *Lett Appl Microbiol*, **47**: 122-127.
- Núñez, A. M., C. Rivera, M.E. González, A., (2006) Vancomicina. Un vencedor vencido., *Medicrit. Revista de Medicina interna y Medicina crítica.*, **3**: 3.
- Ohnishi, Y., Ishikawa, J., Hara, H. y col., (2008) Genome sequence of the streptomycin-producing microorganism *Streptomyces griseus* IFO 13350, *J Bacteriol*, **190**: 4050-4060.
- Oliveira, J. C., J. Burdmann, E., (2006) Nefrotoxicidade dos aminoglicosídeos, *Braz J Cardiovasc Surg*, **21**: 9.
- Ponce de Leon, S., (1998) Notas sobre la penicilina, *Ciencias* **49**: 54-57.
- Rao, S. R. y Ravishankar, G. A., (2002) Plant cell cultures: Chemical factories of secondary metabolites, *Biotechnol Adv*, **20**: 101-153.
- Ribelles, d. I. V. P. (2008). Síntesis de antibióticos en *Streptomyces* y su relación con el metabolismo global. Centro Nacional de Biotecnología. Biología Molecular. Madrid, Universidad Autónoma de Madrid. **Doctorado**: 158.
- Rodríguez, M. G., J. Barreto, J. Lim, N. Areu, A. y (1998) TETRACICLINAS, *Acta medica*, **8**: 5.
- Rodríguez, M. G., J. Barreto, J. Lim, N. Areu, A. y (1998) Tetraciclinas., *Acta medica*, **8**: 5.
- Ruf, A., Stihle, M., Benz, J. y col., (2013) Structure of Gentlyase, the neutral metalloprotease of *Paenibacillus polymyxa*, *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, **69**: 24-31.
- Sáenz, E. S., L., (2005) Antibióticos Tópicos, *Dermatología Peruana*, **15**: 14.
- Sande, M. K.-U. J. (1993). Las bases farmacológicas de la terapéutica. México, Panamericana.
- Sanjurjo, M., (1997) La penicilina, pionera de la era de los antibióticos., *Profesores al día. Educación química. Facultad de Química UNAM.*, **8**: 7.
- Schneider, J., Yepes, A., Garcia-Betancur, J. C. y col., (2011) Streptomycin-induced expression in *Bacillus subtilis* of YtnP, a lactonase-homologous protein that inhibits development and streptomycin production in *Streptomyces griseus*, *Appl Environ Microbiol*, **78**: 599-603.
- Tenson, T. y Mankin, A., (2006) Antibiotics and the ribosome, *Mol Microbiol*, **59**: 1664-1677.
- Thompson, C. J., Fink, D. y Nguyen, L. D., (2002) Principles of microbial alchemy: insights from the *Streptomyces coelicolor* genome sequence, *Genome Biol*, **3**: REVIEWS1020.
- Tokala, R. K., Strap, J. L., Jung, C. M. y col., (2002) Novel plant-microbe rhizosphere interaction involving *Streptomyces lydicus* WYEC108 and the pea plant (*Pisum sativum*), *Appl Environ Microbiol*, **68**: 2161-2171.
- Verma, M., Kaur, J., Kumar, M. y col., (2011) Whole genome sequence of the rifamycin B-producing strain *Amycolatopsis mediterranei* S699, *J Bacteriol*, **193**: 5562-5563.

- Woese, C. R., (1987) Bacterial evolution, *Microbiol Rev*, **51**: 221-271.
- Yanai, K., Murakami, T. y Bibb, M., (2006) Amplification of the entire kanamycin biosynthetic gene cluster during empirical strain improvement of *Streptomyces kanamyceticus*, *Proc Natl Acad Sci U S A*, **103**: 9661-9666.
- Zhong, Z., Caspi, R., Mincer, T. y col., (2002) A 50-kb plasmid rich in mobile gene sequences isolated from a marine micrococcus, *Plasmid*, **47**: 1-9.