

R. 6493

UNIVERSIDAD DE SEVILLA

FACULTAD DE FARMACIA

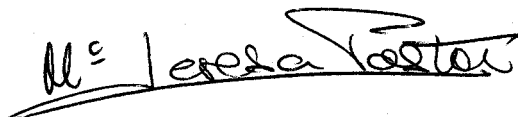
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA

ESTUDIOS SOBRE UN ANTIMICROBIANO  
PRODUCIDO POR UNA CEPA DE *Pseudomonas aeruginosa*  
AISLADA DE SUELOS DEL COTO DE DOÑANA

UNIVERSIDAD DE SEVILLA  
FACULTAD DE FARMACIA  
BIBLIOTECA

Memoria que presenta en la  
Facultad de Farmacia de la  
Universidad de Sevilla pa-  
ra optar al grado de Doctor

M<sup>ª</sup> TERESA PASTOR TORRES

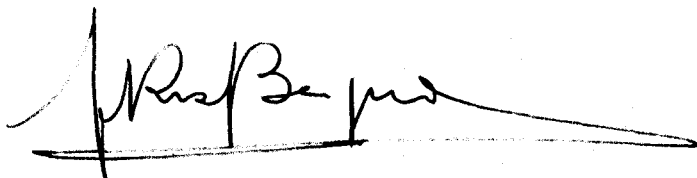


Sevilla, Junio de 1984

FRANCISCO RUIZ BERRAQUERO, CATEDRATICO Y DIRECTOR DEL DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA DE LA FACULTAD DE FARMACIA DE LA UNIVERSIDAD DE SEVILLA,

CERTIFICO : Que la Tesis Doctoral titulada : "ESTUDIOS, SOBRE UN ANTIMICROBIANO PRODUCIDO POR UNA CEPA DE *Pseudomonas aeruginosa* AISLADA DE SUELOS DEL COTO DE DOÑA NA", presentada por la licenciada en Farmacia M<sup>a</sup> TERESA PASTOR TORRES para optar al grado de Doctor, ha sido realizada en el departamento de Microbiología de la Universidad de Sevilla bajo la dirección del Profesor Adjunto Numerario Dr. D. Antonio J. Palomares - Diaz, cumpliendo todos los requisitos para ser elevada a la Junta de Facultad y ser juzgada por el Tribunal correspondiente.

Y para que así conste, expido y firmo la presente certificación en Sevilla, a 9 de Junio de 1984

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'F. Ruiz Berraquero', with a long horizontal flourish extending to the right.

Fdo. : F. Ruiz Berraquero

ANTONO J. PALOMARES DIAZ, PROFESOR ADJUNTO NUMERARIO  
DEL DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA DE LA FACULTAD DE -  
FARMACIA DE LA UNIVERSIDAD DE SEVILLA,

CERTIFICO : Que la Tesis Doctoral titulada : "ESTUDIOS  
SOBRE UN ANTIMICROBIANO PRODUCIDO POR UNA CEPA DE *Pseu*  
*domonas aeruginosa* AISLADA DE SUELOS DEL COTO DE DOÑA-  
NA", presentada por la Licenciada en Farmacia M<sup>a</sup> TERE-  
SA PASTOR TORRES para optar al grado de Doctor, ha si-  
do realizada en este Departamento bajo mi dirección.

Y para que así conste, expido y firmo la pre-  
sente certificación en Sevilla, a 9 de Junio de 1984.

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Antonio J. Palomares Díaz', is written over a horizontal line that has been crossed out with a diagonal slash.

Fdo. : A.J. Palomares Díaz

Mi agradecimiento :

Al Prof. Dr. D. Francisco Ruiz Berraquero por haber permitido la realización de este Trabajo, así como por el interés y apoyo prestado en todo momento.

Al Prof. Dr. D. Antonio J. Palomares Díaz, director de esta Tesis, por la ayuda y colaboración prestada, que de forma tan decisiva ha influido en el desarrollo de este Trabajo.

A los Departamentos de Química Orgánica y Farmacología-Farmacodinamia de esta Facultad, por las facilidades dispensadas siempre que fue necesario.

A M<sup>a</sup> Dolores Galán Parra de forma muy especial, no sólo por la colaboración a nivel científico, sino también - porque su amistad y grandes cualidades humanas han sido decisivas para mí a la hora de superar las dificultades que cualquier trabajo de este tipo lleva consigo.

A todos aquellos compañeros del Departamento que, de una u otra forma, han contribuido en la realización de este Trabajo.

A mis padres

A Felipe

INDICE

## INDICE

OBJETO DEL TRABAJO

INTRODUCCION

MATERIAL Y METODOS

1.- Aislamiento del microorganismo productor

1.1.- Origen de las muestras

1.2.- Toma de muestras

1.3.- Técnica de aislamiento

1.4.- Microorganismos testigo

1.5.- Conservación del microorganismo productor

2.- Medios de cultivo

2.1.- Medios de aislamiento y conservación

2.2.- Medios de producción

2.3.- Medios de revelado

3.- Producción en medio sólido

3.1.- Técnica de acúmulos por asa calibrada

3.2.- Técnica de bloques por difusión en agar

4.- Producción en medio líquido

4.1.- Estático

4.2.- Agitación

4.3.- Aireación

5.- Curva de crecimiento del microorganismo productor

6.- Optimización de las condiciones de producción

6.1.- Tamaño de inóculo

6.1.1.- Microorganismo productor

6.1.2.- Microorganismos testigo

- 6.2.- Tiempo de incubación
- 6.3.- Modalidad del cultivo
- 6.4.- Temperatura de incubación
- 6.5.- pH del medio
- 6.6.- Tiempo de predifusión
- 6.7.- Composición del medio de cultivo
  - 6.7.1.- Efecto de la concentración de glucosa
  - 6.7.2.- Otras fuentes de carbono
  - 6.7.3.- Efecto de la concentración de peptona
  - 6.7.4.- Otras fuentes de nitrógeno
  - 6.7.5.- Efecto de los iones metálicos
- 7.- Ensayos de actividad antimicrobiana
  - 7.1.- Antagonismo bacteriano: Método de la doble capa
  - 7.2.- Método de los pocillos
  - 7.3.- Método de impregnación de discos
  - 7.4.- Bioautografía
- 8.- Curva patrón de Penicilina-G
- 9.- Ensayos de extracción del antimicrobiano
  - 9.1.- Técnicas preliminares
  - 9.2.- Extracción a partir del medio de cultivo
  - 9.3.- Extracción a partir de las células
    - 9.3.1.- Rotura celular por sonicación
    - 9.3.2.- Rotura celular por lisis enzimática
- 10.- Ensayos de purificación
  - 10.1.- Diálisis
  - 10.2.- Cromatografía en columna de Sephadex
  - 10.3.- Resinas de intercambio iónico
- 11.- Técnicas cromatográficas
  - 11.1.- Cromatografía en capa fina
  - 11.2.- Cromatografía en papel
  - 11.3.- Cromatografía de pH



- 12.- Técnicas electroforéticas
  - 12.1.- Electroforesis en papel
  - 12.2.- Electroforesis de pH
- 13.- Técnicas espectroscópicas
  - 13.1.- Espectroscopía de Ultravioleta-Visible
  - 13.2.- Espectroscopía de Infrarrojo
- 14.- Características Fisico-Químicas
  - 14.1.- Estabilidad
  - 14.2.- Solubilidad
  - 14.3.- Análisis elemental
  - 14.4.- Reacciones coloreadas
- 15.- Características biológicas
  - 15.1.- Espectro antimicrobiano y CMI
  - 15.2.- Modo de acción y CMB
- 16.- Experimentos en animales
  - 16.1.- Toxicidad aguda y DL-50
  - 16.2.- Efectividad del antibiótico "in vivo"

## RESULTADOS

- 1.- Aislamiento del microorganismo productor
  - 1.1.- Origen de la muestra
  - 1.2.- Identificación del microorganismo productor
  - 1.3.- Conservación y viabilidad de la cepa productora
- 2.- Producción en medio sólido
- 3.- Medios de cultivo
  - 3.1.- Medios de aislamiento y conservación
  - 3.2.- Medios de producción
  - 3.3.- Medios de revelado
- 4.- Curva de crecimiento del microorganismo TM-4
- 5.- Optimización de las condiciones de producción

- 5.1.- Tamaño de inóculo
  - 5.1.1.- Microorganismo productor TM-4
  - 5.1.2.- Microorganismos testigo
- 5.2.- Tiempo de incubación
- 5.3.- Modalidad de cultivo
- 5.4.- Temperatura de incubación
- 5.5.- pH del medio
- 5.6.- Tiempo de predifusión
- 5.7.- Composición del medio de cultivo
  - 5.7.1.- Concentración de glucosa
  - 5.7.2.- Otras fuentes de carbono
  - 5.7.3.- Concentración de peptona
  - 5.7.4.- Otras fuentes de nitrógeno
  - 5.7.5.- Iones metálicos
- 6.- Condiciones standarizadas
- 7.- Ensayos de extracción
  - 7.1.- Extracción a partir del medio de cultivo
  - 7.2.- Extracción a partir de las células
- 8.- Ensayos de purificación
  - 8.1.- Diálisis
  - 8.2.- Cromatografía en columna de Sephadex
  - 8.3.- Resinas de intercambio iónico
- 9.- Esquema de extracción y purificación
- 10.- Técnicas cromatográficas
  - 10.1.- Cromatografía en capa fina
  - 10.2.- Cromatografía en papel
  - 10.3.- Cromatografía de pH
- 11.- Técnicas electroforéticas
- 12.- Técnicas espectrofotométricas
  - 12.1.- Espectroscopía de Ultravioleta-Visible
  - 12.2.- Espectroscopía Infrarroja

13.- Características fisico-químicas

13.1.- Estabilidad

13.2.- Solubilidad

13.3.- Análisis elemental

13.4.- Reacciones coloreadas

14.- Características biológicas

14.1.- Espectro antimicrobiano y CMI

14.2.- Modo de acción y CMB

15.- Experimentos en animales

15.1.- Toxicidad aguda y DL-50

15.2.- Efectividad del antibiótico "in vivo"

DISCUSION

CONCLUSIONES

BIBLIOGRAFIA

7

OBJETO DEL TRABAJO

A pesar de la intensa investigación sobre antimicrobianos llevada a cabo durante más de 50 años, hoy día se siguen buscando nuevos antibióticos. La razón fundamental por la que se continúa la investigación en este campo es la aparición de resistencia a los antibióticos en los microorganismos que originalmente eran sensibles a los mismos. Dicha resistencia se puede producir por procesos de transferencia y manipulaciones genéticas o por una continua exposición de los microorganismos a los antimicrobianos. Como quiera que en estas investigaciones existe una gran probabilidad de encontrar antibióticos que pertenezcan a grupos conocidos, centramos nuestra investigación en zonas que han sido poco estudiadas desde el punto de vista microbiológico y pudieran, por ello, aportar nuevas especies y antimicrobianos diferentes a los conocidos.

La zona de "Las Madres", comprendida dentro de los límites de la Reserva Biológica de Doñana, constituye un habitat apropiado para ser objeto de nuestras in-

vestigaciones y, aunque dicha zona ha sido estudiada - desde distintos puntos de vista (GARCIA NOVO, 1977 ;GONZALEZ BERNALDEZ y col.,1977), todavía no existen estudios detallados sobre los aspectos microbiológicos.

Dada la naturaleza virgen de estos suelos, se pensó en la posibilidad de encontrar microorganismos autóctonos, que bien fuesen taxonómicamente diferentes a los descritos como productores, o bien produjesen antimicrobianos de distinta naturaleza.

Seleccionado el microorganismo, ha sido objeto de nuestra investigación establecer las condiciones óptimas de producción, así como los factores que afectan a la misma. Este trabajo se completa con el estudio del antimicrobiano, previa obtención, purificación y parcial caracterización, finalizando con un estudio farmacológico acerca de la toxicidad y efectos terapéuticos en animales de laboratorio previamente infectados.

## INTRODUCCION

El dominio de las enfermedades humanas ha tenido un gran avance con el desarrollo de las ciencias quimioterapéuticas, basadas en el conocimiento de los agentes etiológicos de las enfermedades infecciosas (BURKHOLDER, 1959 ; MILLER, 1971). En este sentido, Paul Ehrlich y Louis Pasteur relacionan el antagonismo bacteriano con la etiología de determinadas enfermedades. Sin embargo, el gran avance de la quimioterapia se debe a Alexander Fleming en 1929 por el descubrimiento de la penicilina y a la aparición de antibióticos de amplio espectro (BULOCK, 1961).

A esta época se remonta la primera definición de antibiótico como sustancia química de origen microbiano que tiene la capacidad de inhibir el crecimiento e incluso destruir microorganismos, aún en bajas concentraciones (BURKHOLDER, 1959 ; WAKSMAN, 1961 ; WAKSMAN, 1969; BERDY, 1974).

La historia de investigación sobre antibióticos se divide en tres periodos. El primero de ellos se caracteriza por un lento acúmulo de observaciones básicas ; el segundo representa para la investigación anti -



biótica su consolidación definitiva, ya que constituye la etapa de rápidos y espectaculares avances y es en el tercer período donde se orientan las líneas de investigación, lográndose una conexión entre los proyectos de trabajo y determinados problemas de incidencia social -- (BERDY, 1974 ; ZAHNER, 1974 ; GOTTLIEB, 1976 ; ZAHNER , 1977 ; WAKSMAN, 1969).

A lo largo de la bibliografía consultada aparecen varias hipótesis para intentar explicar la razón por la que los microorganismos producen antibióticos. En este sentido, BURKHOLDER (1959) y MARTIN y DEMAINE (1980) proponen la producción de antibióticos como respuesta a un factor competitivo existente en la propia naturaleza. Esta idea está apoyada por el descubrimiento de los factores que transfieren la resistencia, quizás como defensa contra la acción antibiótica (WEINBERG, 1970 ; DEMAINE, 1974 ; MARTIN y DEMAINE, 1980). Por otra parte, BU'LOCK (1961) sugiere que la síntesis de antibióticos es una medida para mantener la maquinaria celular cuando las células no pueden crecer por condiciones desfavorables. La hipótesis postulada por Woodruff en 1966 y extendida por WEINBERG (1971) y DEMAINE, (1974) propone la síntesis de antibióticos como un mecanismo necesario para evitar la muerte celular por crecimiento desequilibrado y así, una superproducción de metabolitos primarios puede traer con

sigo la síntesis de antibióticos, manteniendo la supervivencia del cultivo. Una variación de la hipótesis anterior sugiere que en aquellos estados en donde se acumulan sustancias tóxicas, el microorganismo puede responder convirtiéndola en antibiótico no tóxico para el microorganismo productor . Así mismo, QUEENER y col. (1978) y MARTIN y DEMAIN (1980) consideran a los antibióticos como errores congénitos del metabolismo, que formados por accidentes biológicos no aportan beneficio directo a las células.

Las fuentes de antibióticos las constituyen fundamentalmente microorganismos pertenecientes a las familias *Aspergillaceae*, *Actinomicetaceae* y *Bacillaceae* y en menor cuantía la familia *Pseudomonadaceae*. Así mismo, es el suelo rico en materia orgánica, el habitat natural para favorecer la supervivencia de estos microorganismos que pueden dar lugar a la producción de antibióticos.

Con el descubrimiento de los primeros antibióticos se ha abierto un nuevo campo aparentemente ilimitado a la Microbiología Industrial. El estudio del metabolismo adquiere una gran importancia en el conocimiento de la biología microbiana y en este sentido numerosos autores (BU'LOCK, 1961 ; WEINBERG, 1970 ; WEINBERG, 1971 ; DEMAIN, 1972 ; DEMAIN, 1974 ; WEINBERG, 1974 ; DREWS y DE

MAIN, 1977 ; HOWOOD y MERRICK, 1977 ; MARTIN, 1977 ; -- QUEENER y col., 1978 ; MARTIN y DEMAIN, 1980). han abordado este tema desde distintos puntos de vista.

El metabolismo primario, caracterizado por la formación de determinados compuestos esenciales a los que se denominan metabolitos primarios, ejerce un papel fundamental en las funciones biológicas y estructurales de los microorganismos productores. De aquí se deriva la gran especificidad biosintética de dichos metabolitos, así como el hecho de que normalmente no se acumulen. Por otra parte, el metabolismo secundario origina una serie de compuestos llamados metabolitos secundarios o idiolitos, cuyas funciones no actúan sobre el desarrollo y reproducción del microorganismo productor. Tales compuestos, de baja especificidad biosintética, no parecen ser esenciales y normalmente se acumulan jugando un papel secundario (BU'LOCK, 1961 ; DREWS y DEMAIN, 1977 ; MARTIN y DEMAIN, 1980).

Numerosos autores citados en la bibliografía (BU'LOCK, 1961 ; WEINBERG, 1970 ; DEMAIN, 1972 ; WEINBERG 1974 ; QUEENER y col., 1978 ; MARTIN y DEMAIN, 1980) estudian la cinética del metabolismo secundario, apareciendo una gran variedad de criterios respecto a la misma. Hay autores que observan la producción de idiolitos durante la fase estacionaria de crecimiento, mientras que WEIN -

BERG (1970) define los pseudometabolitos secundarios como aquellos compuestos que comienzan a formarse durante la última etapa de la tropofase, quizás debido a ciertas células que han dejado de dividirse.

Cuando declina el metabolismo primario se producen ciertos enzimas sintetasa, probablemente como resultado de inducción o de represión, que actúan catalizando la transformación de metabolitos primarios en secundarios y, aunque el período de producción varíe según el microorganismo y el medio de cultivo, la duración del metabolismo secundario es aproximadamente la mitad del período necesario para alcanzar la tropofase (WEINBERG, 1970 ; MARTIN y DEMAIN, 1980).

El cese de la producción de metabolitos secundarios puede ser debido a un efecto feed-back o a un descenso bien de los enzimas específicos o bien de los precursores de dichos metabolitos.

Por lo que respecta a la localización de metabolitos, se ha observado que en la mayoría de los casos se excretan al medio de cultivo, aunque también pueden quedar retenidos en el interior de la célula.

Existen diferentes mecanismos de regulación del metabolismo secundario y así se estudia la inducción por sustratos, regulación feed-back, regulación por catabolitos y por carga energética (FLOSS y col., 1978; DEMAIN, 1972)

El reconocimiento de las notables propiedades antimicrobianas, así como el uso práctico de los antibióticos producidos por el género *Pseudomonas* es bastante anterior a la llamada "Edad de Oro" de los antibióticos (WAKSMAN, 1969). Efectivamente, en 1899 apareció la primera información sobre la existencia de una sustancia que se encontraba presente en los cultivos líquidos libres de células de *Pseudomonas aeruginosa* y se mostraba eficaz contra distintos tipos de bacterias. Dicha sustancia activa fue denominada piocianasa debido a sus propiedades enzimáticas y fue utilizada durante las dos primeras décadas del presente siglo en la terapia de la difteria, influenza y meningitis. Estos estudios y descubrimientos previos culminaron con los trabajos de Hays y colaboradores sobre los piocompuestos.

Hacia mitad de siglo eran ya unas 50 las sustancias antibióticas producidas por diversas especies de -- (ARIMA y col., 1964 ; BERDY, 1974). No obstante, solo dos de ellas, la piocianina y el pirrolnitrin, fueron producidas industrialmente y llegaron a comercializarse.

Son numerosos los autores que en la actualidad dirigen sus investigaciones a aclarar el significado de las especies del género *Pseudomonas* como productoras de metabolitos secundarios y en particular de sustancias an

tibióticas. Las especies de este género constituyen el mayor grupo de microorganismos no diferenciados productores de antibióticos. Su falta de diferenciación fisiológica y citológica posibilita estudiar el efecto de diversos factores que inciden sobre el metabolismo secundario sin riesgos de interferencia con los ciclos de desarrollo genéticamente programados. Es por este motivo que los estudios de ciertos aspectos del metabolismo secundario del género *Pseudomonas* ofrecen ventajas experimentales sobre otras fuentes tradicionales de sustancias antimicrobianas.

Las especies de *Pseudomonas* más intensamente estudiadas en este sentido son : *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas reptilivora*, *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas chlororaphis*, *Pseudomonas aureofaciens*, *Pseudomonas cichorii* y *Pseudomonas syringae*.

NOJIRI y col. (1975) aisló un compuesto efectivo contra bacterias gram (+) a partir de un cultivo de *Pseudomonas* al que denominó BN-165. EVANS y col (1976) también aisla un compuesto denominado B-371 de *Pseudomonas* que resultó tener propiedades antimicrobianas de amplio espectro y cuya estructura química correspondía a la de un isoleacriloisocianitrilo. FLOSS y col.(1977) investigaron sobre la producción de pirrolnitrin por diferentes especies de *Pseudomonas* .

MARTINEZ-MOLINA y colaboradores (1979) trabajando con *Pseudomonas reptilivora* observaron la capacidad de este microorganismo para producir sustancias antimicrobianas de amplio espectro. El estudio de la producción de esta sustancia bajo condiciones definidas de cultivo, mostró que su biosíntesis depende de la presencia de un fago atenuado sensible a la temperatura, por lo que la producción del antibiótico se perdía tras la inducción fagica. Así mismo, KONDO y col. (1979) aislaron un nuevo antibiótico, bactobolin relacionado estructuralmente con el actinobolin producido por *Streptomyces griseoviridis*. El nuevo antibiótico se mostró eficaz contra bacterias gram (+) y gram (-).

En cuanto a las estructuras químicas de los antibióticos producidos por el género *Pseudomonas*, hay que señalar que cubren un área restringida si se compara con la enorme variedad de los producidos por hongos microscópicos y por actinomicetos. Así, entre las sustancias antimicrobianas producidas por las distintas especies del género *Pseudomonas* no se han detectado macrólidos, aminoglucósidos, polienos, heterociclos oxigenados ni antibióticos alicíclicos, sustancias repetidamente producidas por los citados grupos; pero sí se recogen algunos aminoácidos, peptidos, lípidos y compuestos alifáticos, la inmensa mayoría, como las fenacinas, piocompuestos, pi-

rronitrin y ciertos derivados indólicos pertenecientes al grupo de los heterociclos nitrógenados. Tales sustancias provienen de intermediarios o productos finales de las rutas de biosíntesis de los aminoácidos aromáticos - (LEISINGER y MARGRAFF, 1979)..

Con el nombre de "piocinas" se conocen las bacteriocinas producidas por *Pseudomonas aeruginosa*. Tales sustancias son de naturaleza proteica y bajo peso molecular y son activas contra varias cepas de *Pseudomonas aeruginosa* distintas de la productora.

La producción de piocinas es inducible por radiación ultravioleta, al igual que ocurre con determinados bacteriofagos lisogénicos. En algunos casos ocurre una lisis de los cultivos irradiados por luz ultravioleta después de un característico período de latencia y una liberación de grandes cantidades de piocina. No obstante esta lisis no es un paso obligatorio en la producción - (PATERSON, 1964). En este sentido, numerosos autores (PATERSON, 1964 ; GOVAN, 1968 ; TAKEYA y col., 1969 ; ITO y col., 1970 ; GOVAN, 1974 ; KURODA y KAGEYAMA, 1979 ; CUPPELS y col., 1978 ; KURODA y KAGEYAMA, 1981) han abordado el tema de las piocinas desde distintos puntos de vista con la idea de conocer su mecanismo de acción, así como su estructura.



La explosión de la genética microbiana durante los últimos 30 años ha coincidido con el espectacular aumento en la producción de antibióticos y, aunque los estudios bioquímicos han ayudado a conocer la síntesis de muchos antibióticos, los procesos de ingeniería genética han dado lugar a grandes avances en el campo de la bio - síntesis, así como en la búsqueda de nuevos antibióticos (HOPWOOD y MERRICK, 1977 ; ZAHNER, 1977). En este sentido, se ha comprobado que modificaciones genéticas y nutricionales pueden hacer variar el momento de producción del - antibiótico en relación con la fase de crecimiento de su microorganismo productor (DEMAIN, 1972 ). Igualmente se observa que los genes que contienen la información genética para la biosíntesis del antibiótico pueden ser crosomómicos y también extracromosómicos, en cuyo caso se - localizan en plásmidos (HOPWOOD y MERRICK, 1977 ; HOPWOOD 1978 ; QUEENER y col., 1978 ; MARTIN y DEMAIN, 1980).

Un fenómeno importante a tener en cuenta es la aparición de resistencias al antibiótico, bien por su -- propio microorganismo productor o por otros microorganismos que originalmente eran sensibles al mismo (DEMAIN, 1972; DEMAIN, 1974 ; ASENSIO y BAQUERO, 1982). De cualquier forma, ambos procesos están controlados genéticamente.

Es importante destacar que mediante la obten -

ción de mutantes auxotrofos se consiguen grandes avances en el conocimiento de la síntesis de antibióticos (DE -- MAIN, 1972 ; QUEENER y col.,1978). Así mismo, la obtención de mutantes puede ser beneficiosa para aumentar la correlación entre industria e investigación, ya que podría dar lugar a nuevos antibióticos o a una mejora en la producción, eliminando sustancias indeseables.

## MATERIAL Y METODOS

## 1.- AISLAMIENTO DEL MICROORGANISMO PRODUCTOR

### 1.1.- ORIGEN DE LAS MUESTRAS

Las muestras objeto de nuestro trabajo proceden de suelos virgen de la Reserva Biológica de Doñana. En todas ellas se investiga la presencia de bacterias productoras de sustancias antimicrobianas y el microorganismo seleccionado procede del lugar denominado "Las Madres".

### 1.2.- TOMA DE MUESTRAS

Se utiliza la barrena para perforar el terreno y conseguir muestras de suelo a distintas profundidades (superficie, 10 cm y 20 cm). La toma de muestras se lleva a cabo en diversas zonas sometidas a distintas condiciones ambientales, lo que nos lleva a suponer una variación en la flora microbiana.

El intervalo de tiempo entre la toma de muestra y la siembra de las mismas nunca fue superior a las 24 horas.

### 1.3.- TECNICA DE AISLAMIENTO

La técnica desarrollada para el aislamiento de microorganismos productores de sustancias antimicrobianas lleva consigo la realización de una serie de diluciones-suspensiones de las respectivas muestras del suelo que después van a constituir el material a sembrar en los correspondientes medios de cultivo selectivos. El proceso general seguido está basado en las técnicas recomendadas por ALLEN (1951), BURKHOLDER (1959), GALLARDO-LARA (1971), LAPAGE y col. (1970) y POCHON (1954); y consisten en pesar 10 g de suelo que se suspenden en 90 ml de solución salina estéril contenida en un matraz de 500ml. Esta mezcla se lleva a agitación durante 10 minutos para hacerla lo más homogénea posible. Sucesivamente y de la misma forma se realizan diluciones decimales hasta el límite deseado, disminuyendo el tiempo de agitación proporcionalmente a la dilución. Se siembran tres placas de cada dilución y se incuban a 28°C el tiempo necesario para conseguir una buena visualización de las colonias.

Para poner de manifiesto la actividad antimicrobiana, seguimos la técnica de la doble capa que se describe en el apartado 7.1. La capacidad de producción de sustancias activas se determina mediante la aparición de halos de inhibición.

Se aislan todas las colonias productoras y - se vuelve a probar su actividad con el fin de seleccionar la de mayor producción.

#### 1.4.- MICROORGANISMOS TESTIGO

Los microorganismos testigo empleados rutinariamente (ZAHNER, 1974) son :

- *Staphylococcus aureus* ATCC 25923
- *Bacillus subtilis* ATCC 6633
- *Escherichia coli* ATCC 25922
- *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 25619

#### 1.5.- CONSERVACION DEL MICROORGANISMO PRODUCTOR

La conservación de la bacteria seleccionada se llevó a cabo basándonos en distintas técnicas :

- Subcultivos seriados : Esta es la técnica tradicional de conservación de cultivos bacterianos y consiste en la simple transferencia periódica de las bacterias del medio de aislamiento seleccionado a un medio fresco, ya sea en "slant", picadura o líquido, guardándose después en cámara fría a 4°C.

Una variación de este método es crecer las -

bacterias en "slant" y añadir periódicamente pequeñas alíquotas del mismo medio, pero en estado líquido, consiguiéndose con ello una hidratación constante. Se mantiene en frigorífico a 4°C (BARJA, 1979 ; GHERNA, 1981; HILL, 1981).

- Inmersión en aceite mineral : Una vez crecida la bacteria en el medio apropiado, ya sea en "slant o picadura, se le añade aceite de parafina estéril hasta cubrir totalmente el medio, evitando así su desecación y reduciendo la actividad metabólica y el crecimiento bacteriano. Después se mantiene en cámara fría a 4°C (GHERNA, 1981).

- Congelación en leche descremada : La leche descremada (20%) se esteriliza a vapor fluente en pequeños viales, donde se inoculara la bacteria y se conserva a -10°C durante largos períodos de tiempo (LAPAGE y col., 1970)

- Una vez crecida la bacteria , se centrifuga y el sedimento se resuspende en una mezcla a partes iguales de solución salina y glicerol. Se conserva a -10°C (VEIGA, 1979).

## 2.- MEDIOS DE CULTIVO

### 2.1.- MEDIOS DE AISLAMIENTO Y CONSERVACION

- Agar nutritivo modificado (SMIBERT y KRIEG, 1981)
- Agar glucosado (SMIBERT y KRIEG, 1981)
- Czapeck-Dox (VERA y DUMOFF, 1974)
- Czapeck-Dox glucosado (VERA y DUMOFF, 1974)
- Leche descremada (LAPAGE y col., 1970)

### 2.2.- MEDIOS DE PRODUCCION

- Caldo nutritivo modificado (NB) (SMIBERT y KRIEG, 1981)
- Caldo glucosado (GB) (SMIBERT y KRIEG, 1981)
- Medio YG modificado (PREVOT, 1966)

Extracto de levadura.....	0,50 g
Glucosa .....	1,00 g
Cisteina .....	0,05 g
Agua destilada .....	100 ml

Ajustar el pH a 6,5



- Medio de Egawa (EGAWA y col. 1970)

Sacarosa .....	1,20 g
Harina de semilla de soja ....	3,00 g
$\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ .....	0,20 g
$\text{CO}_3\text{Ca}$ .....	0,20 g
$\text{SO}_4\text{Cu}$ .....	0,75 mg
Agua destilada .....	100 ml

Ajustar el pH a 6,5

- Medio CG (ARIAS y col., 1976)

$\text{PO}_4\text{HK}_2$ .....	0,20 g
$\text{ClNa}$ .....	0,10 g
$\text{SO}_4\text{Mg} \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ .....	0,01 g
$\text{CL}_2\text{Ca}$ cristalizado .....	1,00 mg
$\text{SO}_4\text{Mn}$ .....	0,10 mg
Citrato férrico .....	0,30 mg
Casitona .....	0,50 g
Asparagina .....	0,25 g
Glucosa .....	1,00 g
Agua destilada .....	100 ml

Ajustar el pH a 6,5

- Medio de antibiótico nº 1 (MA-1) (ARIAS y col., 1979)

Peptona .....	0,60 g
Triptona .....	0,40 g
Extracto de levadura .....	0,30 g
Extracto de carne .....	0,15 g

Glucosa ..... 0,10 g

Agua destilada ..... 100 ml

Ajustar el pH a 6,5

-Medio de antibiótico nº 2 (MAH2) (ARIAS y col., 1979):

Peptona ..... 0,60 g

Extracto de levadura ..... 0,30 g

Extracto de carne ..... 0,15 g

Agua destilada ..... 100 ml

Ajustar el pH a 6,5

- Medio M-1 (MARTINEZ y col., 1976):

$\text{SO}_4\text{Mg} \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$  ..... 0,03 g

$\text{PO}_4\text{HK}_2 \cdot 3 \text{H}_2\text{O}$  ..... 0,03 g

$\text{NO}_3\text{NH}_4$  ..... 0,10 g

Malato sódico ..... 1,00 g

Agua destilada ..... 100 ml

Ajustar el pH a 6,5

- Medio M-2 (MARTINEZ y col., 1976) :

$\text{SO}_4\text{Mg} \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$  ..... 0,03 g

$\text{PO}_4\text{HK}_2 \cdot 3 \text{H}_2\text{O}$  ..... 0,03 g

Peptona ..... 0,10 g

Agua destilada ..... 100 ml

Ajustar el pH a 6,5

-Medio M-3 : Es el medio M-2 adicionado sulfato cúprico

(1 ppm de  $\text{Cu}^{++}$ )

- Medio M-4 (EVANS y col.,1976)

Harina de semilla de soja.....	2,9 g
Glicerol .....	1,0 g
$PO_4HK_2$ .....	0,1 g
Agua destilada .....	100 ml

Ajustar el pH a 6,5

- Medio M-5 (AMANO y col.,1980)

Harina de semilla de soja.....	2,0 g
Glucosa .....	1,5 g
Glicerol .....	1,5 g
$SO_4Na_2$ .....	0,4 g
$CO_3Ca$ .....	0,2 g
Agua destilada .....	100 ml

Ajustar el pH a 7,0

- Medio M-6 (SUZUKI y col.,1977)

Caseina .....	0,8 g
Glicerol .....	0,8 g
ClNa .....	0,2 g
Agua destilada .....	100 ml

Ajustar el pH a 7,0

- Medio M-7 (MIDORIKAWA y col.,1976)

Extracto de carne .....	0,7 g
Peptona .....	1,0 g
Glicerol .....	1,5 g

ClNa ..... 0,3 g  
Agua destilada ..... 100 ml  
Ajustar el pH a 6,0

### 2.3.- MEDIOS DE REVELADO

Para las pruebas de susceptibilidad se han estudiado distintos medios a fin de seleccionar el que proporcione mejores resultados (NOTO y col., 1982) :

- Medio de agar glucosado (SMIBERT y KRIEG , 1981)
- Medio de Mueller-Hinton (THORNSBERRY, 1976).

### 3.- PRODUCCION EN MEDIO SOLIDO

Como paso previo se ha realizado un estudio - en medio sólido, que a nivel cualitativo nos orienta sobre determinados aspectos de la producción. Para ello se siguen dos técnicas diferentes que a continuación se indican.

#### 3.1.- TECNICA DE ACUMULOS POR ASA CALIBRADA

Una vez comprobado el crecimiento del microorganismo productor y los microorganismos testigo en los medios seleccionados, se siembra la bacteria productora y se incuba a 28°C el tiempo necesario para conseguir un crecimiento abundante.

Se utiliza la técnica de STEERS y col.(1959) modificada . Consiste en preparar una suspensión densa de la bacteria productora en solución salina estéril y se depositan acúmulos de la suspensión mediante asa calibrada en el medio seleccionado para la producción. Al mismo tiempo se estudia el número de células por asa. Se

## 5.- CURVA DE CRECIMIENTO DEL MICROORGANISMO PRODUCTOR

La curva de crecimiento se realiza en condiciones de cultivo estático a 37°C y en matraces que contienen 100 ml de medio de cultivo. La preparación del inóculo se lleva a cabo en las condiciones standarizadas (Apto. 6.1), lo que proporciona  $4,4 \times 10^4$  células/ml del cultivo en estudio.

El crecimiento bacteriano se estima periódicamente mediante determinaciones espectrofotométricas en Bausch & Land Spectronic-20, midiendo Densidad Óptica (D.O.) a 480 nm. Como blanco se utiliza el mismo medio de cultivo sin inocular. En cada medida se toman muestras para determinar el número de células viables mediante diluciones y posterior recuento en placa.

incuba a 28°C durante 1 a 7 días, comprobándose la actividad cada 24 horas mediante la técnica de la doble - capa (Aptdo. 7.1).

### 3.2.- TECNICA DE BLOQUES POR DIFUSION EN AGAR

Se prepara una suspensión bacteriana densa de número de células conocido, a partir de la cual se siembran placas que, después de incubadas a 28°C durante 1 a 7 días, proporcionan cespel bacteriano. Mediante tala drador estéril se extraen bloques de agar con dicho ces ped. Se colocan en la superficie de placas previamente sembradas con los microorganismos testigo y se incuban a 37°C tras un período de predifusión a 4°C. (CAMPBEL , 1960). La actividad antimicrobiana se determina mediante la aparición de halos de inhibición.

#### 4.- PRODUCCION EN MEDIO LIQUIDO

Una vez comprobada la actividad en medio sólido, todas las determinaciones posteriores se realizan en medio líquido. Se ensayan diferentes sistemas que ya continuación se describen.

##### 4.1.- ESTATICO

Para los cultivos estáticos se utilizan matraces de 250 ml de capacidad, conteniendo 100 ml de medio de cultivo. La incubación se realiza a 28°C durante 1 a 15 días, cuantificando la actividad antimicrobiana cada 24 horas a fin de determinar el tiempo óptimo de producción.

##### 4.2.- AGITACION

Los cultivos en agitación se realizan en un agitador orbital (Lab-Line Instrument, Inc., Melrose Park, I,11 USA) a 200 rpm, utilizando matraces de 250 ml, que



contienen 100 ml de medio de cultivo. El período de incubación a 28°C fué de 1 a 15 días, para estudiar el tiempo óptimo de producción del antibiótico por valoración de la actividad cada 24 horas y establecer diferencias según la modalidad del cultivo.

#### 4.3.- AIREACION

Para los cultivos sometidos a aireación se usan matraces de 250 ml que contienen 100 ml de medio de cultivo. Dichos cultivos se someten a aireación, que se consigue mediante bombeo de aire estéril. El sistema así preparado se incubaba a 28°C durante 1 a 15 días, de terminando la actividad cada 24 horas (ARIAS y col., 1976; DREWS, 1981 ; VOLLBRECHT, 1982a ; VOLLBRECHT 1982b).

### 6.1.2.- MICROORGANISMOS TESTIGO

Se estudia la influencia que ejerce el tamaño de inóculo de los microorganismos testigo sobre la actividad de la sustancia antibiótica. Para ello, se realizan antibiogramas utilizando distintos números de células de :

- *Staphylococcus aureus* :  $6,3 \times 10^4$  cel/ml,  $5,0 \times 10^6$  cel/ml  
 $6,0 \times 10^7$  cel/ml y  $3,7 \times 10^8$  cel/ml

- *Bacillus subtilis* :  $4,7 \times 10^4$  cel/ml ,  $1,5 \times 10^5$  cel/ml -  
 $2,0 \times 10^7$  cel/ml,  $1,4 \times 10^8$  cel/ml

- *Escherichia coli* :  $2,5 \times 10^4$  cel/ml ,  $4,7 \times 10^6$  cel/ml, -  
 $5,5 \times 10^8$  cel/ml y  $4,7 \times 10^9$  cel/ml

- *Pseudomonas aeruginosa*  $3,7 \times 10^4$  cel/ml,  $5,2 \times 10^6$  cel/ml  
 $4,7 \times 10^8$  cel/ml y  $2,5 \times 10^9$  cel/ml .

Comprobada la posible influencia que pueda ejercer sobre la actividad antimicrobiana se procede a standarizar dicho inóculo. A partir de cultivos en medio sólido de 24 horas, se transfiere una colonia a caldo glucosado y se incuba a  $37^\circ\text{C}$  hasta conseguir una D.O. a 480 nm de 0,5. También se realiza la transferencia de

medio líquido a líquido, pero en ambos casos, el inóculo siempre fué de 0,1 ml de cultivo (D.O.a 480nm 0,5), lo que proporciona del orden de  $10^6$  células.

## 6.2.- TIEMPO DE INCUBACION

Con el fin de determinar el tiempo de incubación en el que se alcanza un máximo de actividad, así como la evolución de la misma, se relizan experimentos en los que el microorganismo productor es cultivado, tanto en medio sólido como en medio líquido, a lo largo de un período de 1 a 30 días. Se determina la actividad antibiótica a intervalos regulares de tiempo, mediante la técnica adecuada (ARIAS y col.,1976 ; BEAUDET y col., - 1982 ).

## 6.3.- MODALIDAD DEL CULTIVO

En el experimento del tiempo de incubación, el microorganismo productor se cultiva simultaneamente bajo las tres modalidades de cultivo (Aptdo. 4) a lo largo del tiempo al objeto de comprobar las diferencias existentes y seleccionar aquella que proporcione mejores resultados (ARIAS y col.,1976 ; DEL RIO y col.,1972a).

## 6.- OPTIMIZACION DE LAS CONDICIONES DE PRODUCCION

### 6.1.- TAMAÑO DE INOCULO

#### 6.1.1.- MICROORGANISMO PRODUCTOR

Para determinar si el número de células del inóculo utilizado influye cuantitativamente sobre la producción de la sustancia antimicrobiana, hemos realizado una serie de experimentos utilizando los siguientes tamaños de inóculo :  $1,2 \times 10^5$  cel/ml,  $2,4 \times 10^4$  células/ml ,  $1,2 \times 10^4$  cel/ml,  $2,4 \times 10^3$  cel/ml,  $2,4 \times 10^2$  cel/ml,  $2,4 \times 10$  células/ml de medio de cultivo (HURLEY y BIALEK, 1974 ; LA FERRIERE y col., 1983 ; MINAGAWA y col., 1983 ; NORRBY y JONSSON, 1983 ; NOTO y col., 1982).

El inóculo standard procede de un cultivo sólido de 24 horas, a partir del cual se obtiene una suspensión bacteriana en el medio de producción elegido de una D.O. a 480 nm de 0,3 ( $2,4 \times 10^6$  cel/ml). La proporción de inóculo del microorganismo productor fue siempre del 2% V/V ( $4,8 \times 10^4$  cel/ml).

#### 6.4.- TEMPERATURA DE INCUBACION

Se realizan estudios a distintas temperaturas de incubación (20°C, 28°C y 37°C) con el fin de determinar la temperatura óptima de producción de la sustancia antimicrobiana a lo largo del tiempo (ARIAS y col.,1976; BEAUDET y col.,1982 y WEIMBERG, 1974).

#### 6.5.- pH DEL MEDIO

Una vez seleccionado el medio de producción - se realizan estudios a distintos pH iniciales (2,0-3,0 5,0-6,5-7,5-9,0), observándose el comportamiento del microorganismo productor en cuanto a crecimiento y producción. Se fija aquel pH que origine mayores rendimientos. Empleando las mismas condiciones hemos estudiado el efecto del pH controlado durante el período de incubación (Carbonato cálcico 0,5%) (ARIAS y col.,1979 ; BARJA, 1979 ; BEAUDET y col.,1982 ; EADY y col.,1983 ; MARTINEZ y col.,1979 ; MINAGAWA y col.,1983 ; NOTO y col., 1982 ; VENGLARCIK y col.,1983).

Las medidas de pH se realizan en un pHmetro - Crison, Mod. Digit 501, utilizando soluciones de HCl 1 N y NaOH 1 N para su ajuste.

#### 6.6.- TIEMPO DE PREDIFUSION

En la determinación de la actividad antimicrobiana por la técnica de discos, pocillos, bloques de agar y bioautografía (Aptdo. 7), se ha estudiado la posible influencia que pueda ejercer el tiempo de predifusión. Para ello, las placas se mantienen en frigorífico durante distintos períodos de tiempo (0, 1/4, 1/2, 1, 3, 6, 8, 12 y 24 horas) previo a la incubación; con el fin de conseguir una difusión de la sustancia antimicrobiana en el agar antes de que crezcan los microorganismos testigo (ARIAS y col., 1976).

#### 6.7.- COMPOSICION DEL MEDIO DE CULTIVO

El establecimiento de una composición adecuada del medio de producción para obtener los máximos rendimientos, se ha abordado ensayando diversos sustratos: Fuente de carbono, fuente de nitrógeno e iones metálicos. Se varía cada uno de ellos y se mantiene constante el resto de los componentes. De esta forma se han obtenido los primeros datos que permiten ir perfilando la composición del medio, asociando los componentes más efectivos y económicos entre los ensayados.

### 6.7.1.- EFFECTO DE LA CONCENTRACION DE GLUCOSA

La concentración de glucosa ejerce un importante efecto tanto sobre el crecimiento como sobre el nivel de formación del antibiótico. Por ello, se considera conveniente comprobar la influencia de la adición de glucosa, a diferentes concentraciones, sobre la producción del antimicrobiano. Se realizan una serie de experimentos - en los que se determina la actividad antibiótica de los sobrenadantes de cultivo adicionados con 0,0%, 0,2%, 0,5%, 1,0%, 1,5% y 2,0% de glucosa, manteniéndose constantes el resto de los componentes del medio (ARIAS y col., 1979 ; EADY y col., 1983 ; HAAVIK, 1974a; HURLEY y BIALEK, 1974; VEIGA, 1979 ; BARUA y SHELEF, 1980).

Así mismo, se estudia el efecto de la glucosa al añadir carbonato cálcico (0,5%) al medio de cultivo, que actuaría neutralizando los ácidos procedentes de la fermentación del azúcar (MARTINEZ y OLIVARES, 1979).

### 6.7.2.- OTRAS FUENTES DE CARBONO

Demostrado el efecto inhibitorio de la glucosa sobre la producción de la sustancia antimicrobiana, se creyó conveniente, manteniendo las mismas condiciones - que en el apartado anterior, sustituir la glucosa por - otras fuentes de carbono. Entre ellas se incluyen dos -

monosacáridos (Fructosa y D-Manitol), dos disacáridos - (Lactosa y sacarosa), un polisacárido (Almidón), Acetato sódico, Citrato sódico y Malato sódico.

En todos los casos, la concentración utilizada fue la seleccionada para el caso de la glucosa (HURLEY y BIALEK, 1974 ; DREWS y DEMAIN, 1977).

#### 6.7.3.- EFEECTO DE LA CONCENTRACION DE PEPTONA

Se estudia el efecto de la concentración de peptona como fuente de nitrógeno orgánico, manteniéndose constante el resto de los componentes del medio de cultivo. Las cantidades de peptona fueron 0,1%, 0,2% , 0,5%, 1,0% y 2,0%.

#### 6.7.4.- OTRAS FUENTES DE NITROGENO

Aunque la fuente de nitrógeno presenta una menor influencia sobre la producción del antibiótico (MARTIN y DEMAIN, 1980), hemos realizado estudios con fuentes de nitrógeno complejas, tales como extracto de levadura, harina de semilla de soja y peptona. La concentración utilizada fue la que previamente habíamos seleccionado para el caso de la peptona.



### 6.7.5.- EFFECTO DE LOS IONES METALICOS

Se estudia el efecto de los iones  $\text{Ca}^{++}$ ,  $\text{Cu}^{++}$ ,  $\text{Fe}^{++}$ ,  $\text{Fe}^{+++}$ ,  $\text{Mg}^{++}$ ,  $\text{Mn}^{++}$  y  $\text{Zn}^{++}$  en forma de las sales que se incluyen a continuación y a la concentración porcentual final indicada :

$\text{Cl}_2\text{Ca}$ .....	0,00027%
$\text{SO}_4\text{Cu} \times 5 \text{H}_2\text{O}$ .....	0,00039%
$\text{SO}_4\text{Fe}$ .....	0,00027%
$\text{Cl}_3\text{Fe} \times 6 \text{H}_2\text{O}$ .....	0,00048%
$\text{SO}_4\text{Mg} \times 7 \text{H}_2\text{O}$ .....	0,00101%
$\text{SO}_4\text{Mn} \times \text{H}_2\text{O}$ .....	0,00030%
$\text{Cl}_2\text{Zn}$ .....	0,00021%

Dicha concentración está calculada para que contenga 1 ppm del ion (MARTINEZ y col.,1976; YOEWELL y WHITE, 1982 ; ZURAVLEFF y col.,1982; DEITCH y col.,1983).

El ion cobre ha sido objeto de un estudio especial, añadiendo distintas concentraciones (0,12 ppm, 0,25 ppm, 0,50 ppm, 1,00 ppm, 1,25 ppm, 1,50 ppm, 2,00 ppm y 2,50 ppm) para seleccionar aquella que proporcione mejores resultados (MARTINEZ y col.,1976).

## 7.- ENSAYOS DE ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA

La actividad antimicrobiana se determina mediante la aparición de halos de inhibición de crecimiento. En todos los casos, se mide el diámetro total y se expresa en milímetros (mm) (BROWN y KOTHARI, 1978<sub>a</sub> ; - BROWN y KOTHARI, 1978<sub>b</sub> ; KONEMAN y col., 1983)

### 7.1.- ANTAGONISMO BACTERIANO : METODO DE LA DOBLE CAPA

Una vez sembrado el microorganismo productor por la técnica de acúmulos con asa calibrada, se procede a la determinación de la actividad antimicrobiana por la técnica de la doble capa (BARRY, 1974). Consiste en mantener en estado de sobrefusión (45°C) tubos con agar blando (1 % de agar) e inocularlos con los microorganismos testigo. Una vez inoculados, se agitan suavemente y se vierten sobre placas donde ha crecido el microorganismo productor. Se dejan solidificar y se incuban de 12 a 18 horas a 37°C. Transcurrido este tiempo se lee el diámetro de los halos de inhibición. (ITO y col., 1970a).

## 7.2.- METODO DE LOS POCILLOS

Una vez confirmada la actividad por el método de la doble capa, se utiliza la técnica de los pocillos con el fin de detectar y cuantificar la producción de sustancias antimicrobianas excretadas al medio líquido por el microorganismo productor.

Se siembran placas en cespel con los microorganismos testigo y, mediante taladrador estéril, se hacen cuatro pocillos que se rellenan con 0,25 ml de la sustancia antimicrobiana. Se mantienen en frigorífico hasta que el líquido haya difundido totalmente a través del agar y posteriormente se incuban a 37°C durante 12-18 horas. Transcurrido dicho tiempo, se determina la actividad mediante halos de inhibición. Esta técnica puede realizarse analogamente utilizando pocillos metálicos depositados sobre las placas (ARIAS y col., 1976 ; MARTINEZ y col., 1976).

## 7.3.- METODO DE IMPREGNACION DE DISCOS

En la realización de este método se han mantenido constantes la cantidad y calidad del medio de cultivo, tiempo de predifusión, temperatura de incubación, concentración de inóculo y técnicas de siembra y

y lectura. Todas estas variantes influyen en el tamaño de halo y, por tanto, deben ser tenidas en cuenta -- (THORNSBERRY, 1976).

El método de difusión en agar por impregnación de discos (BAUER y KIRBY, 1966) es ampliamente utilizado para estudiar los aspectos, tanto cualitativos como cuantitativos, de la investigación de antimicrobianos. La técnica consiste en sembrar los microorganismos testigo sobre la superficie de placas con medio de cultivo adecuado. Seguidamente se procede a la colocación de los discos impregnados con la sustancia antimicrobiana. Para ello, se utiliza una pinza estéril con la que se presiona suavemente para asegurar un contacto firme entre el disco y el agar, cuidando de no moverlo una vez colocado en su lugar. Trás un período de predifusión, las placas se incuban a 37°C durante 12-18 horas; así, la sustancia antimicrobiana difunde desde el disco a la zona de alrededor, estableciendo un gradiente de concentración que dará lugar a un halo de inhibición. (ACAR, 1980; THRUPP, 1980).

#### 7.4.- BIOAUTOGRAFIA

Tanto en cromatografía en papel y capa fina como en electroforesis en papel, las sustancias bioló-

gicamente activas se detectan por bioautografía.

- Bioautografía-Papel :

En el caso de cromatografía y electroforesis en papel la técnica se realiza depositando las tiras del cromatograma o electroforegrama sobre la superficie del agar previamente sembrado en cespel con los microorganismos testigo. Para eliminar la fase móvil o tampón empleado durante el desarrollo, que podrían interferir en el crecimiento de los microorganismos testigo, dichas tiras se secan por evaporación.

Las zonas de inhibición presentes en el agar, después de la incubación a 37°C durante 12-18 horas, sirven de referencia para calcular los Rf cromatográficos de la sustancia antimicrobiana (ARIAS y col., 1979<sub>a</sub>; BARJA, 1979).

- Bioautografía-Placa :

Una vez desarrollada la cromatografía en capa fina, se depositan los cromatogramas secos en cajas de Petri estériles de 14 cm de diámetro. Posteriormente, se añade una capa con 50 ml de agar glucosado (45°C) inoculado con el microorganismo testigo y cuando solidifica se incuba a 37°C durante 12-18 horas. Los halos de inhibición se utilizan para calcular los Rf de la sustancia antimicrobiana (BARJA, 1979 ; KRIEG, 1981).

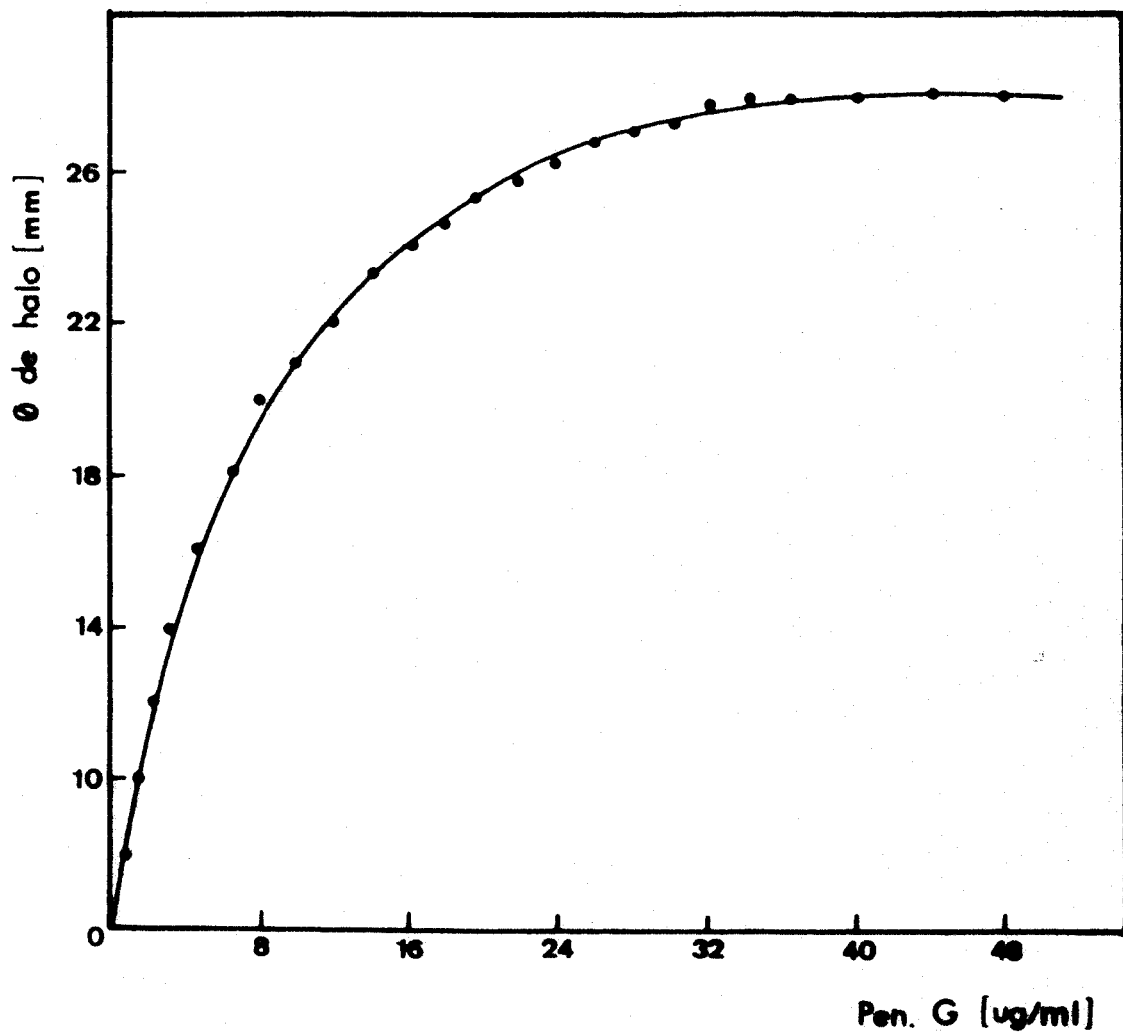
## 8.- CURVA PATRON DE PENICILINA-G

La actividad antibiótica se determina en relación a un antibiótico de referencia, Penicilina-G sódica (Bencil-Penicilina).

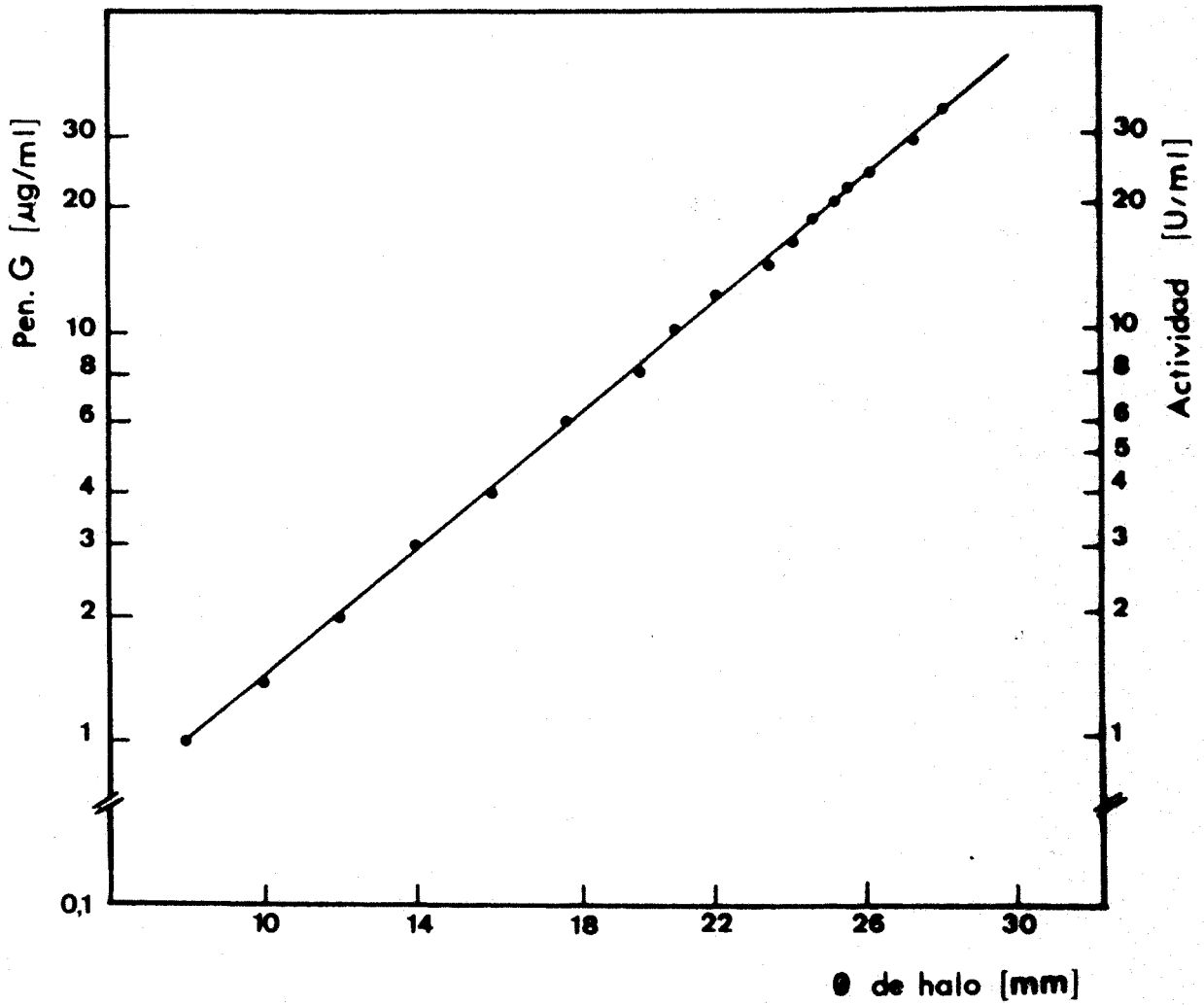
Se determina el halo de inhibición de concentraciones crecientes de Penicilina-G (1-30  $\mu\text{g/ml}$ ) en discos de 25  $\mu\text{l}$ . La zona de inhibición solo es directamente proporcional a la cantidad de antibiótico entre determinadas concentraciones (Gráfica 1).

La recta de calibrado se obtiene representando la concentración de Penicilina-G frente al diámetro de halo (Gráfica 2).

La unidad de antibiótico (U) se define para nuestro caso, como la cantidad de sustancia antimicrobiana que produce el mismo halo de inhibición, frente a *Staphylococcus aureus*, que 0,025  $\mu\text{g}$  de Penicilina-G -- (Gráfica 2).



GRAFICA 1.- Curva patrón de Penicilina-G



GRAFICA 2.- Recta de calibrado de Penicilina-G expresando la actividad antimicrobiana en Ø de halo y Unidad de antibiótico .



## 9.- ENSAYOS DE EXTRACCIÓN DEL ANTIMICROBIANO

### 9.1.- TECNICAS PRELIMINARES

En todos los experimentos de extracción de la sustancia antimicrobiana los caldos brutos activos, procedentes de cultivos del microorganismo productor (5 días de incubación), se someten a los siguientes procesos :

- Centrifugación (Centrífuga SORVAL, modelo OTD 50) a 15000 rpm durante 15 minutos con el fin de separar las células.
- Filtración a vacío (Sistema MILLIPORE) del sobrenadante, utilizando filtros de 0,45 micras de tamaño de poro para eliminar cualquier resto celular.
- Concentración a vacío (Rotavapor HEIDOLPH), a 80°C, del líquido filtrado hasta 1/10 del volumen inicial o hasta sequedad, según lo requiera la técnica.

Al resultado de estos tres procesos se le denomina "Extracto Bruto".

## 9.2.- EXTRACCION A PARTIR DEL MEDIO DE CULTIVO

Se lleva a cabo según la técnica convencional de extracción con disolventes orgánicos, que consiste en la agitación en embudo de decantación y separación de fases. El disolvente orgánico se elimina totalmente por evaporación a vacío en rotavapor a 80°C, y, una vez seco, se completa con agua hasta un volumen igual al de partida. (ARIAS y col., 1979<sub>a</sub>)

A las fases resultantes de la extracción, fase orgánica y fase acuosa, se les determina la actividad antimicrobiana por el método de impregnación de discos. Al mismo tiempo se determina el número óptimo de extracciones (1, 2 ó 3), la proporción V/V de solvente/caldo (1:1, 2:1, 1:2); así como el pH (3,0 - 6,0 - 9,0) para conseguir una recuperación cuantitativa.

Los disolventes orgánicos empleados en orden de polaridad son : Tetracloruro de carbono, cloroformo, benceno, eter etílico, eter de petróleo, acetato de etilo, alcohol amílico y n-butanol. Todos ellos fueron ensayados en estado puro y saturados en agua.

### 9.3.- EXTRACCION A PARTIR DE LAS CELULAS

#### 9.3.1.- ROTURA CELULAR POR SONICACION

Las células separadas del caldo de cultivo por centrifugación se lavan varias veces con solución salina y finalmente se resuspenden en dicha solución. La suspensión celular se somete a procesos de sonicación (ITO y col., 1970<sub>b</sub>; ITO y KANNAN, 1972; VOLLBRECHT, 1982<sub>b</sub>) en un sonicador BRANSON, modelo Sonifer B 12, a 10 Kc durante 10 minutos, manteniendo la temperatura por debajo de 4°C.

Posteriormente, se centrifuga y al sobrenadante se le extrae la posible sustancia antimicrobiana intracelular, utilizando el disolvente orgánico seleccionado.

#### 9.3.2.- ROTURA CELULAR POR LISIS ENZIMATICA

Las células obtenidas por centrifugación a partir del cultivo líquido, se someten a rotura celular por lisis enzimática. Para ello, se resuspenden en tampón Tris-Clorhídrico (pH 7,5) que contiene cloruro sódico 0,1 M y EDTA 10 mM. La lisozima se añade a una concentración de 1 mg/ml y se mantiene en contacto 60 minutos a 0°C (KAUR y col., 1978).

A continuación se centrifuga y al sobrenadante se le extrae la posible sustancia antimicrobiana intracelular, utilizando el disolvente orgánico seleccionado.

Al resultado obtenido tras el proceso de extracción se le denomina "Extracto Crudo".

## 10.- ENSAYOS DE PURIFICACION

### 10.1.- DIALISIS

La diálisis es una técnica de purificación - en la que, por gradientes de concentración, se separan las moléculas del soluto difundiendo a través de membrana semipermeable (DREW, 1981).

El "Extracto crudo" se dializa a 4°C frente a agua destilada utilizando tripas de diálisis (Sigma Chemical Company). El tiempo máximo de diálisis es de 72 horas con cambios sucesivos de agua. Transcurrido dicho tiempo se ensaya la actividad tanto en el "extracto crudo" dializado como en el agua de diálisis, - previamente concentrados hasta volumen inicial. (ARIAS y col., 1979<sub>b</sub>). Como control de actividad se utiliza dicho "Extracto Crudo".

Otro sistema para llevar a cabo la diálisis se realiza sobre placas de cultivo sólido sembradas - con los microorganismos testigo. Sobre la superficie -

del agar se deposita una película de tripa de diálisis, previamente esterilizada por luz ultravioleta, y sobre ella unas gotas del "Extracto Crudo". Se incuba a 37°C durante 12-18 horas y la aparición de halos de inhibición nos demuestra que se ha producido la diálisis de la sustancia antimicrobiana (ASENSIO y BAQUERO, 1982).

## 10.2.- CROMATOGRAFIA EN COLUMNA DE SEPHADEX

En este ensayo de purificación (CARNEGIE , 1965 ; LAZARO, 1974 ; ARIAS y col., 1979<sub>b</sub> ; EADY y col., 1983) se utilizan varios tipos de Sephadex (G-10, G-15, G-25 y G-50) suministrados por farmacia Fine Chemical (Upsala, Suecia) y los resultados obtenidos se usan para la determinación del Peso Molecular (Pm) (SAHL y - BRANDIS, 1981).

- Preparación de los geles : El Sephadex se suministra en forma de polvo seco y antes de empaquetarlo en la columna se debe hinchar en la solución usada como eluyente (agua acidificada con ClH). Para ello, a la cantidad adecuada de Sephadex, dispuesta en un matraz Kitasato, se le agrega un exceso de eluyente y se deja estar en reposo a temperatura ambiente el tiempo necesario para conseguir una buena hidratación del mismo. El proceso de hinchamiento puede acelerarse por calen-

tamiento en baño de maría. Durante la hidratación pueden quedar atrapadas en la matriz del gel algunas burbujas de aire dando lugar a empaquetamiento y flujo desigual. Este problema se evita desgasificando mediante bomba de vacío conectada al kitasato que alberga el gel.

- Montaje de la columna : Se han empleado columnas Pharmacie Fine Chemical (K 16/70 y K 26/70) equipadas en sus terminales con sendos émbolos, provistos de placas porosas de teflón, que pueden regular la altura útil de la columna. Cada extremo del émbolo lleva conectado un tubo de teflón que canaliza la entrada y salida del eluyente. Dicha salida se conecta a una bomba peristáltica (Pharmacie Fine Chemical, modelo P-3). Por el extremo superior de la columna se añade lentamente la suspensión de Sephadex con ayuda de una varilla de vidrio hasta conseguir la altura deseada (aproximadamente 50 cm), procurando que no quede atrapada ninguna burbuja de aire. Se deja una pequeña capa de eluyente sobre la parte superior del gel, se cierra la salida y se conecta al conducto de entrada de eluyente. Para conseguir un empaquetado y equilibrado perfecto se hace pasar unos 500 ml de eluyente a un flujo de 0,5 ml/min.

- Constantes de la columna : Antes de colocar la muestra es necesario hallar las constantes de la columna .

Para ello, se prepara una mezcla de azul dextrano y sa carosa en agua destilada que se pasa a través de la - columna. La salida del azul dextrano marca el volumen vacío ( $V_v$ ), que es el volumen de elución correspondiente a aquellas moléculas que, por su elevado peso molé- cular (mayor tamaño que los poros del gel), solo atra- viesan el lecho a través de sus intersticios ; y la sa carosa indica el volumen total real ( $V_t$ ). El volumen  $\Sigma$  interno ( $V_i$ ) se calcula restando el volumen vacío del volumen total y es el volumen de elución correspondiente a aquellas moléculas capaces de atravesar la matriz del gel.

- Aplicación de la muestra : Eliminado el exceso de eluyente, se deposita la muestra en la parte superior del gel y una vez embebida se añade un determinado de vo- lumen de eluyente que se conecta al reservorio.

El desarrollo se lleva a cabo utilizando un flujo de 1 ml/min y recogiendo fracciones de 3 ml, para lo que se emplea un colector automático de fracciones ELDEX UNIVERSAL, modelo UIB. La regulación del flujo - se consigue mediante la bomba peristáltica intercalada entre la columna y el colector.

A las distintas fracciones obtenidas se les ensaya la actividad antimicrobiana mediante la técnica



de impregnación de discos y las fracciones activas se reúnen, se evaporan a sequedad y se redisuelven en agua destilada hasta el volumen inicial de muestra.

### 10.3.- RESINAS DE INTERCAMBIO IONICO

En este proceso de purificación se han utilizado resinas ácidas (IR 120) y básicas (IRA 400) intercambiadoras de iones (PARKER y RATHNUM, 1973 ; PARKER y RATHNUM, 1975 ; MILLER y col.,1976 ; GROSS y DEVAY, 1977 ; NOJIRI y col.,1975 ; EADY y col.,1983).

- Preparación de la resina : Antes de su utilización necesitan ser sometidas a un proceso de lavado. Primeramente se lavan con agua destilada y se dejan en suspensión durante 24 horas ; se decanta el agua destilada y se procede al equilibrio de las resinas. Para ello, se tratan alternativamente con soluciones de  $\text{ClH}$  2 N y  $\text{NaOH}$  2 N, tres veces, según que sea resina básica o ácida, respectivamente. Seguidamente, se someten a lavado con agua destilada hasta que el agua de lavado salga con pH neutro. A continuación, se da el último tratamiento con  $\text{NaOH}$  o  $\text{ClH}$ , dejando las resinas en condiciones de uso.

- Montaje de la columna : Se usan columnas de 1,5x70 cm

En la parte inferior se coloca lana de vidrio como soporte del lecho y la parte superior va conectada al reservorio de eluyente. El llenado de la columna se hace dejando caer lentamente por las paredes la suspensión de resina con ayuda de una varilla de vidrio. Una vez alcanzada la altura correspondiente (aproximadamente 20 cm), se coloca un papel de filtro en la superficie de la resina, sobre la que se deposita la muestra a purificar. Para un buen empaquetamiento de la columna se hace pasar unos 500 ml de agua destilada.

- Aplicación de la muestra : Se realiza mediante una pipeta dejando caer la muestra sobre la pared de la columna y con cuidado de no remover el lecho. Una vez que la muestra ha penetrado en la resina, se hace pasar el eluyente (Agua destilada) y finalizado el proceso el eluato se concentra hasta el volumen inicial de la muestra, comprobándose la actividad del mismo. Si el antimicrobiano queda retenido en la resina se recupera mediante lavados con NaOH 1 N y ClH 1 N, según se trate de resinas básicas o ácidas, respectivamente.

## 11.- TECNICAS CROMATOGRAFICAS

La cromatografía es una de las técnicas más utilizadas para el análisis y purificación de antibióticos y normalmente se utilizan dos tipos de cromatografías (URI, 1959 ; PARIS y THEALLET, 1962 ; ZUIDWEG y col., 1969 ; PARKER y RATHNUM, 1975) ; ITO y col., 1979).

- Cromatografía de adsorción : El fenómeno de la adsorción se utiliza para separar mezclas de compuestos de acuerdo con el número y tipo de sus grupos funcionales. La separación se debe a las diferencias en las fuerzas superficiales reversibles ejercidas por los centros activos de la fase sólida estacionaria sobre los grupos funcionales de cada componente de la mezcla.

- Cromatografía de partición : La cromatografía de partición se basa en las diferencias de solubilidad de los componentes de la mezcla en los sistemas solventes inmiscibles. En este caso, los miembros de la mezcla se separan de acuerdo con la solubilidad de sus grupos funcionales.

## 11.1.- CROMATOGRAFIA EN CAPA FINA

El ácido silícico es un adsorbente de carácter polar y una estructura superficial con numerosos grupos hidróxilos que interaccionan con las moléculas de soluto a través de fuerzas de Van der Waals y puentes de hidrógeno. (HAMILL y CRANDALL, 1978).

En la cromatografía de adsorción es necesario utilizar ácido silícico parcialmente deshidratado, denominado "ácido silícico activado". Este se prepara a partir de la forma comercial por calentamiento a 100°C-200°C durante 1 ó 2 horas.

- Preparación de las placas : Las placas se colocan en un equipo que consiste esencialmente en un soporte para las mismas y un aplicador del gel. A continuación se pesa la cantidad necesaria de adsorbente y se le aña de doble cantidad de agua destilada, agitando la mezcla vigorosamente. El adsorbente utilizado es Silicagel G, consistente en un ácido silícico que contiene sulfato cálcico como aglutinante. Una vez preparado el gel, se coloca sobre el aplicador y se extiende cuidadosamente sobre las placas. Se dejan secar a temperatura ambiente y se activan a 110°C durante 1 hora.

- Desarrollo de las placas : Las muestras se aplican en forma de punto a 1 cm del borde de la placa. A continua

ción, se lleva a un tanque de cromatografía para proce  
der a su desarrollo.

Para la cromatografía en capa fina se han uti  
lizado los siguientes sistemas solventes (SCHMITT, 1968;  
ITO y col., 1977 ; ITO y col., 1979 ; KONDO y col., 1979 ;  
AMANO y col., 1980) : Agua, metanol, etanol, Metanol-clo  
roformo (9:1) , Metanol-cloroformo (1:9) , Benceno-ace-  
tona (3:2) .

Las placas se desarrollan hasta 1 cm del ex-  
tremo y los solventes se evaporan a temperatura ambien-  
te.

- Revelado de las placas : Una vez desarrollados y se-  
cos los cromatogramas, se revelan utilizando las si-  
guientes técnicas (KIMURA y col., 1969<sub>b</sub> ; VEIGA, 1979) :

a.- Vapores de yodo : Se trata de un revelador que reac-  
ciona con compuestos no saturados. El cromatograma se  
coloca en un tanque que contiene cristales de yodo y -  
en pocos minutos se observa la aparición de manchas ma-  
rrones sobre fondo débilmente amarillo. La reacción es  
reversible, desapareciendo el color cuando las placas  
se dejan al aire un cierto tiempo.

b.- Absorción a la luz ultravioleta : Se trata de un -

método de revelado muy útil, pues permite la observación directa de las sustancias sin sufrir transformación química alguna. Se utiliza para compuestos que tienen la propiedad de emitir fluorescencia a la luz ultravioleta (254 nm y/o 366 nm), apareciendo en el cromatograma manchas brillantes sobre fondo oscuro.

c.- Carbonización : Es una técnica que consiste en reducir a carbón los compuestos orgánicos no volátiles. El revelado se lleva a cabo pulverizando la placa con ácido sulfúrico y calentandola a 100°C durante 5-10 minutos. Los compuestos se detectan mediante la aparición de manchas marrones sobre el fondo blanco de la placa.

d.- Bioautografía : (Aptdo. 7.4)

## 11.2.- CROMATOGRAFIA EN PAPEL

Es un método de cromatografía de partición líquido-líquido, que permite la separación de las sustancias basándose en las diferencias de solubilidad entre una fase móvil orgánica y una fase estacionaria acuosa. Algunos microlitros de la muestra a separar se depositan sobre el papel y a continuación se hace pasar la fase móvil orgánica e inmiscible con la fase acuosa. El desarrollo da lugar a una serie de particiones de los solutos en las dos fases, obteniéndose co

mo resultado la emigración y separación cromatográfica de los compuestos (SMITH y FEINBERG, 1965 ; MAHU - ZIER y HAMON, 1978).

- Soporte de la fase móvil : Se utiliza una cubeta de cromatografía adaptada a la técnica descendente y, a tal efecto, en la parte superior va apoyada una navecilla en la que se encuentra la fase móvil. Se introduce el extremo del papel en dicha fase móvil, teniendo cuidado que la zona de depósito de las muestras no queden en contacto con el solvente. Se coloca una varilla de vidrio para mantenerlo fijo.

Los solventes recorren el papel de arriba a abajo por capilaridad y gravedad y, con el fin de evitar cualquier irregularidad en la emigración, la atmósfera debe ser saturada previamente con ambas fases.

La cubeta queda herméticamente cerrada mediante una tapa de vidrio que evita cualquier tipo de evaporación.

- Soporte de la fase estacionaria : Como soporte de la fase estacionaria se utiliza papel de celulosa pura y grano homogéneo (Whatman nº 1), con una medida de 46 x 12 cm .

- Sistemas solventes : Se han empleado aquellos sistemas solventes más utilizados en la bibliografía (SUZUKI y col., 1963 ; SUZUKI y col., 1964 ; SHAW y col., -- 1966 ; ITO y col., 1970 ; DEL RIO y col., 1972<sub>b</sub>; ITO y KOYAMA, 1972 ; ITOH y col., 1977 ; PARKER y col., 1977; WRATTED y col., 1977 ; KONDO y col., 1979 ; ITO y col., 1979 ; AMANO y col., 1980) :

- n-Butanol-Acético-Agua (4:1:5)
- n-Butanol-Acético-Agua (4:1:2)
- Acetato de etilo-Metanol-Agua (8:5:1)
- Acetato de etilo-Acético-Agua (3:1:1)
- Acetato de etilo-Propanol-Agua (1:7:2)
- n-Butanol-Acético-Piridina-Agua (15:3:10:12)
- n-Butanol-Acético-Piridina-Agua (10:1:6:4)
- Etanol-Hidróxido amónico 28%-Agua (80:5:12)

Estos solventes se colocan en una ampolla de decantación y se agitan hasta la separación de las fases. La fase inferior acuosa y saturada en el disolvente orgánico se elimina y la fase superior orgánica se utiliza como fase móvil.

- Aplicación de la muestra : A 10 cm de uno de los extremos se traza la línea base y a 3 cm equidistantes se colocan las muestras puntualmente. Se utilizan micropipetas y las manchas formadas se secan mediante corrien



te de aire caliente.

Una vez transcurrido el tiempo de desarrollo, se saca el cromatograma del tanque y se seca a temperatura ambiente.

- Revelado : Los sistemas de revelado empleados son los mismos que para la cromatografía en capa fina.

Para determinaciones cuantitativas con una aproximación del 10%, la zona del cromatograma donde se localiza la actividad antimicrobiana se trata con el disolvente orgánico apropiado a fin de extraer la sustancia activa. Posteriormente, se evapora a sequedad y se redisuelve en agua destilada, consiguiéndose así un grado más de purificación

### 11.3.- CROMATOGRAFIA DE pH

La cromatografía de pH ayuda a estimar el carácter iónico de las sustancias y también se utiliza para su aislamiento y purificación. (BETINA, 1958 ; BETINA, 1960).

La técnica descrita por BETINA (1975) trata de una cromatografía de partición sobre papel en la que se emplea un buffer a un determinado pH como fase

estacionaria y como fase móvil se emplea un solvente - apropiado inmiscible, pero saturado en agua. Según el pH del buffer las sustancias ácidas o básicas quedará - rán más o menos retenidas, dando lugar a 4 tipos de cro - matogramas de pH :

- Sustancias ácidas : Los Rf de las distintas tiras de papel dibujan una curva en "S", el máximo de la cual - corresponde a las tiras de papel impregnadas con los buffers ácidos. Al ir aumentando los valores de pH de la fase estacionaria los Rf van disminuyendo, alcan - zando un valor mínimo en las tiras de papel cuyo pH es básico.

- Sustancias básicas : Los valores de Rf de los cromatogramas dibujan una curva en "S", pero de sesgo con - trario a la descrita para sustancias ácidas.

- Sustancias anfotéricas : Los valores de Rf se van in - crementando a medida que va aumentando el pH, alcanzan - do un cierto valor máximo a un pH determinado y luego comienzan a disminuir. Estos compuestos se comportan - como bases desde pH 2 hasta el valor de pH en donde el Rf es máximo (indica posiblemente el punto isoeléctri - co) y desde este valor hasta pH 10 se comportan como - ácidos.

- Sustancias neutras : Muestran el mismo Rf a cualquier

valor de pH, dibujando por tanto una línea recta.

Se utilizan nueve tiras de papel Whatman nº1 (de 1,5 cm de ancho y 46 cm de largo) que se impregnan en la fase estacionaria. Se usan los siguientes buffers: Acido clorhídrico/Cloruro potásico de pH 1 y 2 , Acido cítrico/Citrato sódico de pH 3, 4, 5 y 6 y Tris/Clorhídrico de pH 7, 8 y 9 . Las tiras se dejan secar al aire y se colocan las muestras puntualmente a 10 cm del extremo de la tira.

Como fase móvil para desarrollar los cromatogramas se ha utilizado n-Butanol saturado en agua y dicho desarrollo se detiene cuando el frente del solvente alcanza 32 cm desde la línea base. Las tiras se dejan secar al aire y se revelan por bioautografía.

## 12.- TECNICAS ELECTROFORETICAS

Son métodos que permiten separar los componentes de una mezcla basándose en su diferente migración cuando se someten a la actuación de un campo eléctrico, de forma que las partículas capaces de ionizarse se cargan y emigran al polo opuesto (LIGHTBROWN y ROSSI, 1965; SMITH y FEINBERG, 1965 ; MAHUZIER y HAMON, 1978)

### 12.1.- ELECTROFORESIS EN PAPEL

Es un tipo de electroforesis denominada "electroforesis de zona o de soporte", donde el medio líquido en el que se efectúa la migración está estabilizado por un soporte de papel, que sirve de ayuda para localizar las zonas de migración (PARIS y THEALLET, 1962 ; MAEDA y col., 1969 ; PARKER y RATHNUM, 1973 ; MAHUZIER y HAMON, 1978 ; KONDO y col., 1979).

- Soporte : Las tiras de papel (1,5 x 50 cm) utilizadas como soporte reúnen las mismas condiciones que las descritos para la cromatografía (Aptdo. 12.2).

- Solución electrolítica : Se emplean emplean las mismas soluciones buffers que para la cromatografía de pH (Aptdo.12.3) con el fin de mantener constante las condiciones de pH durante el experimento. Las tiras de papel deben impregnarse con dichos buffers antes de aplicar la corriente para que la misma pueda fluir sin problemas de resistencia.

- Aplicación de la muestra : Una vez eliminado el exceso de buffer de las tiras de papel mediante papel de filtro, se procede a la aplicación de las muestras en el punto medio de la tira. Dicha muestra se coloca puntualmente mediante micropipeta y se introducen en una cubeta de electroforesis SHANDON UNIKIT nº 1 (MAHUZIER, 1978). La muestra también se puede colocar en papel seco y sin impregnar con ayuda de aire caliente. En este caso el buffer avanza por capilaridad a través de los dos compartimentos hasta alcanzar el punto medio y una vez embebida la tira de papel, se conecta la corriente (SMITH y FEINBERG, 1965 ; MAHUZIER y HAMON, 1978)

- Condiciones de la electroforesis : El paso de la corriente genera calor y éste se manifiesta por la evaporación del agua del buffer que se condensa en las paredes de la vasija. Dicha evaporación aumenta a medida que se eleva el voltaje, por lo que es importante la elección de intensidad y voltaje respecto al factor --

tiempo. Las condiciones ensayadas fueron :

- Intensidad : 2, 4, 6, 10, 15 y 25 mAmp.

- Voltaje : 2, 3, 4, 6 y 7 voltios/cm

- Tiempo : 2, 3, 6, 12 y 20 horas

- Modo operatorio : Una vez impregnadas las tiras y aplicadas las muestras, se disponen en la cubeta de electroforesis, cuyos dos compartimentos contienen la solución electrolítica y en donde se introducen los dos extremos del papel. Un compartimento se conecta al polo positivo del campo eléctrico (ánodo) y el otro al polo negativo (Cátodo). La cubeta se conecta a un sistema de corriente continua, manteniéndose la intensidad y voltaje - previamente elegidos. Transcurrido el tiempo necesario, las tiras de papel se secan a temperatura ambiente y a dicho papel se le denomina "electroforegrama".

- Revelado : Una vez secos los electroforegramas, se revelan por luz ultravioleta y por bioautografía.

## 12.2.- ELECTROFORESIS DE pH

Esta electroforesis se ha realizado por la misma técnica que la electroforesis de papel descrita en el apartado 12.3. En este caso, se estudia el comportamiento electroforético de la sustancia utilizando di

ferentes pH. Para ello, se utilizan distintos buffers - como solución electrolítica : Acido clorhídrico/Cloruro potásico a pH 1 y 2, Acido cítrico/Citrato sódico a pH 3, 4, 5 y 6 y Tris/Clorhídrico a pH 7, 8 y 9 .

## 13.- TECNICAS ESPECTROSCOPICAS

### 13.1.- ESPECTROSCOPIA DE ULTRAVIOLETA-VISIBLE

Los espectros de absorción se determinan en soluciones acuosas empleando un espectrofotómetro de doble haz BECKMAN, Modelo ACTA III, que va conectado a un registrador PERKIN ELMER, Modelo 561 . Se utilizan cubetas de 1 cm de espesor y se realiza un barrido entre 800 nm y 190 nm, con una velocidad de barrido de 60 nm/min y una velocidad de carta de 60 mm/min .

### 13.2.- ESPECTROSCOPIA DE INFRARROJO

El espectro de Infrarrojo (I.R.) se lleva a cabo en pastillas de bromuro potásico (BrK) y se utiliza un espectrofotómetro PY-UNICAM, Modelo PR 1000, realizando el barrido entre  $625 \text{ cm}^{-1}$  y  $3800 \text{ cm}^{-1}$  .

Las pastillas de bromuro potásico se realizan de la siguiente forma : a una pequeña cantidad de la sustancia antimicrobiana se le añade una cantidad ade-



cuada de bromuro potásico (unos 300 mg de BrK por cada mg de sustancia antimicrobiana), se pulveriza, se mezcla todo el conjunto en un mortero de ágata y se elabora el comprimido con ayuda de una bomba de vacío y los accesorios correspondientes.

## 14.- CARACTERISTICAS FISICO-QUIMICAS

### 14.1.- ESTABILIDAD

Se ha estudiado la estabilidad de la sustancia antimicrobiana frente al tiempo, temperatura y pH, en soluciones acuosas o en estado seco (NEWTON, 1956 ; PAULUS y GRAY, 1964 ; SUZUKI y col., 1964<sub>b</sub> ; KIMURA y col., 1969<sub>a</sub> ; ITO y KOYAMA, 1972<sub>a</sub> ; HAAVIC, 1974<sub>b</sub> ; AMANO y col., 1980 ; WITHANDER y HEDING, 1976 ; ARIAS y col., 1979<sub>b</sub> ; SAHL y BRANDIS, 1981 ; LINDBERG, 1981).

En el estudio de la estabilidad al tiempo, la sustancia se mantiene a temperatura ambiente y pH 9 durante un máximo de dos años, comprobándose la actividad a intervalos regulares de tiempo.

En la estabilidad a la temperatura, la sustancia a pH 9 se somete a las temperaturas y tiempos que a continuación se indican :

- (-)5°C : Congelador (30 días)
- 5°C : Estufa de sicrófilos (30 días)
- 12°C : Frigorífico (30 días)

- 37°C : Estufa (30 días)
- 50°C : Baño maría (24 horas)
- 75°C : Baño maría (24 horas)
- 100°C : Horno (1 hora y 30 minutos)
- 120°C : Autoclave (20 minutos)
- 150°C : Horno (1 hora y 30 minutos)

Para estudiar la estabilidad de la sustancia antimicrobiana a los distintos pH, se parte de soluciones acuosas de la sustancia al pH que se origina inicialmente (pH 9) y utilizando soluciones de ácido clorhídrico 1 N e hidróxido sódico 1 N, se consiguen valores de pH entre 2 y 12 . En estos tratamientos se comprueba la actividad después de 48 horas y una vez finalizado este tiempo, se llevan al pH inicial y se determina de nuevo la actividad.

En todos los casos se utiliza un blanco de actividad consistente en soluciones de ácido clorhídrico e hidróxido sódico que proporcione los distintos valores de pH y como patrón se usa la sustancia antimicrobiana al pH que se originó (pH 9)..

#### 14.2.- SOLUBILIDAD

Se realiza un estudio para conocer la solubi

lidad relativa de la sustancia antimicrobiana y para ello utilizamos disolventes de distinta polaridad. Dichos disolventes se indican a continuación : Agua, metanol, etanol, propanol, n-butanol, alcohol amílico, ácido acético, acetato de etilo, acetona, eter etílico, eter de petroleo, cloroformo, tetracloruro de carbono y piridina. Todos estos disolventes se han ensayado de forma anhidra y saturados en agua.

#### 14.3.- ANALISIS ELEMENTAL

Se ha realizado un estudio cualitativo de la sustancia antimicrobiana, comprobando la naturaleza orgánica y la presencia de halógenos, nitrógeno y azufre (VILARRASA, 1975 ; EVANS y col., 1976).

##### - Naturaleza orgánica

Para investigar si un compuesto es de naturaleza orgánica se toma con una espátula una pequeña cantidad del mismo y se calienta suavemente a la llama del mechero. Los productos orgánicos funden y se carbonizan a temperaturas relativamente bajas, a diferencia de los inorgánicos, que sólo funden a altas temperaturas. Una fusión a baja temperatura y un residuo de carbón que llega a arder, son prueba de la naturaleza orgánica.

- Ensayo de BEILSTEIN para halógenos

Se efectúa por un análisis a la llama sobre un alambre de cobre, que previamente deberá haberse introducido a la llama del mechero hasta la desaparición del color verde. Una vez frío el alambre, se toman unos miligramos del producto seco y se lleva a la llama. La sola aparición de una fugaz coloración verde indica la presencia de halógenos.

- Ensayo de LASSAIGNE (Fusión alcalina)

Los análisis se realizan en ampollas de vidrio de aproximadamente 1 cm de diámetro. Para efectuar el análisis se introduce en una de las ampollas unos miligramos del producto seco al que se le añade con los cuidados necesarios un trocito de sodio metálico limpio. La mezcla se calienta suavemente a la llama directa, intensificando el poder calorífico hasta que la sustancia y el sodio hayan fundido y la ampolla se haya puesto al rojo. Todavía caliente, la ampolla se rompe en contacto con agua fría y en la solución filtrada se investiga el nitrógeno y el azufre.

Para determinar el nitrógeno se toma una parte del filtrado y se le añade 0,1-0,2 g de sulfato ferroso pulverizado. Se calienta suavemente hasta ebullición y sin enfriar se le añade la cantidad justa de -

ácido sulfúrico diluido para disolver los hidróxidos de hierro y dar a la solución reacción ácida. La aparición de un precipitado o una coloración azul Prusia o verde Berlín indicará la presencia de nitrógeno. Si existe azufre se produce un precipitado negro de sulfato ferroso.

Para determinar el azufre se toma la otra parte del filtrado procedente de la fusión alcalina y se le añaden 2 ó 3 gotas de una solución de nitroprusiato sódico ( $\text{Fe}(\text{CN})_5\text{NO Na}_2$ ) al 0,1% recién preparada. La aparición de una coloración púrpura en la solución indicará la presencia de azufre.

#### 14.4.- REACCIONES COLOREADAS

Son reacciones cualitativas que se utilizan para detectar grupos funcionales y podrían orientar sobre la estructura de sustancias desconocidas.

##### - Reacción nitrocrómica

Es una reacción debida a los grupos funcionales tipo alcohólicos de una molécula. Para ponerla de manifiesto se toma la solución problema y se le añade un volumen igual de ácido nítrico concentrado y unas gotas de cromato o dicromato potásico al 5%. Se mezcla

en frío y si al cabo de 1 minuto aparece coloración azul la reacción es positiva (MORENO y TORRE, 1977)

- Reacción de SCHIFF

En esta reacción se pone de manifiesto el gran poder aditivo de los grupos aldehidos. Consiste en añadir anhídrido sulfuroso a la fucsina hasta formar un producto incoloro. A continuación, se añade la solución problema y si existen grupos aldehidos reaparece el color rosado de la fucsina, cosa que no ocurriría si existiesen cetonas (FIESER y FIESER, 1968).

- Reacción de EHRLICH

Se utiliza para detectar los grupos indólicos del triptófano. Se emplea el reactivo de EHRLICH (p-dimetilamino benzaldehido, 2 g ; alcohol etílico, 190 ml y ácido clorhídrico concentrado, 40 ml) que en presencia de grupos indólicos forma un anillo rojo en la superficie (FIESER y FIESER, 1968)

- Reacción con cloruro férrico

Sirve para poner de manifiesto los grupos fenoles y más especialmente los polifenoles. Para ello, se usa una solución de cloruro férrico al 10% de color amarillento que se va añadiendo gota a gota sobre la solución problema. La aparición de una coloración ver-

de o azul nos indica la presencia de polifenoles (PARIS y MOYSE, 1976 ; SMIBERT y KRIEG, 1981).

- Reacción con hidróxido amónico

Esta reacción se emplea para detectar los derivados quinónicos, tanto quinonas libres como combinadas. Se utiliza solución de hidróxido amónico al 50% y, una vez añadida a la solución problema, se agita y se mantiene en reposo. En caso de existir quinonas libres debe aparecer una coloración rosa, roja o violeta.

Para detectar las quinonas combinadas la solución problema se trata con ácido sulfúrico 0,1 N hasta ebullición y, una vez enfriada se agita con benceno. Separada la capa orgánica debe dar coloración roja al tratarla con hidróxido amónico al 50%. (FIESER y FIESER, 1968).

- Reacción de BALJET

Es una reacción específica de las lactonas pentagonales insaturadas. El reactivo de BALJET (Acido pícrico 1%, 95 ml ; hidróxido sódico 10%, 5ml) se añade gota a gota sobre la solución problema. Si aparece una coloración que va desde naranja a rojo oscuro la reacción es positiva. (FIESER y FIESER, 1968).



- Reacción de ABERHALDEN

Esta reacción se utiliza para detectar los grupos aminos en general. Como reactivo se emplea nin hidrina al 0,1 % en acetona y en caso positivo aparece una coloración azul, rojiza o púrpura (LITWACK, 1967; MORENO y TORRE, 1977).

- Reacción del BIURET

Es específica del enlace peptídico y se basa en la formación de un compuesto de coordinación entre el ion cobre y los enlaces peptídicos de las proteínas. La reacción se efectúa en medio alcalino fuerte con solución diluida de sulfato cúprico (0,1-1,0%) y es positiva (coloración azul violeta) cuando existen dos o más enlaces peptídicos, de manera que no la darán ni los aminoácidos libres ni los dipéptidos (PARIS y MOYSE, 1976 ; MORENO y TORRE, 1977).

- Reacción xantoproteica

Esta reacción se debe a la formación de derivados nitrados en los anillos bencénicos de determinados aminoácidos (fenilalanina, tirosina y triptófano). Consiste en adicionar ácido nítrico concentrado a la solución problema y la aparición de un color amarillo o anaranjado indica que la reacción es positiva (PARIS y MOYSE, 1976 ; MORENO y TORRE, 1977).

#### - Reacción de FEHLING

Sirve para detectar azúcares reductores. Dicho reactivo esta formado por : Solución A (Sulfato cúprico cristalizado, 34,65 g ; Agua destilada, 500 ml) y Solución B (Tartrato sódico y potásico, 173 g ; Hidróxido sódico, 60 g ; Agua destilada, 500 ml).

El licor de FEHLING se prepara en el momento de uso mezclando 5 ml de la solución A y 5 ml de la solución B. Se añade a la muestra problema y la aparición de un precipitado rojo indica que la reacción es positiva (FIESER y FIESER, 1968).

#### - Reacción de MOLISCH

Se utiliza para detectar azúcares. La técnica consiste en tomar 5 ml de la solución problema a la que se añaden dos gotas de una solución alcohólica de alfa-naftol al 15% . Esta mezcla se adiciona a 5 ml de ácido sulfúrico concentrado y la aparición de un anillo rojo-violeta en la zona de contacto indica que la reacción es positiva (FIESER y FIESER, 1968).

## 15.- CARACTERISTICAS BIOLÓGICAS

### 15.1.- ESPECTRO ANTIMICROBIANO Y CMI

Para calcular la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) de la sustancia antimicrobiana se han realizado diluciones seriadas según la técnica descrita por STEERS y colaboradores (1959). Para las determinaciones se usa la dilución en placa, método que ofrece la ventaja de poder probar varias cepas a la vez frente a una determinada concentración de antibiótico, con lo que se consigue un ahorro considerable de tiempo y material. El "Estudio Colaborativo Internacional de la Organización Mundial de la Salud" (ECI-OMS) comprueba que la reproducibilidad para la mayoría de los antibióticos siempre es mejor con el método de dilución en agar que con el de dilución en caldo (WASHINGTON, 1976; GOLDSTEIN y col., 1983 ; SCHOENKNECHT y col., 1980)

A partir de una solución madre de la sustancia antimicrobiana se realizan diluciones seriadas. De cada dilución se adiciona 1 ml a 19 ml de medio de cul

tivo en estado de sobrefusión (45°C) y se vierte en plcas de Petri, lo que permite tener una gama de concen-traciones de 400 µg/ml, 200 µg/ml, 100 µg/ml, 50 µg/ml, 25 µg/ml, 12,5 µg/ml, 6,25 µg/ml .... .

Los microorganismos testigo se preparan ino-culando medios de cultivo e incubando hasta conseguir del orden de  $10^7$  células/ml . De estos cultivos se to-man 0,5 ml y se depositan en los pocillos del sistema replicador de STEERS de inoculación múltiple. Dicho sis-tema consta de dos piezas fundamentales ; la inferior es una placa de siembra de aluminio donde van situados los pocillos en los que se depositan los microorganis-mos testigo y la superior es una cabeza provista de -32-36 puas de inoculación con superficie plana que se introducen en cada uno de los pocillos recogiendo 0,001 ml, con lo que la concentración final en la superficie del agar es del orden de  $10^4$  células/ml .

Una vez inoculadas las placas con las distin-tas concentraciones del antimicrobiano, así como las -placas control, se incuban a 37°C durante 12-18 horas.

Se considera como CMI la mínima concentración de antimicrobiano capaz de inhibir completamente el cre-cimiento del microorganismo testigo.

## 15.2.- MODO DE ACCION Y CMB

Para calcular la Concentración Mínima Bactericida (CMB) de la sustancia antimicrobiana se ha seguido la técnica de las diluciones seriadas en caldo (MURRAY y JORGENSEN, 1881 ; TAI y col.,1982 ; SATO y col.,1982 ; GOLDSTEIN y col.,1983 ; NORRBY y JONSSON , 1983 ; TAYLOR y col.,1983).

A partir de una solución madre de la sustancia antimicrobiana, se realizan diluciones seriadas. De cada dilución se adiciona 1 ml a 9 ml de medio de cultivo YG líquido, lo que permite obtener una gama de concentraciones de : 400 µg/ml, 300 µg/ml, 200 µg/ml, 150 µg/ml, 100 µg/ml y 90 µg/ml . Como blanco se utilizan tubos con 9 ml de medio de cultivo y 1 ml de solución del antimicrobiano y tubos con 10 ml de medio ; como patrones, tubos con 10 ml de medio de cultivo inoculados con los microorganismos testigo.

Los microorganismos testigo utilizados son *Staphylococcus aureus* y *Bacillus subtilis* y el inóculo de los mismos es del orden de  $10^4$  células/ml.

Los tubos se incuban a 37°C, realizando recuento de células viables a intervalos regulares de tiempo. De esta forma, se estudia el efecto de la sustancia antimicrobiana sobre la curva de crecimiento de los microorganismos.

nismos testigo (NOTO y col.,1982).

Se define la CMB como lamínima concentración de antimicrobiano capaz de matar el 100 % de las células del cultivo testigo en un período de 24 horas.

## 16.- EXPERIMENTOS EN ANIMALES

Como animales de experimentación se emplean ratones blancos de raza Swiss procedentes del "criadero de animales de experimentación" de la Universidad de Sevilla.

Antes de proceder a cualquier tipo de inoculación los ratones deben mantenerse en lotes de seis durante un período de tiempo mínimo de 5-7 días con la finalidad de adaptarlos a las nuevas condiciones ambientales. Al hacer cualquier experimento los ratones han de ser divididos en lotes lo más homogéneo posible en cuanto a peso, edad y sexo. Todos los lotes experimentales se han mantenido en condiciones convencionales y con agua y alimentación "ad libitum" (MILLER, 1971).

Como estudio preliminar es imprescindible comprobar la toxicidad de la sustancia y posteriormente, en caso de atoxicidad, se determina si el tratamiento con el antibiótico protege a los animales de la infección por microorganismos sensibles a la acción del mismo (ARIAS y col., 1979<sub>c</sub>; BARKER y col., 1979 ; MIYAKAWA y col., 1982 ; SATO y col., 1982 ; TAI y col., 1982).

## 16.1.- TOXICIDAD AGUDA Y DOSIS LETAL-50

La toxicidad aguda y Dosis Letal-50 ( $DL_{50}$ ) se han determinado por el método de MILLER y TAINTER (1944). El procedimiento general consiste en experimentar sobre varios lotes de animales a los que son administradas dosis crecientes de la sustancia a estudiar, de tal manera que el porcentaje de mortalidad varíe entre 0% y 100%. Al lote patrón se le administra dosis de agua - destilada. Transcurrido el tiempo necesario, según la vía de administración elegida, se calculan los porcentajes de mortalidad de cada lote (PARKER y col., 1977 ; SHOMURA y col., 1978 ; BARKER y col., 1979 ; KONDO y col. 1979).

Se han empleado ratones de peso comprendido entre 25g y 30 g sometidos a ayuno durante 12-18 horas antes del comienzo del experimento.

La inoculación se realiza por vía intraperitoneal inyectando diferentes dosis en un volumen de 0,25 ml con cuidado de no lesionar el intestino.

Para establecer las dosis de prueba se ha tenido en cuenta la determinación de la dosis terapéutica animal (150 mg de la sustancia antimicrobiana/Kg de animal) y a partir de ella se eligen las siguientes dosis : 15, 150, 1500, 7500 y 15000 mg/Kg de animal.



Los animales fueron sometidos a observación directa durante las primeras 48 horas, transcurridas - las cuales, se procede al recuento de animales muertos en cada lote. Si no muere ninguno se puede concluir - que el antibiótico es atóxico.

Para calcular la  $DL_{50}$  se halla la dosis mínima necesaria capaz de provocar la muerte del 50% de los ratones ensayados.

#### 16.2.- EFFECTIVIDAD DEL ANTIBIOTICO "IN VIVO"

Se estudia el efecto del antibiótico sobre - protección de animales a ser infectados y para ello, se utilizan microorganismos patógenos para el animal y sen sibles a la acción del antibiótico.

Se inocula subcutáneamente en el lomo del ra tón 0,1 ml de una suspensión de *Staphylococcus aureus* en solución salina estéril ( $1,5 \times 10^9$  cel/ml), procedente de un cultivo de 24 horas en agar glucosado, mezclada con un 25% de alúmina para localizar la infección - (ARIAS y col., 1979<sub>b</sub>).

Los ratones se dividen en dos lotes de seis quedando uno de ellos como lote testigo. Ambos lotes fueron infectados subcutáneamente. Los lotes tratados recii

bieron cada 12 horas la dosis terapéutica animal en 0,25 ml de volumen por vía intraperitoneal y en las mismas condiciones el lote testigo fue tratado con 0,25 ml de agua destilada.

Transcurrido cinco días de tratamiento los ratones se anestesiaron a muerte con éter y se les levantó la piel, observándose la lesión aparecida, que se manifiesta por un absceso localizado y un aumento de vascularización.

## RESULTADOS

## 1.- AISLAMIENTO DEL MICROORGANISMO PRODUCTOR

### 1.1.- ORIGEN DE LA MUESTRA

De acuerdo con lo establecido en el objeto del trabajo se procede a aislar un microorganismo productor de sustancias antimicrobianas en condiciones aerobias.

La toma de muestra se realiza a partir de suelos de la Reserva Biológica de Doñana en el lugar denominada "Las Madres", zona no investigada desde el punto de vista microbiológico. Se lleva a cabo a diferentes profundidades, eligiéndose la muestra procedente de 10 cm, donde aparece el mayor número de microorganismos aerobios productores. De todos ellos se selecciona aquel que presenta la máxima actividad frente a los microorganismos testigo utilizados.

### 1.2.- IDENTIFICACION DEL MICROORGANISMO PRODUCTOR

Las características del microorganismo productor TM-4 se resumen a continuación :

a.- Características morfológicas

- Célula vegetativa (Agar glucosado, 37°C, 1 día) : bacilo pequeño, gram (-), de borde redondeado, más o menos curvado, no esporulado y móvil por un flagelo polar.

b.- Características culturales

- Cultivo sólido en placa : colonias circulares, de borde irregular, ligeramente elevadas, brillantes y de consistencia mucosa.

- Cultivo sólido en "slant" : crecimiento abundante, consistencia mucosa, superficie brillante y con producción de pigmento soluble de color variable desde verde a marrón.

- Cultivo líquido : crecimiento con turbidez uniforme, ausencia de cualquier sedimento y con formación de película superficial

c.- Características fisiológicas

- Pigmento fluorescente : Positivo

- Arginina dihidrolasa (ADH) : Positivo

- Lisina descarboxilasa (LDH) : Negativo

- Ornitina descarboxilasa (ODH) : Negativo

- Fenilalanina desaminasa (APP) : Negativo

- Orto-nitofenil-*B*-galactosido (ONPG): Negativo
- Ureasa : Positivo
- Denitrificación : Positivo
- Oxidasa : Positivo
- Hidrólisis de la gelatina : Positivo
- Hidrólisis del almidón : Negativo
- Hidrólisis de la esculina : Negativo
- Hidrólisis de la lecitina : Negativo
- Utilización de carbohidratos : Forma ácidos a partir de la glucosa, fructosa, galactosa, manosa, xilosa y manitol; pero no a partir de ramnosa, lactosa, sacarosa y maltosa.
- Utilización de otras fuentes de carbono : Utiliza 2-cetogluconato, geraniol, valina, arginina y alanina; pero no utiliza trealosa y meso-inositol.
- Crecimiento : Crece en medios con cetrimide, acetato, 6,5% de cloruro sódico y medios de MacConkey y SS.
- Temperatura de crecimiento : Mínima de -4°C y máxima de 42°C.
- No acumula granulos de poli-*B*-hidroxibutirato (PHB) como reserva de carbono intracelular.

De acuerdo con la 8ª edición del Manual de Bergey's (1974), el microorganismo TM-4 fué caracterizado como *Pseudomonas aeruginosa* TM-4 .

### 1.3.- CONSERVACION Y VIABILIDAD DE LA CEPA PRODUCTORA

En todos los métodos de conservación, descritos en material y métodos, se ha comprobado la viabilidad de la cepa productora mediante crecimiento o no de la misma.

Se selecciona el método de conservación "slant" adicionado de pequeñas alícuotas del mismo medio en estado líquido, por ser el que mantiene la viabilidad durante un mayor período de tiempo (Tabla I).

TABLA I.- Viabilidad del microorganismo TM-4 a lo largo del tiempo en diferentes condiciones de cultivo.

M E T O D O S	TIEMPO (meses)					
	1/4	1	3	6	12	24
Slant	+	+	+	+	+	+
Slant + Parafina	+	-	-	-	-	-
Leche descremada	+	+	+	-	-	-
Glicerol	+	-	-	-	-	-
Picadura	+	+	+	+	-	-

+ : Crecimiento

- : No crecimiento

## 2.- PRODUCCION EN MEDIO SOLIDO

Se han efectuado una serie de estudios previos de tipo cualitativo o semicuantitativo, encaminados a la detección del antibiótico en medios de cultivo sólido.

En todos los casos se ha utilizado el medio de Egawa y los resultados obtenidos a lo largo del tiempo se recogen en la tabla II. De la misma se deduce que la máxima producción se obtiene a partir del 7º día y que no existen diferencias significativas entre la técnica de acumulos por asa calibrada y la técnica de bloques por difusión en agar.



TABLA II.- Producción del antimicrobiano en medio de Egawa sólido, a 37°C durante 1-7 días por las técnicas de acúmulos (TA) y bloques (TB)

TIEMPO	METODO	ACTIVIDAD (Ø de halo en mm)			
		<i>S.aureus</i>	<i>B.subtilis</i>	<i>E.coli</i>	<i>P.aeruginosa</i>
1	TA	7,4	7,0	0,0	0,0
	TB	7,7	7,4	0,0	0,0
2	TA	8,7	7,7	0,0	0,0
	TB	8,4	8,0	0,0	0,0
3	TA	10,4	9,4	0,0	0,0
	TB	11,0	9,0	0,0	0,0
4	TA	15,0	11,4	0,0	0,0
	TB	15,4	11,7	0,0	0,0
5	TA	18,7	13,7	0,0	0,0
	TB	18,4	14,0	0,0	0,0
6	TA	20,0	15,4	0,0	0,0
	TB	20,7	15,0	0,0	0,0
7	TA	25,7	18,0	0,0	0,0
	TB	25,0	18,4	0,0	0,0

\* Los valores son media de tres experimentos

### 3.- MEDIOS DE CULTIVO

#### 3.1.- MEDIOS DE AISLAMIENTO Y CONSERVACION

De todos los medios de aislamiento y conservación descritos, los mejores resultados se consiguen utilizando el medio agar glucosado.

#### 3.2.- MEDIOS DE PRODUCCION

En la tabla III se presentan los resultados correspondientes a la selección del medio óptimo de producción a lo largo del tiempo. De la misma se puede deducir que los mejores rendimientos se obtienen con el medio M-3, medio que se utilizará en todos los medios posteriores.

Dado que la única diferencia entre los medios M-2 y M-3 es el contenido en cobre, preliminarmente se podría pensar que es la presencia de este ión el que determina que se induzca la síntesis del antimicrobiano - por el microorganismo productor. Por ello, se repite este mismo experimento con la única modificación de adicion

TABLA III.- Producción del antimicrobiano, frente a *S.aureus* y a lo largo del tiempo, en condiciones standarizadas, con variación del medio de cultivo.

MEDIO DE CULTIVO	ACTIVIDAD (Ø de halo en mm)									
	1d	2d	3d	4d	5d	6d	7d	8d	9d	10d
NB	8,0	8,4	8,4	8,7	9,4	9,7	10,0	10,0	9,7	10,0
GB	8,0	8,4	9,7	10,4	11,4	13,7	15,7	15,7	15,4	15,4
YG	7,0	7,4	7,4	7,7	8,4	9,0	9,4	9,4	9,0	9,0
EGAWA	8,0	8,7	10,0	12,7	16,4	18,7	21,7	21,4	20,7	20,7
CG	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
MA-1	0,0	8,0	8,4	8,4	8,7	9,0	9,4	8,4	8,7	8,7
MA-2	0,0	0,0	0,0	7,0	7,4	7,7	8,0	8,0	7,7	7,7

TABLA III.- (Continuación)

MEDIO DE CULTIVO	ACTIVIDAD ( $\emptyset$ de halo en mm)									
	1d	2d	3d	4d	5d	6d	7d	8d	9d	10d
M-1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
M-2	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
M-3	8,4	9,0	11,4	15,7	20,4	24,0	25,4	25,0	25,0	25,0
M-4	0,0	0,0	7,0	7,0	7,7	7,7	8,0	8,0	7,7	7,7
M-5	0,0	7,0	7,0	7,4	7,4	8,0	8,0	8,4	8,0	8,0
M-6	7,0	7,7	8,0	8,4	8,7	9,0	9,0	8,7	8,4	8,7
M-7	7,7	8,4	8,7	9,7	10,0	11,7	11,7	11,7	11,0	11,0

\* Los valores son media de tres experimentos

nar cobre a los distintos medios de cultivo a la concentración que se encuentra en el medio M-3. En la tabla IV se puede observar los resultados obtenidos incluyendo esta modificación. De la misma se deduce que el medio M-3 sigue manteniendo las condiciones óptimas para la producción del antimicrobiano por el microorganismo TM-4. En posteriores experimentos, se utilizará dicho medio M-3.

### 3.3.- MEDIOS DE REVELADO

Entre los medios que se emplean para el revelado, agar glucosado y Mueller-Hinton, no se han encontrado diferencias significativas en los resultados, por lo que para experimentos posteriores se selecciona el medio de agar glucosado por su fácil preparación y bajo costo.

Los resultados obtenidos, tanto en medio sólido como en medio líquido, demuestran que la sustancia antimicrobiana sólo es activa frente a microorganismos gram (+). En todos los estudios posteriores se utilizan microorganismos representativos de gram (+).

TABLA IV.- Producción del antimicrobiano, en condiciones standarizadas, en los distintos medios de cultivo adicionados de ión cobre (1 ppm)

MEDIO DE CULTIVO	ACTIVIDAD (Ø de halo en mm)	
	<i>S. aureus</i>	<i>B. subtilis</i>
NB + Cu <sup>++</sup>	14,0	10,4
GB + Cu <sup>++</sup>	18,0	15,0
YG + Cu <sup>++</sup>	9,4	7,4
Egawa + Cu <sup>++</sup>	22,0	19,4
CG + Cu <sup>++</sup>	0,0	0,0
MA-1 + Cu <sup>++</sup>	15,0	12,0
MA-2 + Cu <sup>++</sup>	10,7	9,0
M-1 + Cu <sup>++</sup>	0,0	0,0
M-2 + Cu <sup>++</sup>	25,4	20,0
M-4 + Cu <sup>++</sup>	0,0	0,0
M-5 + Cu <sup>++</sup>	0,0	0,0
M-6 + Cu <sup>++</sup>	12,4	9,4
M-7 + Cu <sup>++</sup>	16,0	12,0

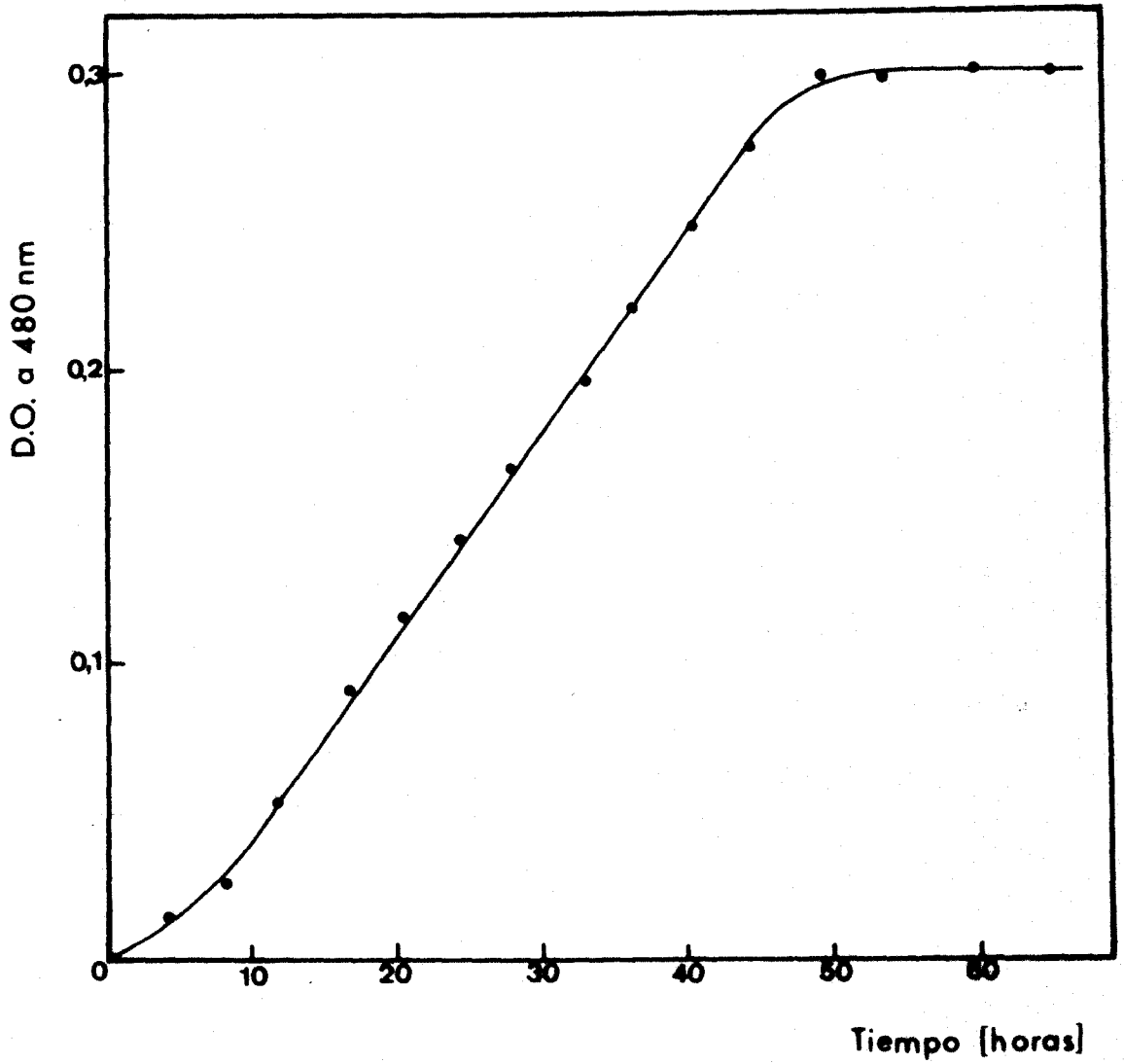
\* Los valores son media de tres experimentos

#### 4.- CURVA DE CRECIMIENTO DEL MICROORGANISMO TM-4

En la gráfica 3 se muestran los resultados de la curva de crecimiento del microorganismo productor  $\gamma$ -TM-4, en medio M-3. Se representa la D.O. a 480 nm frente al tiempo y, se deduce que dicho microorganismo alcanza la fase estacionaria a las 48 horas y a una D.O. alrededor de 0,30.

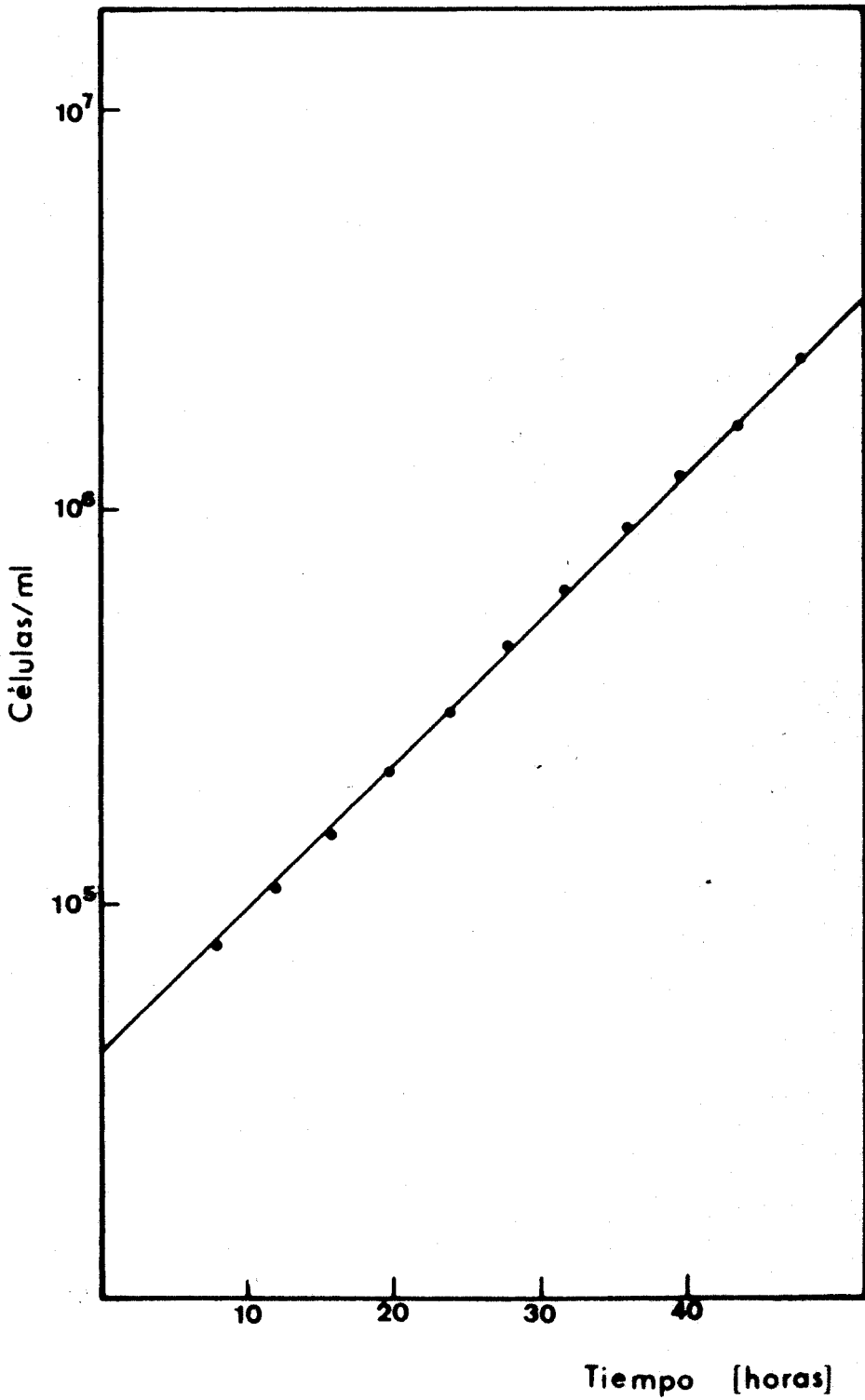
En la gráfica 4 se establece la relación entre el número de células viables y el tiempo, calculándose que el tiempo de generación es de 8 horas y 15 minutos.

En la gráfica 5 se representa el número de células viables frente a la D.O. a 480 nm, útil para conocer el número aproximado de células por ml mediante medida espectrofotométrica.

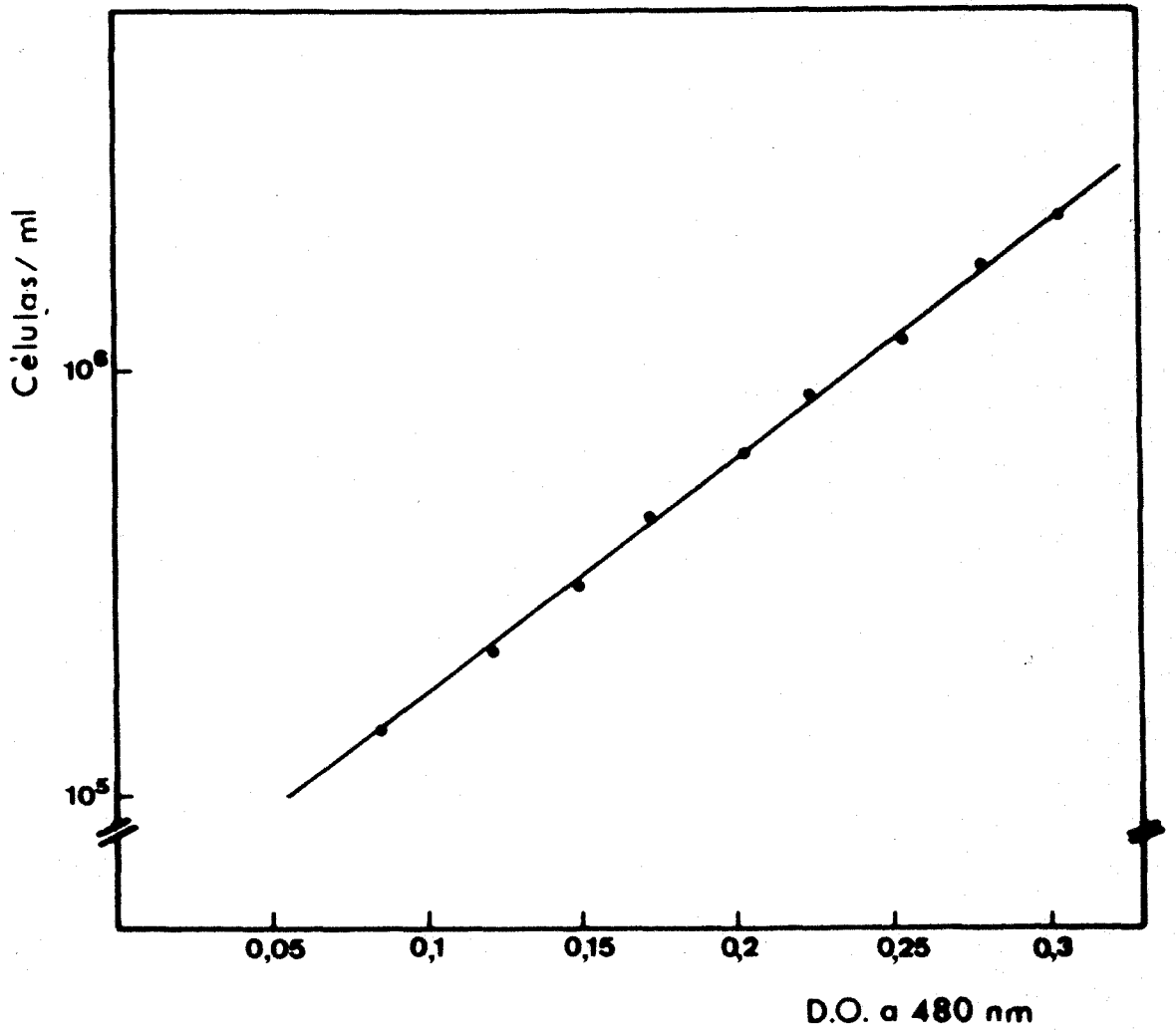


GRAFICA 3.- Curva de crecimiento de *Pseudomonas aeruginosa* TM-4 en medio M-3 .





GRAFICA 4.- Relación entre el número de células y el tiempo, de un cultivo en fase exponencial de crecimiento



GRAFICA 5.- Relación entre el número de células y la Densidad Optica, medida a 480 nm, de un cultivo en fase exponencial de crecimiento .

## 5.- OPTIMIZACION DE LAS CONDICIONES DE PRODUCCION

### 5.1.- TAMAÑO DE INOCULO

#### 5.1.1.- MICROORGANISMO PRODUCTOR, TM-4

En el estudio sobre la posible influencia del tamaño de inóculo en la producción del antimicrobiano a lo largo del tiempo, se observan las variaciones de la actividad en función del tiempo y del número de células. De la tabla V se puede deducir que el tamaño de inóculo en sí no influye cuantitativamente sobre la producción, pero la retrasa en el tiempo. No obstante, se ha estandarizado dicho inóculo, en las condiciones indicadas en material y métodos, con la idea de no introducir ninguna variante al comenzar los experimentos.

#### 5.1.2.- MICROORGANISMOS TESTIGO

Los resultados de los antibiogramas realizados con diferentes tamaño de inóculo de los microorganismos testigo, se muestran en la tabla VI y en ella se observa

TABLA V.- Producción del antimicrobiano a lo largo del tiempo, en las condiciones estandarizadas, con variación del tamaño de inóculo del microorganismo productor TM-4

INOCULO (Células/ml)	ACTIVIDAD (Ø de halo en mm)							
	<i>S. aureus</i>				<i>B. subtilis</i>			
	6d	7d	8d	9d	6d	7d	8d	9d
$1,2 \times 10^5$	24,4	25,0	25,4	25,0	18,4	20,0	20,0	20,0
$2,4 \times 10^4$	24,4	25,0	25,0	25,0	18,4	20,4	20,0	20,0
$1,2 \times 10^4$	23,7	25,4	25,4	25,0	18,0	20,0	20,4	20,0
$2,4 \times 10^3$	21,0	24,0	25,4	25,0	17,0	18,0	20,0	20,0
$2,4 \times 10^2$	17,0	21,0	24,7	25,4	16,0	18,4	20,0	20,0
$2,4 \times 10^1$	17,4	21,0	24,0	25,0	13,0	17,4	18,4	20,0

\* Los valores son media de tres experimentos

TABLA VI.- Actividad antimicrobiana en función del tamaño de inóculo de los microorganismos testigo.

INOCULO (Células/ml)	ACTIVIDAD (Ø de halo en mm)	
	<i>S.aureus</i>	<i>B.subtilis</i>
$10^3 - 10^4$	25,0	20,2
$10^4 - 10^5$	25,7	20,7
$10^5 - 10^6$	25,2	20,5
$10^6 - 10^7$	25,7	20,5
$10^7 - 10^8$	25,5	20,2
$10^8 - 10^9$	25,0	20,0

\* Los valores son media de cuatro experimentos

que no hay diferencias significativas en los diámetros de halo obtenidos. Sin embargo, se ha standarizado el inóculo, en las condiciones descritas en material y métodos, a fin de homogeneizar las mismas.

### 5.2.- TIEMPO DE INCUBACION

Los resultados correspondientes al estudio del tiempo óptimo de incubación se expresan en la tabla VII. En ella se observa que el máximo de producción se alcanza tras 7 días de incubación, manteniéndose constante - hasta los 25 días, donde sufre un ligero descenso. En los experimentos posteriores, los cultivos siempre se incubarán durante 7 días.

### 5.3.- MODALIDAD DE CULTIVO

Los resultados se expresan en la tabla VIII y muestran que en los cultivos en aireación y agitación se alcanzan niveles de producción del antimicrobiano inferiores a los alcanzados en estático, por lo que en experiencias sucesivas se emplea siempre esta modalidad.

TABLA VII.- Producción del antimicrobiano, en las condiciones standarizadas, con variación del tiempo de incubación.

TIEMPO (dias)	ACTIVIDAD ( $\emptyset$ de halo en mm)	
	<i>S. aureus</i>	<i>B. subtilis</i>
1	8,2	7,8
2	9,0	8,4
3	11,4	9,8
4	15,5	12,6
5	20,4	16,4
6	24,0	28,2
7	25,5	20,0
9	25,0	20,2
12	25,6	20,0
15	25,6	19,8
17	25,0	20,6
20	25,4	20,0
23	25,4	20,4
25	25,0	20,4
27	22,8	18,6
30	20,4	17,8

\* Los valores son media de cinco experimentos

TABLA VIII.- Producción del antimicrobiano a lo largo del tiempo, en las condiciones standarizadas, frente a *Saureus* y con variación de la modalidad de cultivo.

MODALIDAD DE CULTIVO	ACTIVIDAD (Ø de halo en mm)								
	1d	2d	3d	4d	5d	6d	7d	8d	9d
AGITACION	8,0	8,7	10,4	10,7	16,4	16,7	20,4	20,0	20,0
AIREACION	8,0	8,4	10,0	12,0	17,7	18,4	20,7	20,7	20,4
ESTATICO	8,0	9,0	11,4	15,7	20,4	24,0	25,7	24,7	25,7

\* Los valores son media de tres experimentos



#### 5.4.- TEMPERATURA DE INCUBACION

En la tabla IX se muestran los resultados obtenidos en la producción del antimicrobiano a lo largo del tiempo, en las condiciones standarizadas e incubando a 20°C, 28°C y 37°C. De dicha tabla se desprende que la producción se retrasa en el tiempo a medida que disminuye la temperatura. Sin embargo, la tasa de producción máxima se alcanza a 37°C.

#### 5.5.- pH DEL MEDIO

De todos los valores de pH estudiados, se observa que a pH 2,0 y 3,0 no hay crecimiento y por tanto, no se produce antimicrobiano. En la tabla X se muestran los resultados obtenidos al estudiar los distintos pH sin control durante el proceso de incubación. De la misma se puede deducir que el pH inicial óptimo para la producción está entre 6,5 y 7,5 . En cualquier caso, el pH final fue siempre de 8,5 .

Cuando se realiza un control de pH durante dicho proceso de incubación se observa que al no alcanzarse el pH básico final, disminuye la tasa de producción.

TABLA IX.- Producción del antimicrobiano a lo largo del tiempo, en las condiciones standarizadas, frente a *S.aureus* y con variación de la temperatura de incubación.

TEMPERATURA DE INCUBACION	ACTIVIDAD (Ø de halo en mm)								
	1d	2d	3d	4d	5d	6d	7d	8d	9d
20°C	8,0	8,4	9,0	9,7	12,4	16,0	18,4	21,0	21,0
28°C	8,0	8,4	9,7	12,4	16,0	18,7	22,4	24,0	24,0
37°C	8,4	9,0	11,4	15,7	20,4	24,0	25,7	25,0	25,0

\* Los valores son media tres experimentos

TABLA X .- Producción del antimicrobiano a lo largo del tiempo, en las condiciones standardizadas, frente a *S.aureus* y con variación del pH del medio

pH INICIAL DEL MEDIO	ACTIVIDAD (Ø de halo en mm)								
	1d	2d	3d	4d	5d	6d	7d	8d	9d
5,0	7,4	7,7	8,0	8,7	9,7	11,4	13,7	13,4	13,4
6,5	8,0	9,4	11,4	15,7	20,0	24,4	25,7	25,7	25,0
7,5	8,4	9,0	11,4	15,7	20,4	24,0	25,4	25,7	25,4
9,0	7,4	8,4	10,0	13,0	17,4	18,7	20,7	20,0	20,0

\* Los valores son media de tres experimentos

## 5.6.- TIEMPO DE PREDIFUSION

En la tabla XI se recogen los resultados de la actividad antimicrobiana en función del tiempo de predifusión. Se observa que no existen diferencias significativas entre los diferentes tiempos ensayados, aunque aparece un ligero incremento a partir de 1/2 hora. En posteriores experimentos se emplea dicho tiempo de predifusión.

## 5.7.- COMPOSICION DEL MEDIO DE CULTIVO

### 5.7.1.- CONCENTRACION DE GLUCOSA

Los resultados del efecto que ejerce la concentración de glucosa en la producción, se recogen en la tabla XII. Se observa un claro efecto inhibitor de la glucosa sobre la producción del antimicrobiano. Asimismo, el efecto neutralizador del carbonato cálcico adicionado al medio con glucosa, anula el efecto inhibitor de la misma, consiguiéndose niveles de producción análogos a los obtenidos cuando no se utiliza dicho azúcar.

### 5.7.2.- OTRAS FUENTES DE CARBONO

Los resultados obtenidos tras la adición de otras fuentes de carbono se recogen en la tabla XIII. En

TABLA XI.- Actividad antimicrobiana en función del tiempo de predifusión

TIEMPO DE PREDIFUSION (Horas)	ACTIVIDAD ( $\emptyset$ de halo en mm)	
	<i>S. aureus</i>	<i>B. subtilis</i>
0	23,6	18,6
1/4	25,4	20,4
1/2	25,6	20,0
1	25,6	20,0
3	25,0	19,6
6	25,4	20,0
8	25,4	20,4
12	25,0	20,0
24	25,4	20,4

\* Los valores son media de cinco experimentos

TABLA XII.- Efecto de la concentración de glucosa y del -  
carbonato cálcico sobre la producción del antimicrobiano  
en las condiciones standarizadas.

GLUCOSA ( % )	CO <sub>3</sub> Ca ( % )	ACTIVIDAD (Ø de halo en mm)	
		<i>S. aureus</i>	<i>B. subtilis</i>
0,0	0,0	25,7	20,4
0,2	0,0	22,0	16,7
0,5	0,0	19,4	13,7
1,0	0,0	16,4	10,4
1,5	0,0	13,0	9,7
2,0	0,0	10,0	8,0
1,0	0,5	25,7	20,0

\* Los valores son media de tres experimentos

TABLA XIII.- Producción del antimicrobiano, en las condiciones standarizadas, con variación de la fuente de Carbono

FUENTE DE CARBONO	ACTIVIDAD ( $\emptyset$ de halo en mm)	
	<i>S. aureus</i>	<i>B. subtilis</i>
ACETATO Na	24,4	17,0
CITRATO Na	24,7	17,4
FRUCTOSA	11,4	9,7
GLUCOSA	16,0	13,0
LACTOSA	18,4	16,0
MALATO Na	25,0	17,7
MANITOL	10,0	8,7
SACAROSA	10,0	8,4

\* Los valores son media de tres experimentos

la misma se observa que la utilización de otras fuentes de carbono no determinan aumento alguno en la producción del antimicrobiano.

### 5.7.3.- CONCENTRACION DE PEPTONA

En la tabla XIV se exponen los resultados correspondientes al estudio de las distintas concentraciones de peptona. De la misma se desprende que no hay diferencias significativas entre las diferentes concentraciones ensayadas, seleccionando la proporción de 0,1 % .

TABLA XIV.- Producción del antimicrobiano, en las condiciones standarizadas, con variación de la concentración de peptona

PEPTONA ( % )	ACTIVIDAD (Ø de halo en mm)	
	<i>S.aureus</i>	<i>B.subtilis</i>
0,1	25,7	20,0
0,2	25,7	20,0
0,5	25,0	20,0
1,0	25,0	19,7
2,0	24,4	19,7

\* Los valores son media de tres experimentos



#### 5.7.4.- OTRAS FUENTES DE NITROGENO

Los resultados obtenidos tras la adición de - otras fuentes de nitrógeno se exponen en la tabla XV. En la misma se observa que la sustitución de la peptona por extracto de levadura o por harina de semilla de soja, no determinan aumento en la producción de antimicrobiano, - por lo que seleccionamos la peptona como fuente de nitrógeno óptima.

TABLA XV.- Producción del antimicrobiano, en las condiciones standarizadas, con variación de la fuente de nitrógeno.

FUENTE DE NITROGENO	ACTIVIDAD ( $\emptyset$ de halo en mm)	
	<i>S. aureus</i>	<i>B. subtilis</i>
PEPTONA	25,7	20,4
H. SEMILLA DE SOJA	18,7	14,0
EXTRACTO LEVADURA	16,4	12,7

\* Los valores son media de tres experimentos

#### 5.7.5.- IONES METALICOS

Demostrado el efecto estimulador del ión cobre sobre la producción de la sustancia antimicrobiana, se creyó conveniente estudiar la posible influencia de otros iones metálicos. Los resultados se recogen en la tabla XVI y de la misma se deduce que el ión cobre es un factor imprescindible para la producción de la sustancia. Asimismo se estudia el efecto de las distintas concentraciones de dicho ión y los resultados se recogen en la tabla XVII. Se observa que la concentración óptima de ión cobre es de 1  $\mu\text{g/ml}$ .

TABLA XVI.- Producción del antimicrobiano, en las condiciones standarizadas, con distintos iones metálicos.

IONES METALICOS	ACTIVIDAD (Ø de halo en mm)	
	<i>S. aureus</i>	<i>B. subtilis</i>
M-2	0,0	0,0
M-2 + Ca <sup>++</sup>	0,0	0,0
M-2 + Cu <sup>++</sup>	25,4	20,0
M-2 + Fe <sup>++</sup>	0,0	0,0
M-2 + Fe <sup>+++</sup>	0,0	0,0
M-2 + Mg <sup>++</sup>	0,0	0,0
M-2 + Mn <sup>++</sup>	0,0	0,0
M-2 + Zn <sup>++</sup>	0,0	0,0

\* Los valores son media de tres experimentos

TABLA XVII.- Producción del antimicrobiano, en las condiciones standarizadas, con variación de la concentración de ión cobre

ION Cu <sup>++</sup> (µg/ml)	ACTIVIDAD (Ø de halo en mm)	
	<i>S.aureus</i>	<i>B.subtilis</i>
0,12	16,4	14,0
0,25	23,7	18,4
0,50	25,0	19,7
1,00	25,7	20,4
1,25	23,4	18,7
1,50	22,0	17,4
2,00	18,4	14,7
2,50	16,0	14,0

\* Los valores son media de tres experimentos

## 6.- CONDICIONES STANDARIZADAS

Estudiados los factores que influyen en la producción, se standarizan las condiciones con la finalidad de no introducir variantes y conseguir resultados comparables. Dichas condiciones se indican a continuación :

- 1.- Medio de aislamiento y conservación : Agar glucosado
- 2.- Medio de producción : Medio M-3
- 3.- Medio de revelado : Agar glucosado
- 4.- Inóculo del microorganismo TM-4 :  $1,2 \times 10^4$  cel/ml
- 5.- Inóculo de los microorganismos testigo :  $10^6$ - $10^7$  cel.
- 6.- Tiempo de incubación : 7 días
- 7.- Modalidad de cultivo : Estático
- 8.- Temperatura de incubación : 37°C
- 9.- pH inicial del medio de cultivo : 7,0
- 10.- Fuente de energía : Peptona
- 11.- Concentración de peptona : 0,1 %
- 12.- Iones metálicos : Cobre
- 13.- Concentración de cobre : 1 µg/ml
- 14.- Tiempo de predifusión : 1/2 hora

## 7.- ENSAYOS DE EXTRACCION

### 7.1.- EXTRACCION A PARTIR DEL MEDIO DE CULTIVO

Los resultados de la extracción con disolventes orgánicos a distintos pH se muestran en la tabla XVIII . De la misma se deduce que la recuperación total de la sustancia antimicrobiana se obtiene con acetato de etilo saturado en agua a pH 9.

Se ha comprobado que la recuperación máxima de actividad se consigue cuando se realizan tres extracciones. Asimismo se observa que no hay diferencias significativas entre la proporción solvente /caldo (V/V) 2:1 y 1:1, por lo que se selecciona la relación 1:1.

### 7.2.- EXTRACCION A PARTIR DE LAS CELULAS

Una vez rotas las células por sonicación o por ósmosis, se extrae la posible sustancia antimicrobiana - con acetato de etilo saturado en agua a pH 9. Los resultados obtenidos indican que no existe actividad intracelular.

TABLA XVIII.- Extracción del antimicrobiano con distintos disolventes orgánicos a diferentes pH.

DISOLVENTE	ACTIVIDAD (Ø de halo en mm)					
	pH = 3		pH = 6		pH = 9	
	FA	FO	FA	FO	FA	FO
TETRACLORURO DE C.	25,0	0,0	25,2	0,0	25,4	0,0
TETRACLORURO DE C. SATURADO EN AGUA	25,4	0,0	25,0	0,0	25,2	0,0
CLOROFORMO	22,0	9,4	20,4	11,6	20,0	11,6
CLOROFORMO SATURADO EN AGUA	9,4	20,0	10,6	20,2	9,0	22,2
BENCENO	25,4	0,0	25,6	0,0	25,4	0,0
BENCENO SATURADO EN AGUA	25,4	0,0	25,4	0,0	25,6	0,0
ETER ETILICO	20,6	10,0	21,8	9,4	19,6	11,2
ETER ETILICO SATURADO EN AGUA	20,2	10,6	19,4	11,8	17,4	13,0

TABLA XVIII.- (Continuación)

DISOLVENTE	ACTIVIDAD ( $\emptyset$ de halo en mm)					
	pH = 3		pH = 6		pH = 9	
	FA	F0	FA	F0	FA	F0
ETER DE PETROLEO	25,6	0,0	25,4	0,0	25,6	0,0
ETER DE PETROLEO SATURADO EN AGUA	25,4	0,0	25,2	0,0	25,6	0,0
ACETATO DE ETILO	15,0	14,8	13,0	16,4	12,0	17,6
ACETATO DE ETILO SATURADO EN AGUA	12,6	16,6	11,4	18,0	0,0	25,6
ALCOHOL AMILICO	21,0	10,4	19,8	11,6	16,2	11,4
ALCOHOL AMILICO SATURADO EN AGUA	20,0	11,6	18,0	13,0	14,6	16,0
n-BUTANOL	14,6	15,2	13,6	16,8	12,8	17,4
n-BUTANOL SATURADO EN AGUA	12,6	17,4	12,2	18,0	10,6	19,4
ACTIVIDAD DEL EXTRACTO BRUTO ANTES DE LA EXTRACCION (mm) .....						25,6

\* Los valores son media de cinco experimentos



## 8.- ENSAYOS DE PURIFICACION

### 8.1.- DIALISIS

Los experimentos de diálisis del "Extracto Cru- do" realizados a 4°C y frente a agua destilada, mostraron que la sustancia activa dializa cuantitativamente a las 24 horas. La actividad se recupera del agua de diálisis, mientras que el contenido de la tripa de diálisis es inac- tivo.

### 8.2.- CROMATOGRAFIA EN COLUMNA DE SEPHADEX

De todos los tipos de Sephadex ensayados, se se- lecciona el Sephadex G-50, por ser el único que no presen- ta problemas de adsorción y permite la purificación de la sustancia antimicrobiana.

En la Tabla XIX se expresan los valores de acti- vidad de las distintas fracciones recogidas por cromato- grafía en Sephadex G-50 (Columna K-26/70).

TABLA XIX.- Actividad antimicrobiana, frente a *S. aureus* , de las -  
distintas fracciones obtenidas trás la purificación por Sephadex G-50

FRACCION	ACTIVIDAD (Ø halo en mm)	FRACCION	ACTIVIDAD (Ø halo en mm)
1-53	0,0	61	17,4
54	8,2	62	16,6
55	11,0	63	15,4
56	13,6	64	15,0
57	15,4	65	13,0
58	15,8	66	10,6
59	17,0	67	9,0
60	17,4	68...	0.0

\* Los valores son media de cinco experimentos

### 8.3.- RESINAS DE INTERCAMBIO IONICO

Las resinas de intercambio iónico se utilizan con doble finalidad; en primer lugar como sistema de purificación por retener impurezas y en segundo para conocer el carácter iónico de la sustancia antimicrobiana.

En nuestro caso, la actividad antimicrobiana no se retiene en resina: ácida ni básica, por lo que se deduce que es una sustancia no cargada.

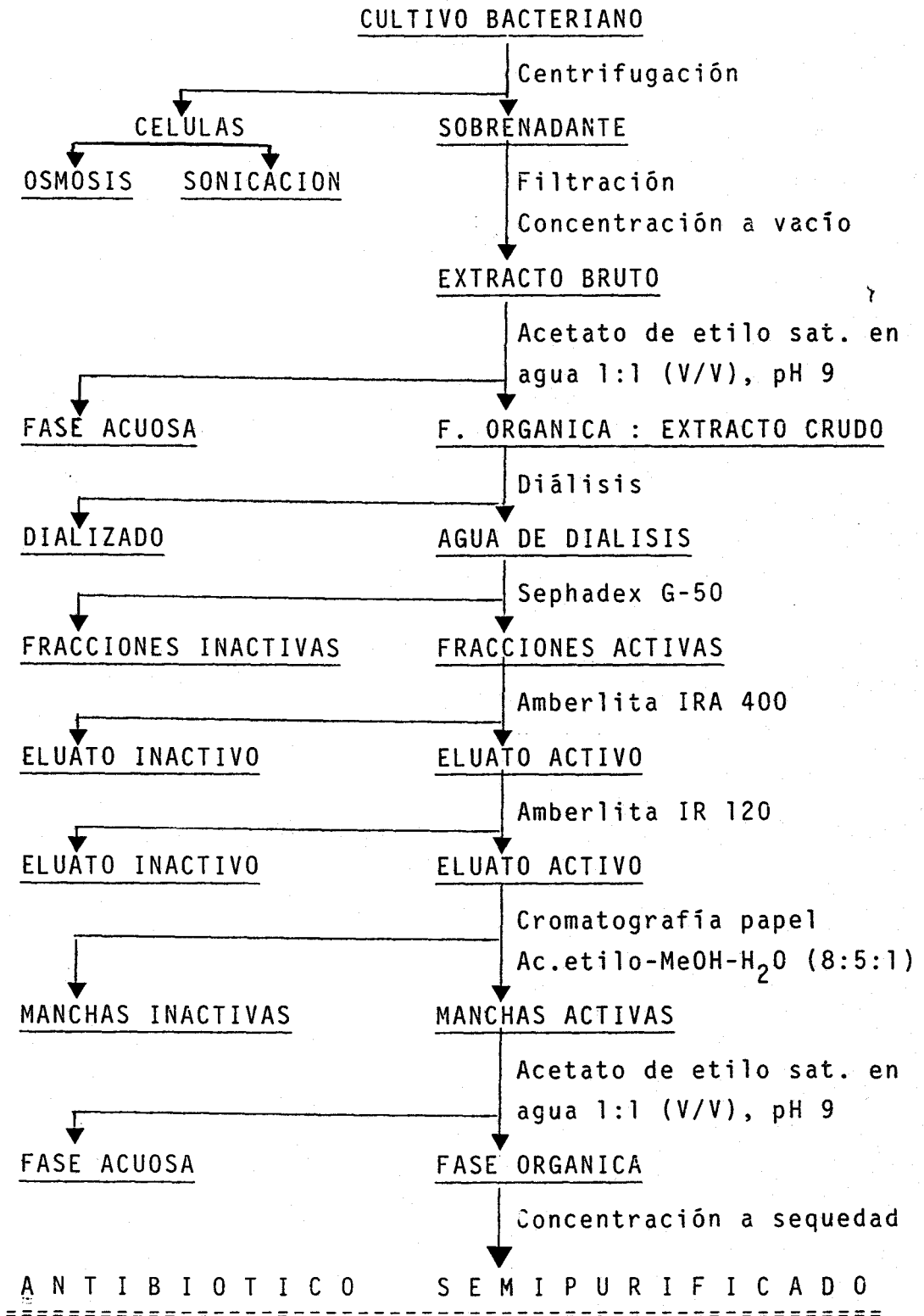
## 9.- ESQUEMA DE EXTRACCION Y PURIFICACION

Con los datos proporcionados en las distintas etapas de la purificación se elabora un esquema general del proceso de extracción y purificación (Figura 1). Así mismo se ha elaborado una tabla (XX) donde se expresa la actividad de los distintos grados de pureza conseguidos en dichas etapas.

TABLA XX.- Actividad de las distintas etapas de purificación del antibiótico en función del peso de residuo seco.

GRADO DE PUREZA	PESO RESIDUO SECO (mg/ml)	ACTIVIDAD (U/mg)
EXTRACTO BRUTO	0,375	61,3
EXTRACTO CRUDO	0,312	73,7
DIALISIS	0,278	82,7
SEPHADEX G-50	0,194	118,5
AMBERLITAS	0,083	277,10
C. PAPEL	0,045	511.1

FIGURA 1.- ESQUEMA DE EXTRACCION Y PURIFICACION



## 10.- TECNICAS CROMATOGRAFICAS

### 10.1.- CROMATOGRAFIA EN CAPA FINA

La cromatografía en capa fina se ha utilizado para obtener un dato más en la caracterización de la sustancia y nos da una idea acerca de la polaridad de la misma.

En la tabla XXI se expresan los valores de  $R_f$  de la sustancia antimicrobiana obtenidos por cromatografía en capa fina con distintos eluyentes. En la misma se observa que la sustancia no se mueve del origen con ninguno de los eluyentes probados, comportamiento que corresponde a una sustancia de polaridad elevada.

### 10.2.- CROMATOGRAFIA EN PAPEL

La cromatografía en papel se ha utilizado, fundamentalmente, como sistema de purificación y los  $R_f$  de la sustancia antimicrobiana en los distintos eluyentes - constituyen un factor más en la caracterización de la mis

ma (Tabla XXII).

De todos los sistemas solventes ensayados, se selecciona acetato de etilo-metanol-agua (8:5:1) para la purificación, por ser el que proporciona mayor separación entre las manchas.

### 10.3.- CROMATOGRAFIA DE pH

Los valores de Rf obtenidos por cromatografía en papel con variación de pH, se muestran en la gráfica 6. Se observa que dichos valores de Rf se mantienen constantes a cualquier pH.

De acuerdo con BETINA (1960), dicho comportamiento corresponde a sustancias neutras.

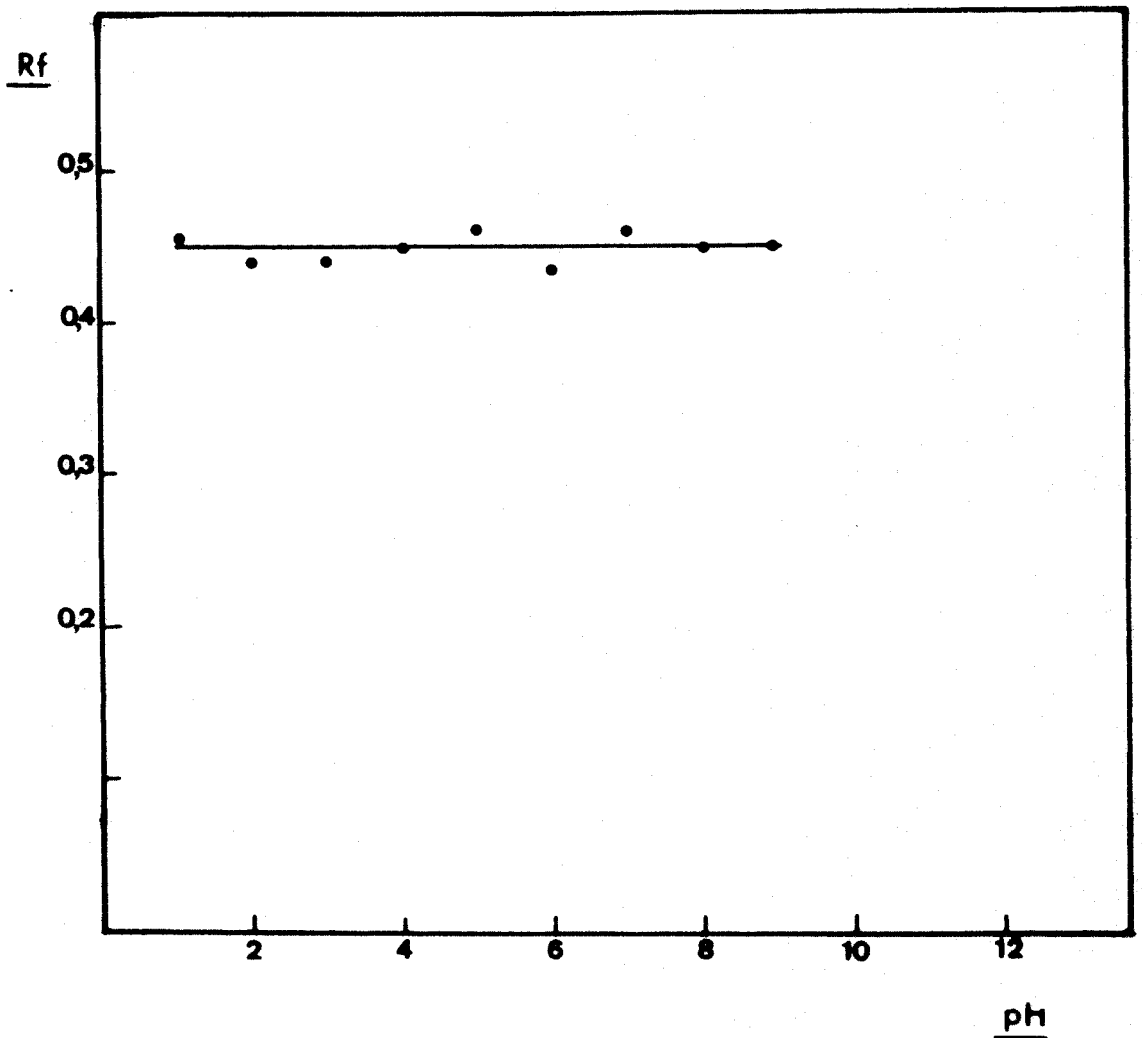
TABLA XXI.- Valores de Rf de la sustancia antimicrobiana obtenidos por cromatografía en capa fina con distintos eluyentes.

ELUYENTE	Rf
AGUA	0,0
METANOL	0,0
ETANOL	0,0
METANOL-CLOROFORMO (9:1)	0,0
METANOL-CLOROFORMO (1:9)	0,0
BENCENO-ACETONA (3:2)	0,0

TABLA XXII.- Valores de Rf de la sustancia antimicrobiana obtenidos por cromatografía en papel con distintos eluyentes.

ELUYENTE	Rf
n-BUTANOL-ACETICO-AGUA (4:1:5)	0,63
n-BUTANOL-ACETICO-AGUA (4:1:2)	0,32
n-BUTANOL-ACETICO-PIRIDINA-AGUA (15:3:10:12)	0,47
n-BUTANOL-ACETICO-PIRIDINA-AGUA (10:1:6:4)	0,31
ACETATO ETILO-METANOL-AGUA (8:5:1)	0,53
ACETATO ETILO-ACETICO-AGUA (3:1:1)	0,65
ACETATO ETILO-PROPANOL-AGUA (1:7:2)	0,70
ETANOL-NH <sub>4</sub> OH 28%-AGUA (80:5:12)	0,24





**GRAFICA 6.-** Variación del Rf del antimicrobiano en función del pH cromatográfico .

## 11.- TECNICAS ELECTROFORETICAS

La electroforesis se ha empleado para conocer la capacidad de ionización de la sustancia antimicrobiana al someterla a un campo eléctrico. De todos los parámetros de intensidad y voltaje ensayados, es aconsejable no usar más de 10 mAmp y 300 voltios, ya que aumenta la evaporación y se queman las tiras de papel.

Observado el comportamiento de la sustancia activa en cromatografía de papel a distintos pH, se creyó conveniente estudiar la electroforesis en las mismas condiciones. Se comprueba que no aparece movilidad electroforética a ninguno de los pH ensayados como corresponde a una sustancia no ionizable.

## 12.- TECNICAS ESPECTROFOTOMETRICAS

### 12.1.- ESPECTROSCOPIA DE ULTRAVIOLETA-VISIBLE

El espectro de absorción realizado a longitudes de onda comprendidas entre 800 nm y 190 nm se muestra en la figura 2 . En la misma se observa que no existe máximo de absorción, apareciendo un codo de inflexión a 270 nm (sh).

### 12.2.- ESPECTROSCOPIA INFRARROJA

El espectro de infrarrojo (IR) se ilustra en la figura 3 . Dicho espectro muestra bandas de absorción características, tales como la de  $3500\text{ cm}^{-1}$  correspondiente a los grupos hidroxilos y aminas ;  $2900\text{ cm}^{-1}$  para las vibraciones de tensión correspondientes a los enlaces C-H de las cadenas carbonadas ;  $1675\text{ cm}^{-1}$ ,  $1525\text{ cm}^{-1}$  y  $1465\text{ cm}^{-1}$ , asociadas a las vibraciones de tensión de los grupos carbonilos (amidas, esterés, etc.) y  $1120\text{ cm}^{-1}$  que probablemente se debe a la tensión de los enlaces carbono-oxígeno de eterés y alcoholes.

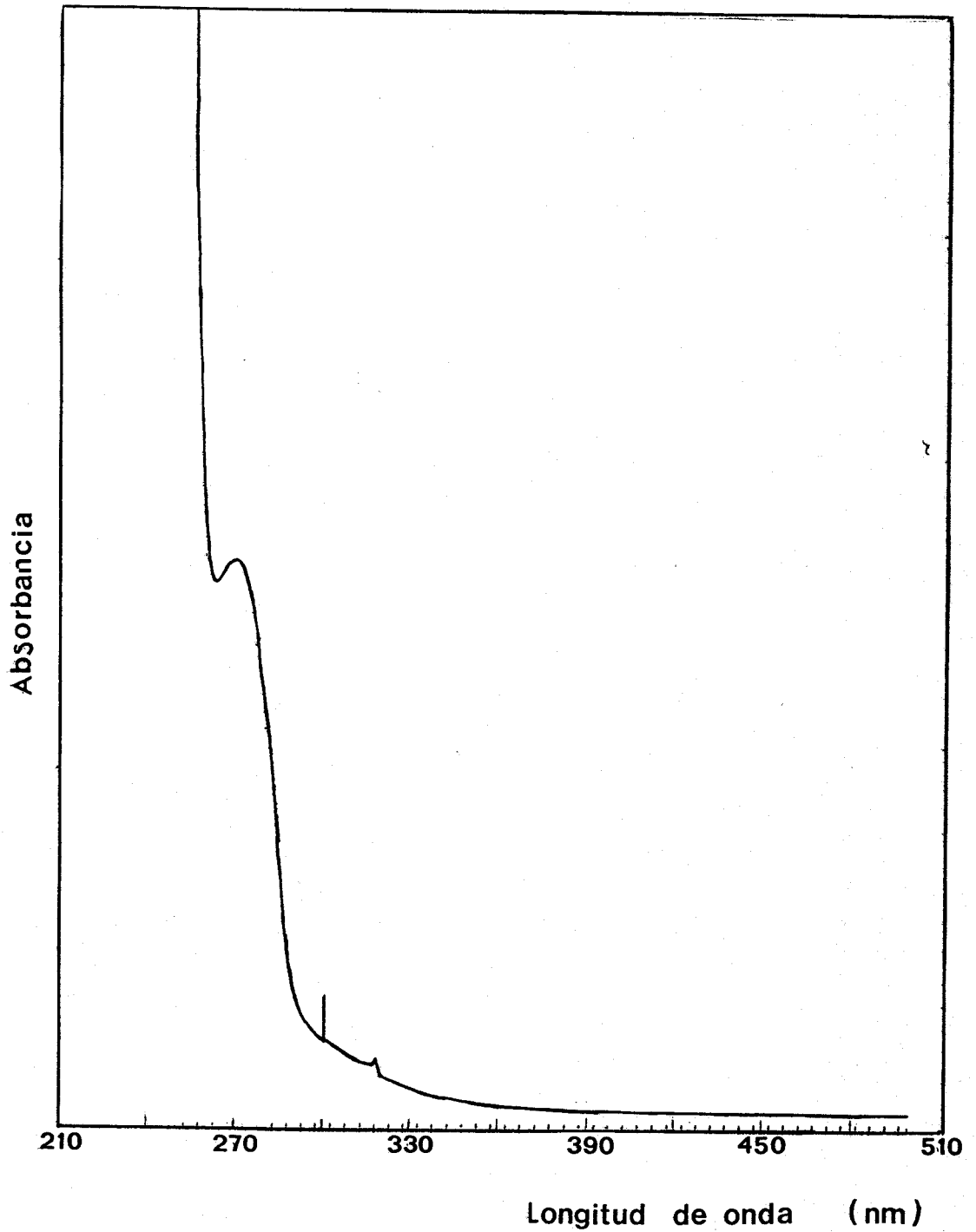


FIGURA 2.+ Espectro Ultravioleta-Visible de la sustancia antimicrobiana.

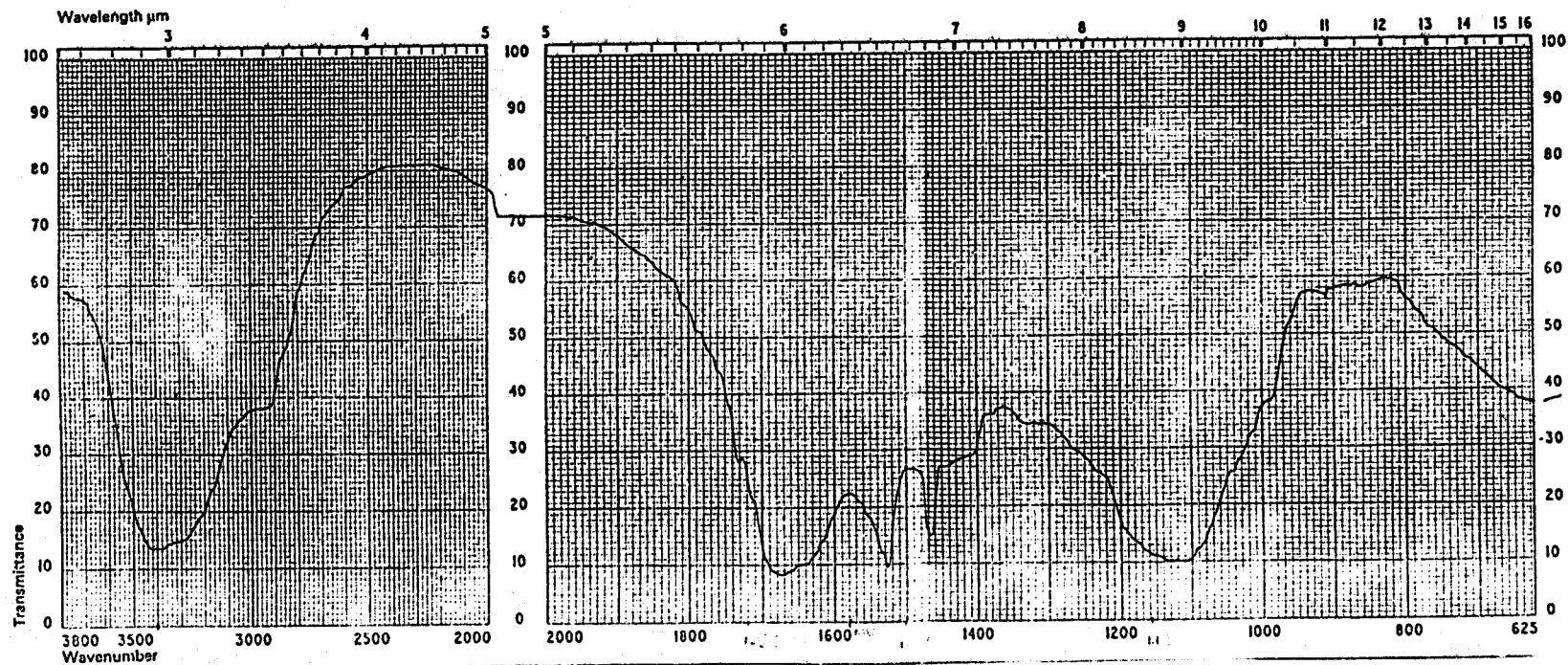


FIGURA 3.- Espectro de Infrarrojo de la sustancia antimicrobiana realizado en pastillas de bromuro potásico.

## 13.- CARACTERISTICAS FISICO-QUIMICAS

### 13.1.- ESTABILIDAD

Los resultados correspondientes a la actividad de la sustancia antimicrobiana a lo largo del tiempo muestran que dicho antimicrobiano es estable al citado parámetro (Tabla XXIII).

De acuerdo con las condiciones establecidas en el apartado correspondiente de material y métodos, se realizan medidas de actividad de la sustancia antimicrobiana sometida a distintas temperaturas, cuyos valores se recogen en la tabla XXIV. De la misma se deduce que dicha sustancia se mantiene estable hasta 75°C, disminuyendo la actividad a partir de dicha temperatura.

El estudio del pH se ha realizado en dos etapas; en principio la sustancia se lleva a distintos valores de pH, comprobándose en cada caso la influencia sobre la actividad antimicrobiana. Estos resultados se muestran en la tabla XXV y de la misma se deduce que, efectivamente, el pH influye en la actividad antimicrobiana.

TABLA XXIII.- Actividad de la sustancia antimicrobiana a lo largo del tiempo

TIEMPO	ACTIVIDAD (U/ml)
1 DIA	23,0
1 SEMANA	22,5
1 MES	23,0
3 MESES	22,0
6 MESES	23,0
12 MESES	22,5
24 MESES	23,0
ACTIVIDAD CONTROL	23,0

TABLA XXIV.- Actividad de la sustancia antimicrobiana en función de la temperatura

TEMPERATURA	ACTIVIDAD (U/ml)
- 5°C	23,0
5°C	23,0
12°C	22,5
37°C	22,5
50°C	23,0
75°C	23,0
100°C	7,5
120°C	5,0
150°C	6,0
ACTIVIDAD CONTROL	23,0

na, originando un aumento a pH básico y un descenso a pH ácido. Una vez finalizada esta etapa, todas las soluciones se llevan al pH original (pH 9), comprobándose nuevamente la actividad. En todos los casos, la actividad alcanza el valor del control, por lo que se deduce que la sustancia antimicrobiana es estable a los cambios de pH.

TABLA XXV.- Actividad de la sustancia antimicrobiana en función - del pH

pH SUSTANCIA	ACTIVIDAD (U/ml)	pH BLANCO	ACTIVIDAD(U/ml)
2,0	4,0	2,0	1,0
3,0	5,0	3,0	0,0
5,0	6,5	5,0	0,0
6,0	14,0	6,0	0,0
7,0	14,0	7,0	0,0
8,0	23,0	8,0	0,0
10,0	23,0	10,0	0,0
12,0	18,0	12,0	0,0
ACTIVIDAD CONTROL (pH 9)			23,0



### 13.2.- SOLUBILIDAD

La sustancia antimicrobiana presenta una solubilidad en agua muy elevada y se estudia la solubilidad relativa en el resto de los disolventes, diferenciándose cuatro grados : Es muy soluble en agua, metanol, etanol, propanol, n-butanol, alcohol amílico y acetato de etilo - saturados en agua ; soluble en metanol, etanol, propanol, n-butanol, alcohol amílico, acetona, acetato de etilo y ácido acético ; parcialmente soluble en eter etílico, cloroformo y piridina e insoluble en tetracloruro de carbono, benceno y eter de petroleo.

### 13.3.- ANALISIS ELEMENTAL

Los resultados del análisis elemental cualitativo se expresan en la tabla XXVI, donde se refleja la naturaleza orgánica de la sustancia antimicrobiana, así como la presencia de nitrógeno y azufre y ausencia de halógenos.

### 13.4.- REACCIONES COLOREADAS

En la tabla XXVII se muestran los resultados de las reacciones coloreadas, observándose que dan cla-

TABLA XXVI.- Análisis elemental cualitativo de la sustancia antimicrobiana.

ANALISIS	RESULTADO
NATURALEZA ORGANICA	Positivo
HALOGENOS	Negativo
NITROGENO	Positivo
AZUFRE	Positivo

TABLA XXVII.- Reacciones coloreadas

REACCION	RESULTADO
NITROCROMICA	Positiva débil
SCHIFF	Positiva
EHRlich	Negativa
CLORURO FERRICO	Negativa
HIDROXIDO AMONICO	Negativa
BALJET	Negativa
ABERHALDEN	Positiva
BIURET	Negativa
XANTOPROTEICA	Negativa
FEHLING	Positiva débil
MOLISCH	Positiva débil

ramente positivas la reacción de Schiff y reacción de -  
Aberhalden, quedando dudosas las reacciones nitrocrómica,  
de Fehling y de Molisch y el resto negativas. Esto sugie  
re la presencia de grupos aldehídos y aminos en la compo-  
sición del antimicrobiano.

## 14.- CARACTERISTICAS BIOLÓGICAS

### 14.1.- ESPECTRO ANTIMICROBIANO Y CMI

En la tabla XXVIII se muestra el espectro de acción del antimicrobiano expresado en concentración mínima inhibitoria (CMI). En la misma se puede observar que dicho antibiótico es activo frente a bacterias gram (+) y levaduras, no presentando actividad frente a bacterias gram (-). Es de destacar que la máxima sensibilidad la presentan *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus*, *Corynebacterium agropyri* y *Candida psedotropicalis*.

### 14.2.- MODO DE ACCION Y CMB

Se determina la concentración mínima bactericida (CMB) frente a *S.aureus* y *B.subtilis*, resultando ser de 100 µg/ml y 200 µg/ml respectivamente, lo que muestra que dicha sustancia antimicrobiana tiene efecto bactericida a concentraciones superiores a la CMI.

TABLA XXVIII.- Espectro antimicrobiano del antibiótico expresado en Concentración Mínima Inhibitoria (CMI)

MICROORGANISMO TESTIGO	CMI ( $\mu\text{g/ml}$ )
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 14579	180
<i>Bacillus cereus</i> var. <i>mycoides</i>	150
<i>Bacillus megaterium</i> ATCC 33085	150
<i>Bacillus pumilus</i> ATCC 14884	160
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	120
<i>Corynebacterium agropyri</i> MV	90
<i>Micrococcus flavus</i> ATCC 10240	160
<i>Micrococcus lysodeikticus</i> ATCC 4698	160
<i>Nocardia</i> sp GR	170
<i>Sarcina lutea</i> ATCC 9341	150
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	90
<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 12228	80
<i>Streptococcus faecalis</i> ATCC 10541	260

TABLA XXVIII.- (Continuación)

MICROORGANISMO TESTIGO	CMI ( $\mu\text{g/ml}$ )
<i>Alcaligenes faecalis</i> CCM 2763	> 400
<i>Bordetella bronchiseptica</i>	> 400
<i>Enterobacter cloacae</i> ATCC 23355	> 400
<i>Escherichia coli</i> CCM 180	> 400
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	> 400
<i>Escherichia coli</i> k12 ATCC 23725	> 400
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 10031	> 400
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 13883	> 400
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> ATCC 6042	> 400
<i>Proteus vulgaris</i> ATCC 13315	> 400
<i>Providencia stuartii</i>	> 400
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> F 6852	> 400
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> GR 6063	> 400
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	> 400
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 25619	> 400
<i>Salmonella</i> sp	> 400
<i>Salmonella gallinarum</i>	> 400
<i>Salmonella typhi</i> ser. London	> 400
<i>Salmonella typhimurium</i> VS 65	> 400
<i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 14028	> 400
<i>Serratia marcescens</i> ATCC 8100	> 400
<i>Yersinia frederiksenii</i> GR 8386	> 400

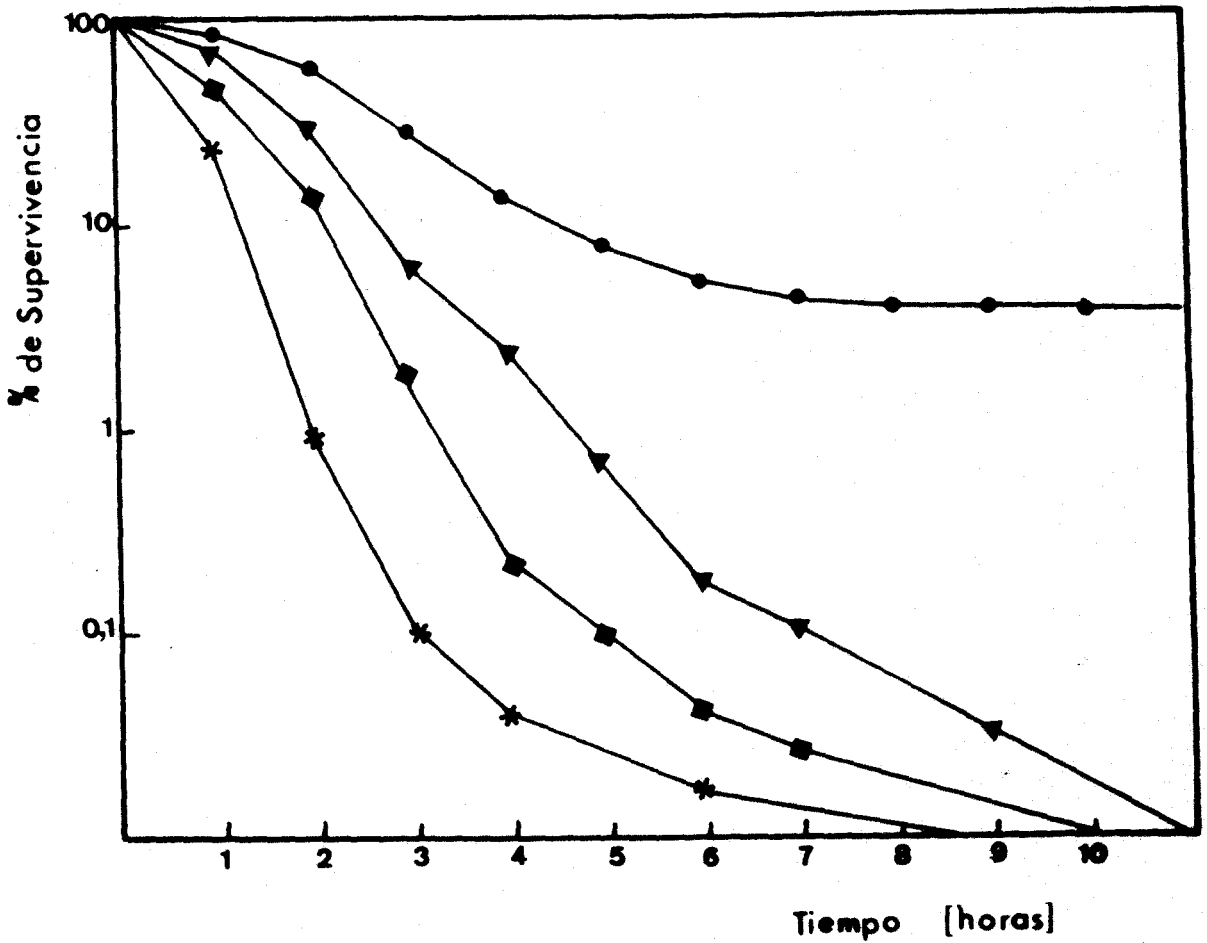
TABLA XXVIII.- (Continuación)

MICROORGANISMO TESTIGO	CMI ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )
<i>Candida albicans</i> SQ 1580	220
<i>Candida guillermondi</i> ATCC 2210	140
<i>Candida pseudotropicalis</i> ATCC 8553	80
<i>Candida tropicalis</i> SQ 1647	280
<i>Sacharomyces cerevisiae</i> SQ 1600	180
<i>Torula utilissima</i> CCB	160

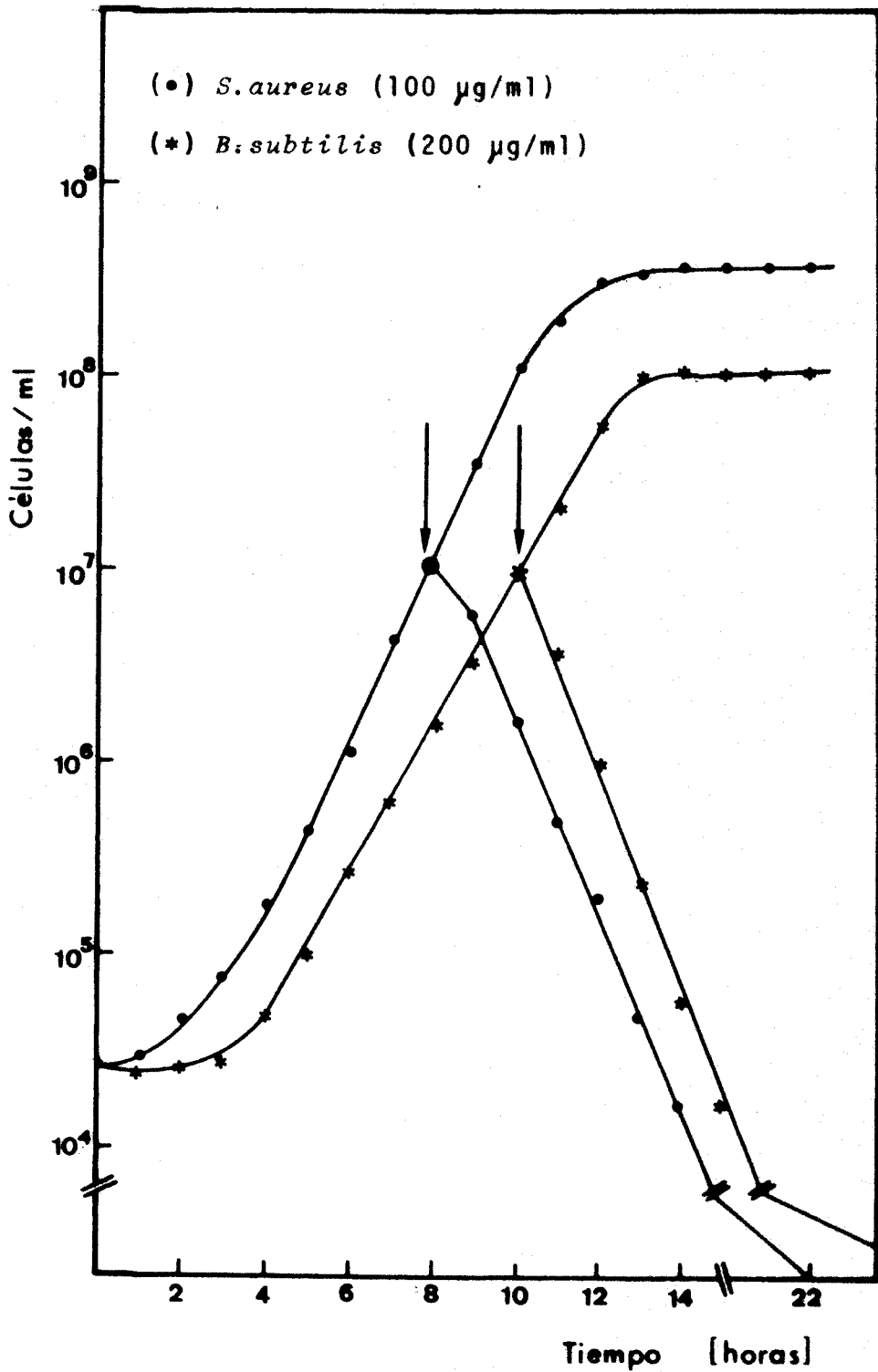
En la gráfica 7 se expresa la supervivencia de *Staphylococcus aureus* en contacto con el antibiótico a distintas concentraciones. De ella se deduce que la menor concentración bactericida es de 100 µg/ml del antimicrobiano mantenido en contacto durante 11 horas. Igualmente se observa que al aumentar la concentración de antibiótico disminuye el tiempo de contacto necesario para conseguir el efecto bactericida.

Con la finalidad de conocer el efecto del antimicrobiano sobre las distintas fases de crecimiento de los microorganismos testigo, se han adicionado idénticas concentraciones del antibiótico en las diferentes etapas de la curva de crecimiento. Por estos estudios se comprueba que es en la fase exponencial donde el agente ejerce un mayor efecto sobre la viabilidad de dichos microorganismos. Como se observa en la gráfica 8, sólo se ha representado el efecto del agente antimicrobiano sobre el microorganismo en fase exponencial de crecimiento. De la misma se deduce que dicho antimicrobiano ejerce un drástico efecto sobre el microorganismo testigo, llegando a ser bactericida en un período de tiempo de 14 horas para *Staphylococcus aureus* y 17 para *Bacillus subtilis*.





GRAFICA 7.- Letalidad de *Staphylococcus aureus* frente a diferentes concentraciones de antimicrobiano a lo largo del tiempo de exposición. Las concentraciones utilizadas fueron : (●) 90 µg/ml , (▲) 100 µg/ml , (■) 200 µg/ml (\*) 400 µg/ml



**GRAFICA 8.-** Efecto del agente antimicrobiano sobre la viabilidad de los microorganismos testigo en fase exponencial de crecimiento.

## 15.- EXPERIMENTOS EN ANIMALES

### 15.1.- TOXICIDAD AGUDA Y DOSIS LETAL-50

Una vez establecida la eficacia del antibiótico "in vitro", se procede a realizar ensayos "in vivo", para los cuales es imprescindible conocer la toxicidad y dosis letal-50 (DL<sub>50</sub>).

Los resultados obtenidos ponen de manifiesto la atoxicidad del antibiótico, ya que el porcentaje de mortalidad fue del 0% en todos los lotes, a pesar de utilizar cantidades muy elevadas de antimicrobiano en relación con la dosis terapéutica.

### 15.2.- EFFECTIVIDAD DEL ANTIBIOTICO "IN VIVO"

Demostrada la atoxicidad del antibiótico, se comprueba la efectividad del mismo en ratones infectados.

La infección se provoca con un microorganismo patógeno para el ratón, tal como *Staphylococcus aureus*,

que inoculado subcutaneamente produce lesiones que se manifiestan por abscesos localizados en la piel y aumento de vascularización. Trás el tratamiento de los ratones con la dosis terapéutica de antibiótico (150 mg/Kg animal) durante cinco días, se procede a anestesiarlos a muerte y observar las posibles lesiones aparecidas. Se comprueba la presencia de abscesos y aumento de vascularización en el lote control y, por el contrario, ausencia total de dichas lesiones en los animales tratados (Figuras 4 y 5). Esto demuestra la efectividad del antibiótico "in vivo".



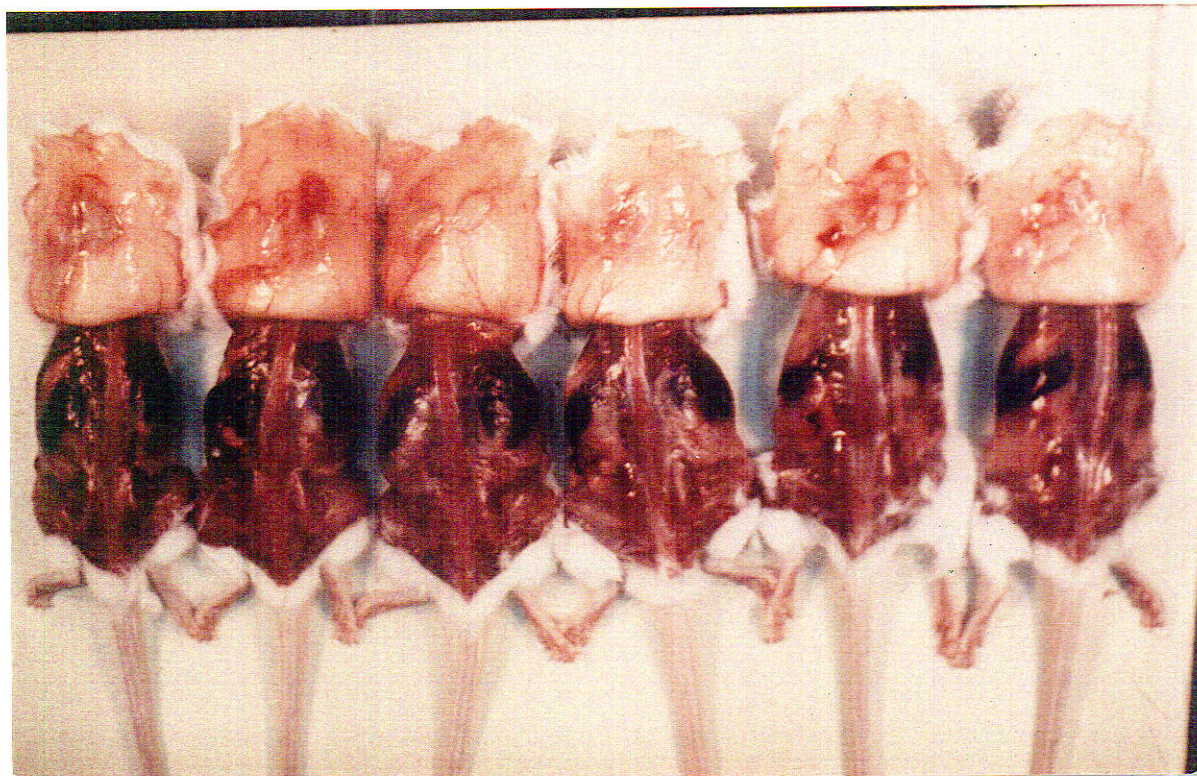


FIGURA 4.- Lote control de ratones infectados con *Staphylococcus aureus* .

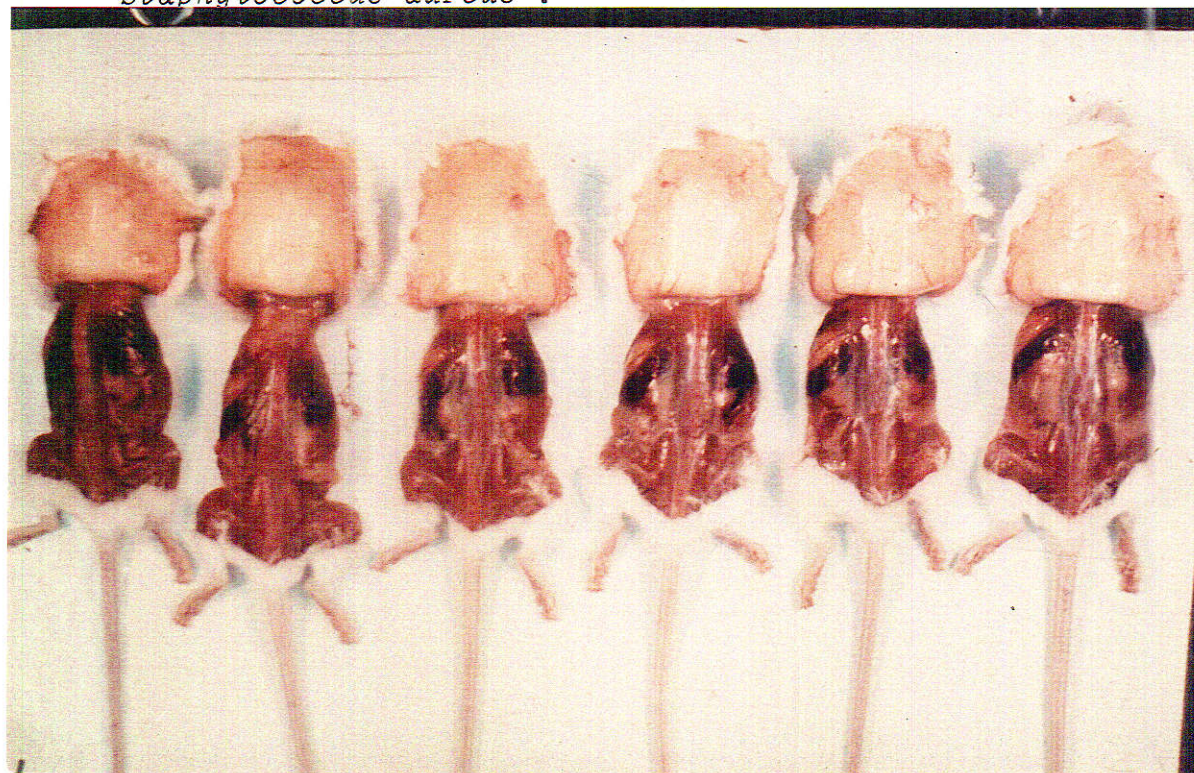


FIGURA 5.- Lote de ratones infectados con *Staphylococcus aureus* y tratados con el antimicrobiano.

## DISCUSSION



Como ya avanzamos anteriormente, este trabajo se realiza con el objetivo primario de aislar microorganismos autóctonos de suelos virgen poco estudiados desde el punto de vista microbiológico. Esto nos podría permitir encontrar microorganismos taxonómicamente diferentes a los ya descritos en cuanto a la producción de antimicrobianos o bien, productores de sustancias antibióticas de distinta naturaleza a las conocidas. Así mismo, se estudian métodos para la producción, extracción y purificación de un nuevo agente antimicrobiano producido por una cepa de *Pseudomonas aeruginosa* a la que hemos denominado TM-4.

Obtenidas cantidades suficientemente grandes de antibiótico se procede al estudio sobre su caracterización, toxicidad y efectos terapéuticos en animales de laboratorio previamente infectados

En primer lugar hay que hacer resaltar que -- *Pseudomonas aeruginosa* TM-4 produce un antibiótico de una manera constante, siempre que las condiciones de cultivo permitan su desarrollo. No obstante, desde el punto de vista cuantitativo, la cantidad de antibiótico produ

cido está influenciada en mayor o menor grado, según - los casos, por distintos factores.

Por lo que respecta al tamaño de inóculo del microorganismo productor se ha puesto de manifiesto que la producción está directamente correlacionada con la fase de crecimiento del microorganismo. Esto se ha podido demostrar utilizando diferentes tamaño de inóculo y, como se observa en la tabla correspondiente, si el número de células es bajo la fase estacionaria se retrasa y con ella la producción de la sustancia antimicrobiana. En todos los ensayos realizados sobre este punto observamos que la síntesis de antibiótico alcanza el mismo nivel, aunque a diferentes tiempos. Así mismo, el efecto del tamaño de inóculo de los microorganismos testigo sobre la actividad del antimicrobiano es independiente de la misma, hecho que concuerda con los resultados obtenidos por NORRBY y JONSSON (1983) para la actividad del norfloxacin, aunque no coincide con los obtenidos por NOTO y col. (1982) que encuentran ligeras diferencias cuando los microorganismos testigo son gram (-) y diferencias moderadamente altas para los microorganismos gram (+). Igualmente, LAFERRIERE y col. (1983) demuestran que el tamaño de inóculo tiene un efecto determinante sobre la actividad de distintas sustancias cuando utilizan *Haemophilus influenzae* como microorganismo testigo.



Los estudios destinados a determinar el tiempo óptimo de producción de la sustancia activa indican que la actividad se detecta ya durante la fase exponencial de crecimiento, aunque el máximo se alcanza tras 7 días de incubación. Este hecho se podría explicar por la existencia de ciertos pseudometabolitos secundarios que se excretan durante la tropofase (WEINBERG, 1970 ; WEINBERG, 1971 ; GROSS y DEVAY, 1977 ; BEAUDET y col., 1982), o por la presencia de enzimas antibiótico sintetasa que actúan durante la fase de crecimiento exponencial (DEMAIN, 1968 ; DEMAIN, 1971 ; WEINBERG, 1974). Sin embargo, esto no es aplicable a todos los casos, ya que algunos autores (BU'LOCK, 1961 ; PAULUS y GRAY, 1964 ; HAAVIK, 1974a; HAAVIK, 1974b) observan que la producción comienza en la fase estacionaria. De cualquier forma, teniendo en cuenta la bibliografía consultada, no se puede dar una norma general en cuanto a la relación entre producción de antibióticos y fase de crecimiento del microorganismo productor, pues cualquier modificación genética y nutricional podría hacer variar el momento de producción.

Determinado el tiempo óptimo de producción, ésta se mantiene durante un largo período de tiempo, cosa que no sucede con otros antimicrobianos estudiados (AMANO y col., 1980 ; BEAUDET y col., 1982).

La modalidad de cultivo parece influir sobre la producción de metabolitos y en la mayoría de los casos se eleva el nivel de producción oxigenando el medio bien por agitación o por aireación (WEINBERG, 1970; ARIAS y col., 1976 ; BARKER y col., 1979 ; KONDO y col., 1979; VEIGA, 1979). Sin embargo, en otros casos la producción se puede favorecer manteniendo los cultivos con baja tasa de oxígeno (VOLBRECHT, 1982a ; VOLBRECHT 1982b). En nuestro caso, la modalidad óptima para la producción consiste en mantener los cultivos en estático, modalidad que mantiene la concentración de oxígeno relativamente baja. Esto se podría explicar porque situaciones de exceso de oxígeno pueden determinar una disminución en la producción de metabolitos o una inactivación de los mismos por oxidación.

El control del metabolismo es muy sensible a los cambios de temperatura y la acción de ésta se relaciona con la formación de las sintetetasas responsables de la producción de antibióticos. Una alteración de la temperatura puede traer consigo la inducción o inhibición de determinadas enzimas represoras de las sintetetasas específicas (DEMAIN, 1972). Sin embargo, otros autores (WEINBERG, 1974 ; ARIAS y col., 1976) piensan que la temperatura no es un factor limitante, aunque puede modificar los nive-

les de producción.

Podemos diferenciar entre temperatura óptima - para el crecimiento celular; para la formación de las sin tetasas y para la activación de las mismas. Hay veces en donde las temperaturas óptimas son diferentes (DEMAIN, + 1968 ; GILL, 1975) y otros casos en donde coinciden (PAU LUS, 1967 ; WEINBERG, 1974). De los resultados obtenidos se desprende que a medida que aumenta la temperatura, des de 20°C hasta 37°C, se acelera el crecimiento y con ello la producción, alcanzándose así el nivel máximo a 37°C.

El pH inicial del medio tiene una marcada in - fluencia sobre el crecimiento de los microorganismos y, - como consecuencia de ello, sobre la producción de antimicrobianos. Se ha comprobado que los valores extremos de - pH inhiben el crecimiento y con ello la producción (HAA - VIK, 1974b). En nuestro caso el pH influye notablemente - sobre la producción, alcanzándose un máximo rendimiento cuando el pH inicial del medio está comprendido entre 6,5 y 7,5 . De cualquier forma, en todos los ensayos el pH - final alcanzado fue 8,5 .

La glucosa puede ejercer un efecto muy variado sobre la producción de antimicrobianos. Así, de una parte puede actuar como inhibidor de la síntesis de antibióti -

cos, bien porque se comporte como catabolito de represión de las sintetasas específicas (WEINBERG, 1970 ; DEMAIN, 1972 ; DEMAIN, 1974 ; DREWS y DEMAIN, 1977) o bien por el descenso de pH producido como consecuencia de su metabolización (HAAVIK, 1974a; HAAVIK, 1974B ; BARUA y SHELEF, 1980), ya que al neutralizar con carbonato cálcico se elimina dicha inhibición. Estos fundamentos podrían explicar los resultados obtenidos en nuestros experimentos. Por otra parte, a determinadas concentraciones puede estimular la síntesis de antibióticos. Esto ocurre con la formación de indolmicin por *Streptomyces griseus*, en donde una concentración de glucosa del 0,5 % inhibe la producción, mientras que al 0,01-0,005 % la estimula (HURLEY y BIALEK, 1974). Un hecho similar tiene lugar con la producción de bacitracina por *Bacillus licheniformis*, en donde elevadas concentraciones de glucosa disminuyen la producción y concentraciones del 0,5 %, aunque retrasan la síntesis, aumentan el nivel del antibiótico (HAAVIK, 1974a ; DREWS y DEMAIN, 1977). Por el contrario, la máxima producción de tetrafungin se consigue utilizando concentraciones de glucosa del 3 % (VEIGA, 1979). El efecto estimulador de la glucosa puede ser debido a que el pH ácido alcanzado en su metabolización coincida con el pH óptimo de producción. Así, el azúcar es consumido antes de la producción y una vez agotado comienza la síntesis del antibiótico (MARTIN y DEMAIN, 1980).

Otras fuentes de carbono, tales como fructosa, sacarosa, malato, acetato, etc., suelen estimular la síntesis de antibióticos (HURLEY y BIALEK, 1974 ; MARTINEZ-MOLINA y col., 1976), aunque en nuestro caso no se ha encontrado ninguna fuente de carbono capaz de elevar los niveles de antibiótico establecidos como máximos.

La fuente de nitrógeno se ha estudiado con menor intensidad, ya que parece tener poca influencia sobre la producción de antimicrobianos. No obstante, WAKSMAN (1969) determina la necesidad de una fuente de nitrógeno compleja para elevar la producción de estreptomicina. En la bibliografía consultada (EGAWA, 1970 ; EVANS y col., 1976 ; MARTINEZ-Molina y col., 1976 ; MIDORIKAWA y col., 1976 ; ARIAS y col., 1979 ; VEIGA, 1979 ; AMANO y col. 1980) se han empleado diversas fuentes de nitrógeno complejas, tales como extracto de levadura, peptona, harina de semilla de soja, harina de cacahuets, etc. En nuestro caso la fuente de nitrógeno óptima para la producción del antimicrobiano, como se observa en la tabla correspondiente es la peptona.

El modo de acción de los iones metálicos en la estimulación de la síntesis de antibióticos es desconocido, aunque BU'LOCK (1967) y WEINBERG (1970) proponen varias posibilidades. Sugieren que los iones metálicos son

activadores de las sintetasas de los metabolitos secundarios y esta inducción del metabolismo secundario iría en detrimento del crecimiento por una canalización del sustrato hacia la formación del antibiótico. Otro posible papel de las trazas metálicas puede ser que estos iones secuestren el fósforo inorgánico presente en el medio, favoreciendo así el metabolismo secundario, ya que un defecto de fósforo inorgánico podría favorecer el metabolismo secundario en detrimento del metabolismo primario (DEMAIN, 1968 ; GENTRY y col.,1971 ; WEINBERG, 1974 ; MARTIN, 1977 ; MARTIN y DEMAIN, 1980).

En los estudios realizados por nosotros sobre el efecto de las trazas metálicas en las que se incluyen calcio, cobre, hierro, magnesio, manganeso y cinc, a concentraciones indicadas en la bibliografía, se ha podido comprobar que ninguno de ellos afecta a la producción a excepción del cobre, ya que en ausencia de este ion se inhibe totalmente la síntesis del antibiótico. Esta necesaria presencia de cobre nos hace pensar en una posible incorporación de dicho ion a la molécula del antimicrobiano . En este sentido, WEINBERG (1970) demuestra la necesidad del cinc, hierro y magnesio para la producción de antibióticos por un elevado número de especies bacterianas. Del mismo modo MARTINEZ-MOLINA y col.(1976) han puesto de manifiesto que el hierro y el cobre son iones

esenciales para la síntesis de un antibiótico producido por *Pseudomonas reptilivora*.

Sin constituir un objeto primario de nuestro trabajo, ha sido necesario poner a punto técnicas adecuadas de extracción y purificación del antibiótico como paso previo para poder estudiar sus propiedades y modo de acción. A tal fin, se ha ensayado la extracción del antibiótico con diferentes disolventes orgánicos a distintos pH. El máximo rendimiento se obtiene tras la adición de acetato de etilo saturado en agua al "Extracto Bruto" y para una recuperación cuantitativa se realizan tres extracciones sucesivas a pH 9, considerando adecuada la proporción solvente/caldo 1:1. Se observa que aumenta el rendimiento a medida que aumenta el pH y se emplean los disolventes saturados en agua.

Cuando se realizan ensayos de extracción para determinar la posible existencia de actividad intracelular, tanto por lisis enzimática como por sonicación, comprobamos que el antimicrobiano sólo se excreta al medio de cultivo, no quedando ningún resto intracelular.

La purificación del antibiótico se lleva a cabo mediante combinación de distintas técnicas, tales como diálisis, cromatografía en columna de Sephadex, cromatografía

en papel y resinas de intercambio iónico. De esta forma, y de acuerdo con el fundamento de cada una de las técnicas, se eliminan impurezas que se diferencian de la sustancia activa por su tamaño molecular, solubilidad y carácter iónico. Con estos datos elaboramos un esquema de extracción y purificación y, aunque no se puede aportar un dato objetivo sobre el rendimiento del proceso empleado, nos sirve de base para comenzar los estudios sobre la caracterización de la sustancia antimicrobiana.

Las técnicas cromatográficas, si bien son métodos analíticos simples, normalmente se utilizan para la separación de compuestos de una mezcla, lo que constituye un método más de extracción y purificación de sustancias. Así mismo pueden ser útiles para la caracterización o identificación de las mismas. En cualquier caso, es importante la elección del sistema solvente adecuado, así como del tipo de revelador, ya que el rendimiento de estas técnicas dependen en gran medida de dicha elección.

La cromatografía en capa fina sólo se ha empleado para poner de manifiesto el carácter polar del antimicrobiano y en los resultados obtenidos se observa la ausencia de movilidad de la muestra con cualquiera de los solventes empleados, lo que indica una polaridad elevada.

La cromatografía en papel, basada en las dife -



rencias de solubilidad del antimicrobiano en los distintos sistemas solventes, no sólo se ha utilizado para la caracterización de la sustancia, sino fundamentalmente como sistema de purificación. En este sentido, se selecciona aquel sistema solvente que proporcione la mayor separación entre las manchas.

De acuerdo con BETINA (1958) aplicamos la cromatografía en papel para conocer el carácter iónico de la sustancia. Para ello, se realizan cromatografías a diferentes pH, observándose los distintos comportamientos respecto a los valores de Rf. Así, en nuestro caso se comprueba el carácter neutro del antibiótico, no apareciendo modificaciones en los valores de Rf aún cuando se varían los valores de pH.

La electroforesis, basada en las diferencias de migración de las sustancias sometidas a la acción de un campo eléctrico, se ha utilizado para obtener un dato más en la caracterización de la misma. La eficacia de esta técnica está limitada por la dificultad de standarizar las condiciones de intensidad, voltaje y tiempo, por lo que adquiere una gran importancia la selección de dichos parámetros. Una vez puesta a punto la técnica, los resultados obtenidos están en completa concordancia con los conseguidos en cromatografía de pH y resinas de intercambio iónico, corroborándose el carácter neutro de la sustancia

antimicrobiana.

Los datos obtenidos por bioautografía, tanto en cromatografía como en electroforesis, indican la existencia de una sola actividad antibiótica y, aunque ninguna de las dos técnicas son excluyentes, los resultados de las mismas nos lleva a considerar que

TM-4 produce un solo tipo de sustancia antimicrobiana.

Por lo que respecta a los estudios espectrofotométricos, los resultados obtenidos indican la presencia de grupos hidroxilos, aminos, éteres o alcoholes y carbonilos. El hecho de que las bandas correspondientes al grupo carbonilo aparezcan a valores inferiores a  $1700\text{ cm}^{-1}$  ( $1675\text{ cm}^{-1}$ ,  $1525\text{ cm}^{-1}$  y  $1465\text{ cm}^{-1}$ ) hace pensar que dichos grupos si son de esteres están conjugados con otros grupos tales como anillos aromáticos o bien corresponden solo a los grupos C=O de amidas. Por otra parte, la presencia de bandas a  $3500\text{ cm}^{-1}$  y  $3300\text{ cm}^{-1}$  indican la existencia de enlaces O-H y N-H, que por la anchura de las mismas puede deducirse fuertes asociaciones de puentes de hidrógeno.

El estudio de las características fisico-químicas del antimicrobiano, tales como estabilidad, solubili-

dad, análisis elemental y reacciones coloreadas se comentan a continuación.

Los estudios de termoestabilidad realizados han puesto de manifiesto que la sustancia antimicrobiana resiste temperaturas por encima de 100°C y así mismo, mantenida tanto en seco como en solución, se ha podido comprobar que su actividad se mantiene durante largos periodos de tiempo, llegando incluso a varios años. De la misma forma, los estudios sobre la estabilidad al pH indican que no aparece modificación alguna en los valores de actividad, por lo que consideramos que el antimicrobiano también es estable a las variaciones de pH.

Aún cuando sólo se han realizado estudios cualitativos, los datos obtenidos en el ensayo de solubilidad del antimicrobiano, y de acuerdo con los estudios de extracción, corresponden, como cabría esperar, a una sustancia de naturaleza polar.

El estudio de las reacciones coloreadas, así como el análisis elemental aportan un dato más en la caracterización de la sustancia activa que, aunque sólo -- cualitativo, es de gran importancia a la hora de establecer la composición química del antibiótico.

El espectro antimicrobiano de los antibióticos

producidos por el género *Pseudomonas* es muy variado y depende de cada caso en particular. Mientras que algunos son especialmente activos frente a bacterias gram positivas (NOJIRI y col., 1975 ; ITO y col., 1977a ; ITO y col., 1979b ; LEISINGER y MARGRAFF, 1979), otros lo son a hongos (LEISINGER y MARGRAFF, 1979 ; LINDBERG, 1981). Incluso se han encontrado antibióticos que actúan frente a -- bacterias gram positivas y levaduras (BARKER y col., 1979) y otros de amplio espectro (WRATTED y col., 1976 ; EVANS y col., 1977 ; ITO y col., 1977b ; MARTINEZ-MOLINA y OLIVARES, 1979 ; LINDBERG y LARKIN, 1980).

El antimicrobiano producido por *Pseudomonas aeruginosa* TM-4 presenta un espectro de acción moderadamente amplio, comprobando que todas las bacterias gram positivas y levaduras ensayadas son sensibles a la acción del antibiótico, mientras que las bacterias gram negativas son resistentes a la misma.

En cuanto al efecto del antimicrobiano sobre las bacterias sensibles, los ensayos efectuados sobre *Bacillus subtilis* y *Staphylococcus aureus* muestran una actividad de tipo claramente bactericida, que comienza a hacerse patente una hora después de la adición del antibiótico y alcanza el 100 % de mortalidad a las 17 y 14 horas respectivamente.

Por último, se han realizado ensayos sobre el efecto "in vivo" del antibiótico. Se comprueba su toxicidad para el ratón y todo parece indicar que es atóxico. Así mismo, se han realizado estudios preliminares para determinar si el tratamiento con el antimicrobiano protege a los ratones de la infección por *Staphylococcus aureus* y, como cabría esperar por el estudio "in vitro", - también es efectivo "in vivo" sobre la citada bacteria, observándose una ausencia total de abscesos en los animales tratados con el antimicrobiano.

CONCLUSIONES

1.- Se ha aislado una cepa de *Pseudomonas aeruginosa* - productora de una sustancia antimicrobiana a partir de suelos del Coto de Doñana.

2.- La producción de la sustancia antimicrobiana está afectada decisivamente por la composición del medio de cultivo, en especial por la presencia de iones cobre y en menor grado por las restantes condiciones culturales, habiéndose fijado las condiciones óptimas que permiten el máximo rendimiento.

3.- Los estudios realizados indican que el antimicrobiano es una sustancia de naturaleza polar y carácter neutro, mostrando una marcada resistencia a los agentes físico-químicos.

4.- Los ensayos farmacológicos realizados en animales de experimentación ponen de manifiesto la atoxicidad de la sustancia antimicrobiana así como su efectividad "in vivo".

BIBLIOGRAFIA



- ACAR, J.F. 1980.- "The disc susceptibility test". In Antibiotics in Laboratory Medicine. V. Lorian, editor. William and Wilkins Company. Baltimore USA.
- ALLEN, O.N. 1951.- "Experiments in soils bacteriology". Burgess Publishing Minneapolis, Minnesota.
- AMANO, S., S. TAKAHASHI, Y. OGAWA, S. MIYADOH, N. EZAKI, T. NIWA, Y. YAMADA. 1980.- "BN-225, a new antibiotic produced by *Pseudomonas*": Taxonomy, isolation, physico-chemical and biological properties". Sci. Reports of Meiji Seika Kaisha 19 - (8-14).
- ARIAS, J.M., C. RODRIGUEZ, E. MONTOYA. 1976.- "Estudio de las condiciones óptimas para la producción de antibióticos por *Mixococcus coraloides*". Laboratorio. Año XXXI, tomo LXII, nº 370 (317).
- ARIAS. J.M., J.M. ALMENDRAL, E. MONTOYA. 1979a.- "Two methods of large scale extraction of an antibiotic produced by *Mixococcus coraloides*". Microbios 25 (19-23).
- ARIAS, J.M., C. RODRIGUEZ, E. MONTOYA. 1979b.- "Purification and partial characterisation of an antibiotic produced by *Mixococcus coraloides*". J. Antibiotic 32 (205-211).
- ARIAS, J.M., C. RODRIGUEZ, E. MONYOYA. 1979c.- "Biological activity of an antibiotic produced by *Mixococcus coraloides*". Microbios 24 (123-131).

- ARIMA, K., H. IMANAKA, M. KOUSAKA, A. FUKUTA, G. TAMU -  
RA. 1964.- "Pyrrolnitrin, a new antibiotic subs  
tance, produced by *Pseudomonas*". Agr. Biol. Chem.  
28 (575-576).
- ASENSIO, C., F. BAQUERO. 1982.- "Las Microcinas". Invest  
igación y Ciencia. N<sup>o</sup> 67 (106-115).
- BANKS, G.T., K.D. BARROW, E.B. CHAIN, A.T. FULLER, G. MEY  
OWS, M. WOOLFORD. 1971.- "Pseudomonic acid :  
an antibiotic produced by  
". Nature 234 (416-417).
- BARKER, W.R., CALLAGHAM, L. HILL, D. NOBLE, P. ACRED, P.  
B. HARPER, M.A. SOWA, R.A. FLETTON. 1979.- "G-  
1549, a new cyclic hidroxamic acid antibiotic  
isolated from culture broth of *Pseudomonas al-*  
*caligenes*". J. Antibiotics 32 (1096-1103).
- BARJA, J.L. 1979.- "Interacciones microbianas en el med  
dio marino : Aislamiento y caracterización de  
un antibiotico producido por una bacteria marin  
a". Tesis Doctoral. Facultad de Biología . Univ  
ersidad de Santiago de Compostela.
- BARRY, A.L. 1976.- "Papel de la CNPLC en la uniformación  
de las técnicas de susceptibilidad antimicrobian  
a". En Pruebas de susceptibilidad a los anti-  
bióticos. A. Balows. Ed. Médica Panamericana.
- BARUA, M., L.A. SHELEF. 1980.- "Grow suppression of *Pseu*  
*domonas* by glucose utilisation". J. Food Sci.  
45 (349-351).

- BAUER, A., W.M.M. KIRBY, J.C. SHERRIS, M. TURCK. 1966.-  
"Antibiotics susceptibility testing by a standardized single disc methods". *Amm. J. Clin. Path.* 45 (493).
- BEAUDET, R., J.G. VISAILLON, S.A. SAHEB, M. SYLVESTRE .  
1982.- "Production, purification and preliminary characterisation of a gonococcal growth inhibitor produced by a coagulase-negative *Staphylococcus* isolated from the urogenital flora". *Antimicrob. Agents Chemother.* 22 (277-283).
- BERDY, J. 1974.- "Recent developments of antibiotics - research and classification of antibiotics according to chemical structure". *Adv. Appl. Microbiol.* 18 (309-406).
- BERGEY'S MANUAL OF DETERMINATIVE BACTERIOLOGY. 8ª edición  
The Williams and Wilkins Co. Baltimore 1974.
- BERGOGLIO, R.M. 1977.- "Antibióticos". 3ª edición. Ed. Médica Panamericana. Buenos Aires.
- BETINA, V. 1958.- "A paper chromatography methods for the determination of suitable pH values for the extraction of antibiotics". *Nature* 182 (796-79).
- BETINA, V. 1960.- "New types of paper chromatograms of antibiotics : A comparison of methods in one laboratory". *Nature* 187 (1111-1115).
- BETINA, V. 1975.- "The identification and assay of mixtures of antibiotics by paper chromatography". *Meth. Enzimol.* 43 (100-104).

- BROWN, D.F. J., D. KOTHARI. 1978a.- "Antimicrobial susceptibility testing of rapidly growing pathogenic bacteria. I.- A comparison of disc diffusion methods in one laboratory". J. Antimicrob. Chemother. 4 (19-26).
- BROWN, D.F.J., D. KOTHARI. 1978b.- "Antimicrobial susceptibility testing of rapidly growing pathogenic bacteria. II.- A field trial of four disc-diffusion methods". J. Antimicrob. Chemother. 4 (27).
- BU'LOCK, J.D. 1961.- "Intermediary metabolism and antibiotic synthesis". Adv. Appl. Microbiol. 3 (293).
- BU'LOCK, J.D. 1967.- "Essays in biosynthesis and microbial development". John Wiley and Sons, Inc. - New York.
- BURKHOLDER, P.R. 1959.- "Antibiotics". Science 129 -- (1457-1465).
- CAMPBELL, A.H. 1960.- "A study of antibiotics sensibility testing with proposal for simple uniform method". Brit. Med. Bull. 16 (82-85).
- CARNEGIE, P.R. 1965.- "A peptide-mapping technique for the estimation of molecular size". Nature 206 (1128-1130).
- COSTILOW, R.N. 1981.- "Biophysical factors in growth". In Manual of Methods for General Bacteriology. P. GERHARD, R.G.E. Murray, R.N. Costilow, E.W.E. Nester, W.A. Wood, N.R. Krieg, G.B. Phillips, editors. American Society for Microbiology, -- Washington D.C. 20006

- CUPPELS, D.A., R.S. HANSON, A. KELMAN. 1978.- "Isolation and characterisation of a bacteriocin produced by *Pseudomonas solanacearum*". J. Gen. Microbiol. 109 (295-303).
- DEITCH, E.A., A.A. MARINO, T.E. GUILLESPEIE, J.A. ALBRIGH 1983.- "Silver-naylon : a new antimicrobial agent" Antimicrob. Agents Chemother. 23 (356-359).
- DEL RIO L.A., J. OLIVARES. M.C. BLESA, F. MAYOR. 1972a.- "Antibiotics from *Pseudomonas reptilivora* II.?- Isolation, purification and properties". Antimicrob. Agents Chemother. 2 (189-194).
- DEL RIO, L.A., J. LOPEZ-GORGE, J. OLIVARES, F. MAYOR. 1972b.- "Antibiotics from *Pseudomonas reptilivora* I.-Taxonomic classification and conditions of fermetation". Antimicro.Agents Chemother.2 (186).
- DEMAIN, A.L. 1968.- "Regulatory mechanisms and the industrial production of microbial metabolites".Lloydia 31 (395-418).
- DEMAIN, A.L. 1972.- "Celular and environmental factors affecting the synthesis and excretion of metabolites". J. Appl. Chem. Biotechnol. 22 (345).
- DEMAIN, A.L. 1974.- "How do antibiotics producing microorganisms avoid suicide ?". Ann. N.Y. Acad.Sci. 235 (601-612).
- DREWS, S.W., A.L. DEMAIN. 1977.- "Effect of primary metalites of secondary metabolism". Ann. Rev. Microbiol. 31 (343-356).

- DREWS, S.W. 1981.- "Liquid culture". In Manual of Methods for General Bacteriology. P. Gerhard, R. G.E. Murray, R.N. Costilow, E.W.E. Nester, W.A. Wood, N.R. Krieg, G.P. Phillips, editors. American Society for Microbiology, Washington, D.C. 20006 .
- EADY, E.A., K.T. HOLLAND, W.J. CUNLIFFE. 1983.- "Production and partial purification of a peptide antibiotic from *Staphylococcus epidermidis*". J. Appl. Bacteriol. 55 (461-472).
- EGAWA, Y., K. UMINO, S. AWATAGUCHI, Y. KAWANO, T. OKUDA. 1970.- "Antibiotic YC-73 of *Pseudomonas*. I.-Production, isolation and properties". J. Antibiotics 23 (267-270).
- ELANDER, R.P., J.A. MABE, R.H. HAMILL, M. GORMAN. 1971.- "Metabolism of tryptophans by *Pseudomonas aureofaciens*. Vi.- Production of pyrrolnitrin by selected by *Pseudomonas* species". Appl. Microbiol. 16 (753-758).
- EVANS, J.R., E.J. NAPIER, P. YATES. 1976.- "Isolation of a new antibiotic from a species of *Pseudomonas*". J. Antibiotics 29 (850-852).
- FIESER, J., H. FIESER. 1968.- "Química Orgánica". 4ª edición. Ed. Grijalvo S.A.
- FLOSS, H.G., C.G. CHANG, O. MASCARETTI, K. SHIMADA. 1978.- "Studies on the biosynthesis of antibiotics". Planta Med. 34 (345-380).

- GALLARDO-LARA, F. 1971.- Tesis Doctoral. Facultad de Farmacia. Universidad de Granada.
- GARCIA-NOVO, F. 1977.- "Symposium on the environmental consequences of fire and fuel management in Mediterranean ecosystem". Forest Service. USDA. General Technical Report. WO-3. California.
- GENTRY, M.J., D.K. SMITH, S.F. SCHNUTE, S.L. WERBER. 1971.- "Pseudomonas culture longevity : Control by phosphate". *Microbios* 4 (205-215).
- GHERNA, R.L. 1981.- "Preservation". In Manual of Methods for General Bacteriology. P. Gerhardt, R.G.E. - Murray, R.N. Costilow, E.W.E. Nester, W.A. Wood, N.R. Krieg, G.B. Phillips, editors. American - Society for Microbiology, Washington, D.C. 20006
- GILL, C.O. 1975.- "Effect of growth temperature of *Pseudomonas fluorescens*". *J. Gen. Microbiol.* 89(29/).
- GOLDSTEIN, E.J.C., C.E. CHERUBIN, M. SHULMAN. 1983.- "Comparison of microtiter broth dilution and agar dilution methods for susceptibility testing of *Eikenella corrodens*". *Antimicrob. Agents Chemother.* 23 (42-45).
- GONZALEZ-BERNALDEZ, F., L. RAMIREZ-DIAZ, A. TORRES-MARTINEZ, F. DIAZ-PINEDA. 1977.- "Anales de Edafología y Agrobiología". XXXVI (9-10) 1005-1017 .
- GOTTLIEB, D. 1976.- "The production and role of antibiotics in soil". *J. Antibiotics* 29 (980-1000).

- GOVAN, J.R.W. 1974.- "Studies on the pyocins of *Pseudomonas aeruginosa*". J. Gen. Microbiol. 80 (17).
- GOVAN, J.R.W., R.R. GILLIES. 1968.- "Further studies in the pyicine typing of *Pseudomonas pyocianea*". J. Med. Microbiol. 2 (17-25).
- GROSS, D.C., J.E. DEVAY. 1977.- "Production and purification of syringomycin, a phytotoxin produced by *Pseudomonas syringae*". Physiol. Plant. Pathol. 11 (13-28).
- HAAVIK, H.I. 1974a.- "Studies on the formation of bacitracin by *Bacillus licheniformis* : Effect of glucose". J. Gen. Microbiol. 81 (383-395).
- HAAVIK, H.I. 1974b.- "Studies on the formation of bacitracin by *Bacillus licheniformis* : Role of catabolite repression and organic acids". J. Gen. Microbiol. 84 (321-326).
- HAMILL, R.L., L.W. CRANDALL. 1978.- "Microbiological and fermentation product research". In J. Chromatog. Antibiotics. Isolation, separation and purification. Vol 15 . M.J. Weinstein, G.H. Waksman, editors. Elsevier Scientific Publishing Company. Amsterdam.
- HILL, L.R. 1981.- "Preservation of microorganisms". In Essays in Applied Microbiology. J.R. Norris, - M.H. Richmon, editors. Jonh Wiley and Sons Ltd.
- HOPWOOD, D.A., M.J. MERRICK. 1977.- "Genetics of antibiotic production". Bacteriol. Rev. 41 (595-635).



- HOPWOOD, D.A. 1978.- "Extrachromosomally determined antibiotic production". *Ann. Rev. Microbiol.* 32 (373-392).
- HURLEY, L.H., D. BIALEK. 1974.- "Regulation of antibiotic production : Catabolite inhibition and dualistic effect of glucose on indolmycin production". *J. Antibiotics* 27 (49-56).
- ITO, S., M. KAJEYAMA, F. EGAMI. 1970a.- "Isolation and characterisation of pyocins from several strains of *Pseudomonas aeruginosa*". *J. Gen. Appl. Microbiol.* 16 (205-214).
- ITO, M., Y. KOYAMA, K. AIDA, T. UEMURA. 1970b.- "Biosynthesis of colistin by a cell-free system *Bacillus colistinus* Koyama". *Biochim. Biophys. Acta* 215 (418-420).
- ITO, M., Y. KOYAMA. 1972.- "Jolipeptin, a new antibiotic. I.- Isolation, physico-chemical and biological characteristic". *J. Antibiotics* 25 (304-308).
- ITO, J., S. MIYADOH, M. ITO, N. EZAKI, T. NIWA, Y. YAMADA. 1977a.- "Antibiotic BN-213". *J. Antibiotics* 30 (982-990).
- ITO, M., S. AMANO, S. MIYADOH, K. WATANABE, N. EZAKI, Y. YAMADA, T. NIIDA. 1977b.- "Antibiotic BN-183". *J. Antibiotics* 30 (635-642).
- ITO, J., S. MIYADOH, N. EZAKI, T. NIWA, Y. YAMADA. 1979a.- "Antibiotic BN-229-F". *Sci. Reports of Meiji Seika Kaisha* 13 (20-24).

- ITO, S., K. SEMPUKU, S. AMANO, S. MIYAMICHI, Y. KOYAMA, N. EZAKI, T. NIWA, Y. YAMADA. 1979b.- "Antibiotic BN-229-A". J. Antibiotics 32 (225-231).
- KIMURA, Y., E. MURAI, M. FUJIKAWA, T. TATSUKI, F. NOBUE 1969a.- " Polymyxin P, a new antibiotic of the polymyxins group". J. Antibiotics 22 (449-450).
- KIMURA, M., K. MURAYAMA, M. NOMOTO, Y. FUJITA. 1969b.- " Colorimetric detection of peptides with tert-butyl hipoclorite acid potassium iodide". J. - Chromatog. 41 (458-461).
- KONDO, S., Y. HORIUCHI, M. HAMADA, T. TAKEUCHI, H. HUMEZAWA. 1979.- "A new antitumor antibiotic, bac-tobolin produced by *Pseudomonas*". J. Antibiotics 32 (1069-1071).
- KONEMAN, E.W., S.D. ALLEN, W.R. DOWELL, H.M. SOMMERS . 1983.- "Diagnóstico Microbiológico" Ed. Médica Panamericana S.A. Buenos Aires.
- KORZYBSKI, T., Z. KOWSZYK-GINDIFER, W. KURYTOWICZ. 1978.- "Antibiotics. Origin, nature and properties". - Vol III . American Society for Microbiology . Washington D.C.
- KRIEG, N.R. 1981.- "Enrichment and isolation". In Manual of Methods for General Bacteriology. P. Gerhardt, R.G.E. Murray, R.N. Costilow, E.W.E. Nester, W.A. Wood, N.R. Krieg, G.B. Phillips, editors. American Society for Microbiology, Washington D.C.
- KURODA, K., M. KAGEYAMA, 1979.- "Biochemical properties

- of a new flexious bacteriocin, pyocin F<sub>1</sub> produced by *Pseudomonas aeruginosa*". J. Biochem. 85 (7-19).
- KURODA, K., M. KAGEYAMA, 1981.- "Comparative study on F-type pyocins of *Pseudomonas aeruginosa*". J. Biochem. 89 (1721-1736).
- LAFERRIERE, C., M.I. MARCS, D.F. WELCH. 1983.- "Effect of inoculum size on *Haemophilus influenzae* type B. Susceptibility to new and aonventional antibiotics". Antimicrob. Agents Chemother. 24 (287).
- LAPAGE, S.P., J.E. SHELTON, T.G. MITCHELL, A.R. MacKENZIE. 1970.- In "Methods in Microbiology". Vol. 3A . Ed. Norris and Ribbons. Acad. Press. (137-228).
- LAZARO, J.J. 1974.- "Fructosa-1,6-difosfatasa fotosinté tica de espinaca : Purificación, heterogeneidad y propiedades". Tesis Doctoral. Facultad de Farmacia. Universidad de Granada.
- LEISINGER, T., R. MARGRAFF. 1979.- "Secondary metabolites of the fluorescent pseudomonad". Microbiol. rev. 43 (422-442).
- LIGHTBROWN, J.W., P. DE ROSSI. 1965.- "The identification and assay of mixture of antibiotics by electrophoresis". Analyst. 90 (89-98).
- LINDBERG, G.D. 1981.- "An antibiotic lethal to fungi". Plant Disease 65 (680-683).
- LINDBERG, G.D., J.M. LARKIN. 1980.- "Production of tro-

- polone by a *Pseudomonas*". J. Nat. Prod. 43 (592).
- LITWACK, G. 1967.- "Experimental biochemistry" Ed. John Wiley and Sons, Inc.
- LLUCH, C., V. CALLAO, J. OLIVARES. 1973.- "Pigment production by *Pseudomonas reptilivora*". Arch. Mikrobiol. 93 (239-243).
- MAEDA, K., A. YAGI, H. NAGANAWA, S. KONDO, H. UMEZAWA . 1969.- "Application of high-voltage paper electrophoresis for separation and identification for antibiotics". J. Antibiotics 22 (635-636).
- MAHUZIER, G., M. HAMON. 1978.- "Abrege de chimie analytique". Tomo II. Ed. Masson .
- MARTIN, J.F., L.E. McDANIEL, 1975.- "Kinetics of biosynthesis of polyene macrolide antibiotics in batch cultures : Cell maturation time". Biotechnol. - bioeng. 17 (925-938).
- MARTIN, J.F. 1977.- "Control of antibiotic synthesis by phosphate". Adv. Biochem. 6 (105-127).
- MARTIN, J.F., A.L. DEMAIN. 1980.- "Control of antibiotic biosynthesis". Microbiol. Rev. 44 (230251).
- MARTINEZ-MOLINA, E., L.A. DEL RIO, J. OLIVARES. 1976.- "Copper and iron as determinant factors of antibiotics production by *Pseudomonas reptilivora*". J. Appl. Bacteriol. 41 (69-74).
- MARTINEZ-MOLINA, E., J. OLIVARES. 1979.- "Antibiotic pro

duction of *Pseudomonas reptilivora* as a phage conversion". Can. J. Microbiol. 25 (1108-1110).

MIDORIKAWA, Y., A. KUNINAKA, H. YOSHINO. 1976.- "Poliene antibiotic Y-33". J. Antibiotics 29 (521-525).

MILLER, LL.C., M.L. TAINTER. 1944.- "Stimation of the -DL-50 and its error by means of logarithmic pro vic graphpaper". Proc. Soc. Expert. Biol. Med. 57 (261-264).

MILLER, A.K. 1971.- "In vivo evaluation of antibacterial chemotherapeutic substances". Adv. Appl. Micro biol. 14 (150-183).

MILLER, R.R., S.P. PETERS, M.S. KUHLENSCHMIDT, R.H.GLEW. 1976.- "The use of ion-exchange resins in the application of protein samples to gel filtration columns". Analytical Biochem. 72 (45-48).

MINAGAWA, H., K. KITaura, N. NAKAMIZO. 1983.- "Effects of pH on the activity of ketoconazole against *Candida albicans*". Antimicrob. Agents Chemother. 23 (105-107).

MIYAKAWA, S., K. SUZUKI, T. NOTO, Y. OKAZAKI, Y. HARADA. 1982.- "Thiolactomycin, a new antibiotic. IV.- Biological properties and chemotherapeutic activity in mice". J. Antibiotics 35 (411).

MORENO-MARTI, F., M.C. TORRE-BORONAT. 1977.- "Bromatología". Facultad de Farmacia. Universidad de Barcelona.

- MURRAY, P., J.H. JORGENSEN. 1981.- "Quantitative susceptibility test methods in major United States - Medical Centers". Antimicrob. Agents Chemother. 20 (66-70).
- NEWTON, B.A. 1956.- The properties and mode of action of the polymyxins". Bacteriol. Rev. 20 (14-27).
- NOJIRI, C.H., S. AMANO, M. ITO, S. MIYADOH, K. KATSUMATA, M. EZAKI, Y. YAMADA, T. NIIDA. 1975.- "Antibiotic BN-165". J. Antibiotics 28 (232-238).
- NORRBY, S.R., M. JONSSON. 1983.- "Antibacterial activity of norfloxacin". Antimicrob Agents Chemother. 23 (15-18).
- NOTO, T., S. MIYAKAWA, H. OISHI, H. ENDO, H. OKAZAKI. 1982.- "Thiolactomycin, a new antibiotic. III.- "In vitro antibacterial activity". J. Antibiotics 35 (401-410).
- PARIS, R.R., J.P. THEALLET. 1962.- "Caracterisation de quelques substances antibiotiques par chromatographie et electrophorese sur papier". Ann. -- Pharm. Franc. 20 (436).
- PARIS, R.R., H. MOYSE. 1976.- "Matiere Medicale". Ed. Masson. 2ª Edición. Tomo I .
- PARKER, W., M.L. RATHNUM. 1973.- "EM-49, a new peptide antibiotic. II.- Chemical characterisation". J. Antibiotics 26 (449-445).
- PARKER, W., M.L. RATHNUM. 1975.- "EM-49, a new peptide

- antibiotic. IV.- The structure of EM-49". J. -  
Antibiotics 28 (379-389).
- PARKER, W., M.L. RATHNUM, L.D. DEAN, M.W. NIMECK, W.E.  
BROWN, E. MEYERS. 1977.- "Polymyxin F, a new  
antibiotic". J. Antibiotics 30 (767-769).
- PATERSON, A.C. 1965.- "Bacteriocinogeny and lisogeny in  
the genus *Pseudomonas*". J. Gen. Microbiol. 39  
(295-303).
- PAULUS, H., E. GRAY. 1964.- " The biosynthesis of poly-  
myxin B by growinf cultures of *Bacillus polymy*  
*xa* ". J. Biol. Chem. 239 (865-871).
- PAULUS, H. 1969.- "Polymyxins". In Antibiotics. D. Go -  
ttlieb, P.D. Shaw, editors. Springer-Verlag. -  
New York, Inc., New York 2 (252-267).
- POCHON, J. 1954.- "Manuel technique d'analyse microbio-  
logique du sol. Masson et Cia,, editeurs.Paris
- PREVOT, A.R. 1966.- "Techniques pour le diagnostique des  
bacteries anaerobies".
- QUEENER, S.W., O.K. SEBEK, C. VEZINA. 1978.- "Mutants -  
blocked in antibiotics synthesis". Ann. Rev. !  
Microbiol. 32 (593-636).
- SAHL, H.G., H. BRANDIS. 1981.- "Production, purification  
and chemical properties of an antistaphylococcal  
agent produced by *Staphylococcus epidermidis* ".  
J. Gen. Microbiol. 127 (377-384).

- SATO, K., Y. MATSUURA, M. INOUE, T. UNE, Y. OSADA, H. OGAWA, S. MITSUHASHI. 1982.- "In vito and in vivo activity of DL-8280, a new oxacine derivate". Antimicrob. Agents Chemother. 22 (548).
- SCHOENKNECHT, F.D., J.A. WASHINGTON, T.L. GAVAN, C. THORNS BERRY. 1980.- "Rapid determination of MIC of antimicrobial agents by the autobac methods : A collaborative study". Antimicrob. Agents Chemother. 17 (824-833).
- SEBEK, O.K. 1971,- "Microbial transformation of antibiotics". Adv. Appl. Microbiol. 14 (123-150).
- SHAW, M., R. BROWN, A.G. MARTIN. 1966.- "Polypeptide antibiotic 4205 from a soil *Bacillus*". Appl. Microbiol. 14 (79-85).
- SHOMURA, T., S. OMOTO, S. MIYADOH, H. WATANABE, K. TOT-SUGAWA, J. YOSHIDA, C. MORIYAMA, S. INOUE, Y. YAMADA, T. NIIDA. 1978.- "Isolation and characterisation of a new antibiotic, BN-109 substance". Antibiotic 17 (1-6).
- SMIBERT, R.M., N.R. KRIEG. 1981.- "General characterisation". In Manual of Methods for General Bacteriology. P. Gerhardt, R.G.E. Murray, R.N. Costilow, E.W.E. Nester, W.A. Wood, N.R. Krieg, G. B. Phillips, editors. American Society for Microbiology, Washington, D.C. 20006.
- SMITH, T., A.FEINBERG. 1965.- "Paper and thin-layer chromatography and electrophoresis". Ed. Shandon.



- STEERS, E., E.L. FOLTZ, D.S. GRAVES, J. RIDENS. 1959.-  
"An inocula-replicating apparatus for routine testing of bacterial susceptibility to antibiotics". *Antibiotics and Chemother.* 9 (307-311).
- SUZUKI, T., H. INOUE, K. FUJIKAWA, S. NAGASAWA. 1963.-  
"Studies on the chemical structure of colistin". *J. Biochem.* 54 (173-179).
- SUZUKI, T., K. HAYASHI, K. FUJIKAWA. 1964.- "Contribution to elucidation of the chemical structure of polymyxin B<sub>1</sub>". *J. Biochem.* 56 (335-343).
- SUZUKI, N., S. KIRINUKI, K. IWAMURA, H. FUKAMI. 1977.-  
"Altericidin". *J. Biochem.* 83 (423-426).
- TAI, M., Y. FUKUOKA, A. YOTSUJI, K. KUMANO, M. TAKAHATA, H. MIKAMI, T. YASUDA, I. SAIKAWA, S. MITSUHASHI. 1982.- "In vitro and in vivo antibacterial Activity of T-1982, a new semisynthetic cephamycin antibiotic". *Antimicrob. Agents Chemother.* 22 (728-734).
- TAKEYA, K., Y. MINAMISHIMA, Y. OHNISHI, K. AMAKO. 1969.-  
"Rod-shaped pyocin 28". *J. Gen. Virol.* 4 (145).
- TAYLOR, P.C., F.D. SCHOENKNECHT, J.C. SHERRIS, E.C. LINNER. 1983.- "Determination of CMB of oxacillin for *Staphylococcus aureus* : Influence and significance of technical factors". *Antimicrob. Agents Chemother.* 23 (142-150).
- THRUPP, L.D. 1980.- "Susceptibility testing of antibiotics in liquid media". In *Antibiotics in Labo-*

ratory Medicine. V. Lorian, editor. Williams - and Wilkins, Baltimore, USA.

THORNSBERRY, C. 1976.- "Pruebas de susceptibilidad anti microbiana de difusión en agar". En Pruebas de susceptibilidad a los antibióticos. A. Balows. Ed. Médica Panamericana. Buenos Aires.

URI, J. 1959.- "New types of salting-out paper chromatograms of antibiotics". Nature 183 (1188-1189).

VEIGA, M. 1979.- "Producción, aislamiento e identificación de un nuevo antibiótico antifúngico". Tesis Doctoral. Facultad de Biología. Universidad de Santiago de Compostela.

VENGLARCIK, III, J.S., L.L. BLAIR, L.M. DUNKLE. 1983.- "pH-dependent oxacillin tolerance of *Staphylococcus aureus*". Antimicrob. Agents Chemother. 23 (232-235).

VERA, H.D., R. DUMOFF. 1974.- "Culture media". In Manual of Clinical Microbiology. E.H. Lennette, E.H.- Spaulding, J.P. Truant, editors. American Society for Microbiology. Washington, D.C. 20006.

VILARRASA, J. 1975.- "Introducción al Análisis Orgánico". Ed. Eunibar.

VOLLBRECHT, D. 1982a,- "Restricted oxygen supply and excretion of metabolites". Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol. 15 (111-116).

VOLLBRECHT, D. 1982b.- "Oxygen-dependent switch-over from

- respiratory to fermentative metabolism in the strictly aerobic *Alcaligenes eutrophus*". Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol. 15 (117-122).
- WAKSMAN, S.A. 1961.- "The role of antibiotics in nature"= Perspect. Biol. Med. 4 (271-287).
- WAKSMAN, S.A. 1969.- "Successes and failures in the -- search for antibiotics". Adv. Appl. Microbiol. 11 (1-16).
- WASHINGTON, J.A. 1976.- "Tecnica de la dilución con agar". En Pruebas de susceptibilidad a los antibióticos. A. Balows. Ed. Médica Panamericana. Buenos Aires.
- WEINBERG, E.C. 1970.- "Biosynthesis of secondary metabolites : Role of traces metals". Adv. Microbiol. Physiol. 4 (1-44),
- WEINBERG, E.D. 1971.- "Secondary metabolism % Raison -- d'etre". perspect. Biol. Med. 14 (565-577).
- WEINBERG, E.D. 1974.- "Secondary metabolism : Control by temperatura and inorganis phosphate". Dev. Ind, Microbiol. 15 (70-81).
- WITHANDER, L., H. HEDING. 1976.- "Polymyxin B : Controlled biosynthesis". J. Antibiotics 29 (774-775).
- WRATTED, S.J., M.S. WOLFE, R.J. ANDERSEN, D.J. FAULKNER. 1977.- "Antibiotic metabolites from a marine - Pseudomonad". Antimicrob. Agents Chemother. 11 (411-414).

- YEOWELL, H.N., J.R. WHITE, 1982.- "Iron requirement in the bactericidal mechanism of streptonigrin". Antimicrob. Agents Chemother. 22 (961-968).
- ZAHNER, H. 1974.- "New antibiotics". Post. Hig. I. Med. Dosw. 28 (459-469).
- ZAHNER, H. 1977.- "Some aspects of antibiotics research". Angew. Chem. Int. Ed. 16 (687-694).
- ZUIDWEG, M.H.J., J.G. OOSTENDORP, C.J.K. BOS. 1969.- -- Thin-layer chromatography on Sephadex for the identification of antibiotics". J. Chromatog. 42 (552-554).
- ZURAVLEFF, J.J., V.L. YU, R.B. YEE, M.K. ZIPHYR, W. DIVEN, F.P. TAYLOR. 1982.- "Effect of calcium, magnesium and zinc on ticarcillin and tobramycin alone and in combination against *Pseudomonas aeruginosa*". Antimicrob. Agents Chemother. 22 (839-843).

FACULTAD DE FARMACIA

Reunido el Tribunal integrado por los abajo firmantes  
en el día de la fecha, para juzgar la Tesis Doctoral de  
D.ª M.ª Teresa Pastor Torres

titulada ESTUDIOS SOBRE UN ANTIMICROBIANO PRODUCIDO POR UNA  
CEPA DE *Pseudomonas aeruginosa* AISLADA DE SUELOS DEL COTO DE  
DOÑANA.

acordó otorgarle la calificación de

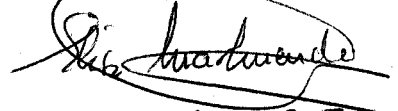
*Insuficiente con honores*

Sevilla, \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 1.9\_\_\_\_\_

El Vocal,

El Vocal,

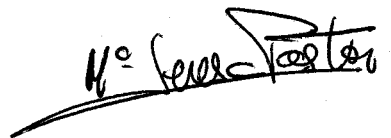
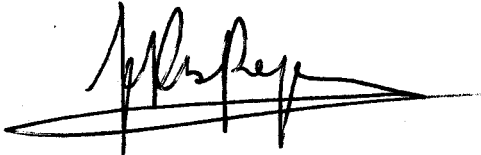
El Vocal,



El Presidente,

El Secretario,

El Doctorado,



M.ª Teresa Pastor