

11261  
1  
24



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE MEDICINA

**SELECCION Y MEJORAMIENTO DE CEPAS DE**  
**Oidiodendron tenuissimum PRODUCTORAS**  
**DE ANTIBIOTICO**

T E S I S  
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:  
MAESTRA EN CIENCIAS BIOMEDICAS  
(BIOQUIMICA)

P R E S E N T A :  
ARGUELLES SANCHEZ MA. ESTHER MURIEL



TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

1990



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

## INDICE:

1. RESUMEN .....	1
2. INTRODUCCION.....	2
2.1. Antecedentes históricos.....	2
2.2. Metabolismo secundario .....	5
2.3. Antibióticos como productos del metabolismo secundario... 8	8
2.4. Genética de antibióticos .....	9
2.5. Fuentes de antibióticos .....	11
2.6. Clasificación de antibióticos .....	12
2.7. Mecanismos para el mejoramientos de cepas.....	13
2.8. Antecedentes del proyecto.....	17
2.8.1. Taxonomía de <i>Didiendron tenuissimum</i> .....	17
2.8.2. Reportes de la producción de antibióticos por el género <i>Didiendron</i> .....	20
2.8.3. Estudios previos realizados en el laboratorio.....	21
3. OBJETIVOS.....	23
4. MATERIAL Y METODOS.....	24
4.1. Material biológico.....	24
4.2. Preparación de medios de cultivo y amortiguadores.....	24
4.3. Obtención de cepas provenientes de un solo clon.....	25
4.4. Bioensayo para evaluar y seleccionar las cepas productoras de antibiótico.....	27
4.5. Preparación de suspensión de esporas.....	29
4.6. Evaluación de la presencia de un plásmido en la producción del antibiótico.....	29
4.6.1. Tratamiento con bromuro de etidio y acriflavina.....	29
4.6.2. Obtención de ADN total de cepas de <i>D. tenuissimum</i> .....	30
4.7. Extracción de antibiótico.....	31
4.8. Evaluación cuantitativa de la actividad antibiótica.....	32
4.9. Mutagénesis con luz ultravioleta.....	32
4.10. Mutagénesis con etil metano sulfonato (EMS).....	34
4.11. Mutagénesis con N-metil-n-nitro-nitrosoguanidina.....	35
4.12. Determinación de la estabilidad de producción de antibiótico.....	36
4.13. Evaluación de las características de crecimiento y producción de antibiótico a través del tiempo.....	37
4.14. Morfología colonial de las clonas seleccionadas de <i>D. tenuissimum</i> en diferentes fuentes de carbono.....	37
4.15. Crecimiento y producción de antibiótico en diferentes fuentes de carbono.....	38
5. RESULTADOS.....	39
5.1. Obtención de cepas provenientes de un solo clon.....	39
5.2. Evaluación de la presencia de una plásmido en la producción de antibiótico.....	40
5.3. Obtención de la mutante UV-153.....	46
5.4. Evaluación cuantitativa de la producción de antibiótico en las diferentes cepas obtenidas.....	53

5.5. Evaluación de las características de crecimiento y producción de antibiótico con el tiempo.....	61
5.5.1. Curvas de crecimiento.....	62
5.5.2. Curvas de pH.....	62
5.5.3. Curvas de cinéticas de producción de antibiótico.....	65
5.6. Morfología colonial de las cepas seleccionadas de <i>Q. tenuissimum</i> en diferentes fuentes de carbono.....	68
5.7. Crecimiento y producción de antibiótico de las cepas de <i>Q. tenuissimum</i> seleccionadas.....	68
5.7.1. Producción de antibiótico en diferentes fuentes de carbono.....	72
6. DISCUSION.....	75
7. CONCLUSIONES.....	92
8. BIBLIOGRAFIA.....	93

## 1. RESUMEN:

Se aisló una cepa productora de antibiótico que se identificó como Oidiodendron tenuissimum. Este antibiótico tiene importancia por su acción contra levaduras y hongos filamentosos patógenos para el hombre. Uno de los objetivos del proyecto fue la obtención de una mutante hiperproductora del antibiótico.

Se probaron 501 conidias individuales aisladas por micromanipulación y se seleccionó la clona que presentó un mayor halo de inhibición de la levadura Saccharomyces cerevisiae.

Debido a que la población fue heterogénea en la producción del antibiótico se sospechó la presencia de un plásmido o elemento extracromosómico involucrado en la producción del mismo. Para demostrar esto se trató al hongo con drogas que curan plásmidos en bacteriactales, como el bromuro de etidio y la acriflavina y se aisló ADN total para detectarlo. Sin embargo no se hallaron evidencias de existencia.

Con el fin de obtener cepas hiperproductoras se mutagenizó la cepa 63-8 con luz ultravioleta, EMS y NMG. Por bioensayo se seleccionó la cepa UV-153 y por titulación se cuantificó la producción de antibiótico en el medio de cultivo, el micelio y el total. La cepa mutante aumentó su producción total en un 440% con respecto a su progenitora.

Por otro lado se estudió el efecto de la fuente de carbono en la morfología colonial, crecimiento y producción de antibiótico de las cepas seleccionadas.

## 2. INTRODUCCION

### 2.1. ANTECEDENTES HISTORICOS.

El concepto de que sustancias derivadas de un microorganismo vivo pueden matar a otro (antibiótico) es casi tan antiguo como la misma ciencia microbiológica. Más aún, la aplicación de la terapéutica antibiótica, sin saber que era tal, es mucho más antigua. Los chinos ya conocían, hace más de 2500 años las propiedades terapéuticas de la cáscara enmohecida de la soya aplicada a carbuncos, furúnculos e infecciones similares, y usaban este material como tratamiento estandar de estos trastornos. Durante muchos siglos la literatura médica ha ofrecido descripciones de efectos benéficos de la aplicación de tierra y diversos vegetales a las infecciones en su mayoría probablemente fuente de mohos y bacterias formadores de antibióticos.

Los primeros investigadores que reconocieron la potencialidad de los microorganismos como agentes terapéuticos fueron Pasteur y Joubert, que registraron sus observaciones y conjeturas en 1877. Dichos autores comentaron que la vida destruye a la vida entre las especies inferiores, más que en los animales y vegetales superiores, y llegaron a la conclusión de que los bacilos del Antrax podían administrarse al animal en gran número sin enfermarlo, siempre que se le dieran al mismo tiempo bacterias ordinarias. (1).

El desarrollo científico de finales del siglo XIX y la

primera mitad del XX sentó las bases de un crecimiento industrial, a través del cual los microorganismos darían al hombre antibióticos, vacunas y complementos alimenticios.

Un descubrimiento importante se hizo en 1896, cuando Ernest A. Clement Duchense, estudiante francés de medicina de 21 años de edad, demostró claramente la acción antibacteriana del hongo *Penicillium*. Cultivó *Penicillium* y transfirió bacterias de *Escherichia coli* al hongo. A las pocas horas descubrió que la bacteria había sido aniquilada. Sabiendo lo que esto podía implicar, inoculó cultivos virulentos bacterianos a ratones de laboratorio y a la mitad de ellos le inyectó caldo nutritivo en el que había crecido el hongo. Al día siguiente, los animales que había inyectado con el caldo estaban sanos y los no inyectados habían muerto. Un año después Duchense publicó sus investigaciones, bajo el título: "Contribución al estudio de la lucha por la existencia en los microorganismos: antagonismo entre hongos y microbios" (2).

*Penicillium* volvió a llamar la atención en 1928, cuando Alexander Fleming trabajaba con cultivos de *Staphylococcus aureus* y un hongo del género *Penicillium* contaminó una de sus cajas. Al poco tiempo observó una zona clara donde habían desaparecido las bacterias. Fleming cultivó al hongo e hizo un extracto de él, al cual llamó penicilina. En 1939, Ernest Boris Chain y Howard Florey aislaron la penicilina y atribuyeron el origen de su trabajo a la observación que hizo Fleming. Por ello en 1945 los tres recibieron el Premio Nobel de Fisiología y Medicina.

Durante la Segunda Guerra Mundial, la producción de penicilina que se llevaba a cabo en Inglaterra era insuficiente para atender las heridas contaminadas de los combatientes; por ello, en 1941 Florey y Chain pidieron ayuda a la industria química de los Estados Unidos.

La gran eficacia de la penicilina hizo que se iniciara un estudio extenso en busca de otros antibióticos. En 1944, Waksman y colaboradores, trabajando en un laboratorio dedicado al estudio de la microbiología del suelo, descubrieron la estreptomycina (producida por Streptomyces griseus), antibiótico que permitió extender la quimioterapia al bacilo tuberculoso, así como a otros organismos gram negativos. El mismo grupo había aislado con anterioridad a la actinomicina, que fue el primero de una serie de antibióticos obtenidos de los estreptomycetos. Este antibiótico se rechazó a causa de su toxicidad (3).

Bérdy (1974) divide la historia de los antibióticos en tres períodos. El primero de ellos se sitúa alrededor de 1940 y se caracteriza por un desarrollo lento y acumulativo de observaciones básicas, así como algunos descubrimientos fundamentales. La utilización terapéutica de la penicilina y el comienzo del análisis sistemático de actinomicetos constituyen la "Era de Oro" de los antibióticos. El segundo período se caracteriza por descubrimientos fundamentales, resultado de la intensa búsqueda de nuevos antibióticos durante los 15 a 20 años siguientes. En 1960 la situación cambia, las demandas terapéuticas bajan y el período espectacular y dinámico en la búsqueda de antibióticos finaliza y adquieren importancia en el

desarrollo de las ciencias básicas, principalmente en la bioquímica y la microbiología, y en menor escala en la química orgánica y en la farmacología. También tienen una influencia decisiva en la biología molecular y se han utilizado para entender las interacciones hormona-receptor a nivel molecular. Como inhibidores específicos los antibióticos son cada vez más utilizados en investigación bioquímica; dentro de éstos se encuentran agentes citotóxicos (p.e. citocalasina, actinomicina), inhibidores específicos de la síntesis de ADN, ARN y de las proteínas (p.e. cloranfenicol, rifampicina y puromicina), inhibidores de la cadena transportadora de electrones (p.e. la oligomicina y la antimicina), sustancias que afectan el transporte de cationes a través de la membrana celular (p.e. valinomicina,, dianemicina, nonactina y alameticina) ( 4 ).

## 2.2. METABOLISMO SECUNDARIO

Se distinguen dos tipos de metabolismo, el primario y el secundario; El primero se refiere a la síntesis de materiales esenciales para el crecimiento de los organismos, como son los aminoácidos, los ácidos nucleicos, carbohidratos, lípidos, coenzimas, etc., y las vías son semejantes en la mayoría de los microorganismos; los genes involucrados se han conservado durante la evolución. Por otro lado, existen una variedad de vías bioquímicas características de unas pocas especies de organismos. Estas vías se conocen como "metabolismo secundario" y los compuestos formados son llamados "metabolitos secundarios";

este término lo introdujo Foster en 1949 y lo amplió Bu'Lock en 1961 (5). Hay diferentes opiniones sobre el significado biológico de la producción de metabolitos secundarios (6). Hutter menciona que los diferentes conceptos no se excluyen o contradicen entre ellos. Químicamente los metabolitos secundarios son muy diversos y la mayoría de ellos tienen pesos moleculares relativamente bajos. (Ver tabla No. 1) (7). A continuación se exponen algunos conceptos comúnmente atribuidos a metabolismo secundario:

- Los productos secundarios se sintetizan en la idiofase.
- El metabolismo secundario se relaciona con el crecimiento y es parte del proceso de maduración normal de los microorganismos investigados.
- El metabolismo secundario se relaciona con la diferenciación.
- Como consecuencia de la limitación de nutrientes, el flujo del metabolismo cambia.
- Ellos operan como mecanismos regulatorios.
- Los metabolitos secundarios son moléculas regulatorias que sirven para adaptarse a cambios medioambientales.
- Moléculas específicas regulan el metabolismo secundario
- Sirve para mantener los mecanismos de multiplicación celular cuando ésta no es tan prolongada.
- El metabolismo secundario juega un papel importante en la evolución.
- Controla la proliferación de otros organismos.
- Los metabolitos secundarios son hormonas que comunican

células y colonias.

- Es el resultado de la actividad de enzimas del metabolismo intermediario que actúan sobre pozas concentradas de metabolitos primarios, que resultan cuando el crecimiento no fue el adecuado debido a la insuficiencia de nutrientes.
- El metabolismo secundario es un proceso de detoxificación (8).

TABLA NO. 1. TIPOS DE COMPUESTOS ORGANICOS QUE SE ENCUENTRAN EN METABOLITOS SECUNDARIOS.

Aminoazúcares	Lactonas	Pironas
Antocianinas	Macrólidos	Pirroles
Antraquinonas	Naftalenos	Pirrolinas
Aziridinas	Naftoquinonas	Pirrolizinas
Benzoquinonas	Nucleósidos	Quinolinas
Cumarinas	Oligopéptidos	Quinolinas
Diazinas	Fenazinas	Quinonas
Epóxidos	Fenoxazinonas	Salicilatos
Alcaloides del ergot	Ftaldehídos	Terpenoides
Flavonoides	Piperazinas	Tetraciclinas
Glutaramidas	Poliétilenos	Acidos tetrónicos
Glicósidos	Polienos	Triazinas
Hidroxilaminas	Pirazinas	Tropolones
Derivados del indol	Piridinas	

Mientras que algunos aspectos del metabolismo secundario son relativamente conocidos, su química y su bioquímica son oscuras y es poco lo que se sabe sobre el mecanismo de acción de la mayoría de los procesos regulatorios y las vías moleculares que integran su biosíntesis dentro del programa de diferenciación y desarrollo.

### 2.3. ANTIBIÓTICOS COMO PRODUCTOS DEL METABOLISMO SECUNDARIO

Los antibióticos se definen como sustancias producidas por microorganismos vivos que en bajas concentraciones inhiben el crecimiento de otros microorganismos (7).

Durante su ciclo de vida normal, un organismo crece en un medio de cultivo apropiado hasta que produce el máximo número de células que se pueden formar bajo estas condiciones. La limitación en el crecimiento puede deberse a una disminución en el suministro de oxígeno, la fuente de carbono u otros factores nutricionales o ambientales. Una vez que el cultivo detiene su crecimiento, entra en la fase estacionaria seguida por la muerte o alternativamente, por la formación de esporas. Generalmente es en esta etapa (después que las células han dejado de dividirse), cuando se inicia la producción de los metabolitos secundarios, la que continúa por cierto tiempo, que puede ser más largo o más corto que el período activo de crecimiento del cultivo.

Se pueden distinguir dos fases metabólicas: la anabólica y la catabólica. A través del tiempo estas fases recibieron otros

nombres que caracterizan a los procesos metabólicos en los hongos. En 1965, Bu'Lock y Powell introdujeron los términos trofofase, cuando el crecimiento micelial o celular ocurre a través del metabolismo primario, e idiofase cuando el crecimiento se vuelve más lento o termina y las vías del metabolismo secundario comienzan a operar; sin embargo, en el año de 1975 el mismo autor considera que esto es una simplificación. Borrow (1964) propone las fases de crecimiento balanceado y fase de almacenamiento, pero también menciona otras fases que son de transición, de mantenimiento y terminal (8).

#### 2.4. GENETICA DE ANTIBIOTICOS

El metabolismo secundario está controlado por su propio material genético y gran parte del genoma puede estar involucrado en la formación del producto secundario. Así, la mutación de genes estructurales usualmente inactiva las enzimas metabólicas secundarias por alteración de la secuencia de aminoácidos. En eucariotes los genes estructurales que codifican enzimas normalmente se localizan en el genoma nuclear. Se sabe que ni el ADN de plástidos ni el de mitocondria codifiquen para enzimas del metabolismo secundario. Sin embargo, en algunos procariones se ha encontrado que los genes estructurales de algunas vías metabólicas secundarias que residen en plásmidos (5). Estos son elementos autónomos que existen en el genoma de la célula como unidades extracromosomales. Los plásmidos son moléculas de ADN circular que se replican por sí mismos y se mantienen en la

célula en un número estable de copias (9).

Los plásmidos pueden perderse espontáneamente de las cepas que los tienen y esta pérdida puede incrementarse por ciertos tratamientos llamados curantes, incluyendo el uso de colorantes intercalantes como la acridina o el bromuro de etidio, la rifampicina, la luz ultravioleta o agentes tensoactivos. Los plásmidos varían en la posibilidad de ser curados (10-17).

Entre los reportes de plásmidos involucrados en la síntesis de antibiótico se encuentra el del plásmido "sexual SCP1" de *Streptomyces coelicolor*; el cual lleva 4 o 5 genes estructurales para la producción del antibiótico metilenomicina A (18-19).

Por otro lado, existen evidencias sobre un plásmido involucrado en la biosíntesis de cloranfenicol ya que esta se altera después de tratamiento con anaranjado de acridina, probablemente por su acción sobre la producción de la arilaminosintetasa codificada en un plásmido (20).

Existen pruebas de la participación de un plásmido en la síntesis del macrólido turimicina cuando las cepas dejan de producirlo, después de un tratamiento con anaranjado de acridina o bromuro de etidio (21). También hay evidencias de la existencia de diferentes perfiles de ADN en gradientes de centrifugación entre cepas productoras y no productoras (21).

*Streptomyces kasugaensis* pierde la capacidad de producir kasugamicina o aureomicina después de tratamientos con anaranjado de acridina o temperaturas altas, pero no se han obtenido evidencias genéticas o físicas concluyentes. Lo mismo sucede

con la producción de oxitetraciclina en *Streptomyces rimosus* después del tratamiento con anaranjado de acridina (22).

## 2.5. FUENTES DE ANTIBIOTICOS.

Las principales fuentes de antibióticos microbianos son los actinomicetos, las bacterias y los hongos microscópicos.

Los actinomicetos son un grupo único en cuanto al número y diversidad de antibióticos que producen. Berdy (1974) reporta más de 1950 compuestos de *Streptomyces*, incluyendo cloranfenicol, eritromicina, kanamicina, neomicina, novobiocina, estreptomycin y tetraciclina; esto refleja la facilidad de aislamiento de antibióticos a partir de estreptomicetes. Más recientemente, han surgido como productores de antibióticos importantes, especies de *Nocardia* (rifampicina, ristocetina) y *Micromonospora* (gentamicina, sisomicina).

Berdy (1974) adjudica a otras bacterias la producción de 360 antibióticos, los cuales son sintetizados por un gran número de grupos taxonómicos. Sin embargo, los bacilos producen cerca de la mitad del total, mientras que *Pseudomonas* una cuarta parte. El género *Bacillus* es el más importante comercialmente, ya que casi todos los antibióticos peptídicos lineales o cíclicos los producen miembros de este género: *B. brevis* (gramicidina S y gramicidina A lineal, tirocidina y edeinas), *B. licheniformis* (bacitracina), *B. colistinus* (colistina), y *B. subtilis* (micobacilina) (4).

El primer antibiótico importante, la penicilina, es

producido por hongos filamentosos. Los géneros *Penicillium* y *Aspergillus*, de la familia Aspergillaceae, producen la gran mayoría de los antibióticos provenientes de hongos aunque recientemente se han descrito nuevos compuestos con actividad antibiótica a partir de otros Moniliales (4).

## 2.6. CLASIFICACION DE ANTIBIOTICOS.

La clasificación de los antibióticos se propuso con base en su 1) origen, 2) biosíntesis, 3) espectro de actividad, 4) mecanismo de acción, 5) propiedades fisicoquímicas, y 6) propiedades químicas; sin embargo, Bérdy menciona que la estructura química es la única propiedad que no es ambigua y que a través de la misma se determinan las propiedades físicas, químicas, microbiológicas, farmacológicas y finalmente clínicas (4).

TABLA NO. 2 CLASIFICACION DE ANTIBIOTICOS DE ACUERDO A SU ESTRUCTURA QUIMICA (4).

- 1) Antibióticos que contienen carbohidrato.
- 2) Antibióticos lactámicos con un anillo de lactona macrocíclico (anillo que contiene más de ocho miembros).
- 3) Esqueletos de quinona ( o semejante a quinona)
- 4) Aminoácidos (antibióticos peptídicos).
- 5) Sistemas heterocíclicos que contienen nitrógeno.
- 6) Sistemas heterocíclicos que contienen oxígeno.
- 7) Esqueletos alicíclicos.
- 8) Esqueletos aromáticos.
- 9) Cadenas alifáticas.

## 2.7. MECANISMOS PARA EL MEJORAMIENTO DE CEPAS

Hay tres procedimientos genéticos básicos para el mejoramiento de cultivos de productos de fermentación en microorganismos que son a) la mutación, b) la recombinación y c) clonación de genes (23).

La mutación tiene la ventaja de la simplicidad; requiere pocos conocimientos de la genética y fisiología de las vías importantes involucradas en la biosíntesis del metabolito secundario. La mutagénesis contribuye sustancialmente al mejoramiento de cepas. El uso de un mutágeno en dosis

apropiadas son esenciales para el mejoramiento de la cepa. Para cada proceso mutagénico y cada organismo hay una combinación de concentración de mutágeno, tiempo de exposición y condiciones del tratamiento, que producen una alta proporción de una clase de mutante que sobrevive al efecto del agente (24). Brown y Elander (1966) usaron luz ultravioleta para el mejoramiento de su cepa y discutieron la dosis apropiada basada en sus resultados. Se hallaron mutantes con títulos mejorados, en dosis que permitieron una sobrevivencia del 10% de la población tratada. La mayoría de las cepas mejoradas exhibieron una morfología colonial normal (25). Calam (1970) discutió las técnicas generales de mutagénesis con luz ultravioleta, rayos X, rayos gamma y agentes químicos como la N-metil-N-nitro-N-nitrosoguanidina y etil metano sulfonato (26).

La selección de mutantes mejoradas es por lo general más laboriosa que el de mutantes auxótrofas, de color o de mutantes resistentes a alguna droga. Muchas veces son necesarios procedimientos y estadísticos para una selección eficiente. En las tablas 3 y 4 se muestran las características de cepas microbianas mejoradas por selección y mutación (27).

TABLA NO.3. CARACTERISTICAS MICROBIANAS MEJORADAS POR SELECCION.

ORGANISMO	PRODUCTO	CARACTERISTICA
<i>Aspergillus</i>	Proteasas	Rendimiento
<i>Rhizopus</i>		Otros
<i>A. oryzae</i>	Enzimas amiloliticas	Rendimiento
<i>Claviceps</i> spp.	Alcaloides, ácido lisérgico.	Rendimiento
<i>Eusarcium</i> spp.	Biomasa	Morfología micelial, contenido proteico valor nutricional

Tomado de Johnston ,1975 (27)

TABLA NO. 4. CARACTERISTICAS MEJORADAS POR MUTACION

ORGANISMO	PRODUCTO	CARACTERISTICA
<i>Aspergillus cinnamomeus</i>	amilasas	rendimiento
<i>A. niger</i>	ácido cítrico	rendimiento
<i>Cephalosporium acremonium</i>	cefalosporina C	rendimiento
<i>Eremothecium ashbyii</i>	riboflavina	rendimiento
<i>Eusarcium moniliforme</i>	giberelinas	rendimiento
<i>Eusarcium moniliforme</i>	giberelinas	proporción de componentes
<i>Penicillium chrysogenum</i>	penicilina	rendimiento

Tomado de Johnston, 1975 (27).

El primer reporte de una cepa mejorada es el de *Penicillium chrysogenum*, con un incremento en su actividad de 200 a 3000 U/ml utilizando la cepa de Wisconsin Q174 (28). Elander (1973) describe el mejoramiento de una cepa de *Penicillium chrysogenum* derivada de la de Wisconsin Q174 por mutagénesis sucesiva con luz ultravioleta, metil-bis-( $\beta$ -cloroetil)amina (NM) y diepoxibutano (29), logró aumentar en 23 veces el título del antibiótico de la cepa Q174. Dennen (1969), reporto un mejoramiento del título para la cefalosporina C (30). También hay reportes del uso de mutantes afectadas en sus mecanismos regulatorios. Luengo (1980) comparó el efecto regulatorio de lisina sobre la biosíntesis de penicilina en cepas de baja y alta productividad; donde se observó que la lisina inhibe parcialmente la síntesis en la cepa de alta productividad y en su totalidad en la de baja (31-32). Otro de los reportes es el referente a la síntesis de la candidicina, donde la p-aminobenzoico sintetasa es reprimida por aminoácidos aromáticos y por ello inhibe la producción del antibiótico (33-34). Mendelevitz (1983) describió el aislamiento y caracterización de mutantes de *Streptomyces clavuligerus* resistente a un análogo de la lisina ( $\alpha$ -(2-aminoetil)-L-cisteína) porque tiene afectado el mecanismo regulatorio a nivel de la aspartato cinasa. Estas mutantes mostraron aumentos significativos en la producción de antibióticos  $\beta$ -lactámicos (35).

La recombinación genética es un adjunto importante de la mutagénesis una vez que varias líneas de mutantes se han establecido; con ello se pueden obtener cepas con diferentes

combinaciones de mutaciones que influyen en el título del producto. El desarrollo de técnicas de fusión de protoplastos permite recombinar propiedades en un amplia variedad de microorganismos.

La clonación de genes tiene diferentes ventajas para sistemas altamente desarrollados, donde los factores limitantes para el título del producto son bien entendidos. Este método puede usarse cuando se conocen las enzimas regulatorias. Puede también utilizarse en conjunto con mutagénesis dirigida para alterar la fuerza del promotor, los sitios que se unen al ribosoma o para modificar enzimas y eliminar algunas propiedades indeseables, como la inhibición por producto (23).

## 2.8. ANTECEDENTES DEL PROYECTO.

### 2.8.1. TAXONOMIA DE *Didymodendron tenuissimum*

En 1932 Robak describe un nuevo género de los hifomicetos llamado *Didymodendron*; en su artículo original él refiere tres especies: *Q. fungum*, *Q. chedokeum* y *Q. nigrum* (referido también como *Q. cerealis*). Todos fueron aislados de pulpa de madera almacenada o de troncos, en la vecindad de aserraderos de pulpa en Noruega. Más tarde en un artículo de Melin y Nannfeldt (1934), Robak añade una cuarta especie, *Q. griseum* de pulpa de Suecia. *Q. flavum* fué reportado por Von Szilvinyi (1941) aislados de suelo en Alemania y *Periconia tenuissimum* Peck fué cambiado al género *Didymodendron* por Hughes

(1958). Por otro lado, *Q. tenuissimum* se considera conoespecifico de *Q. fuscum*.

El lectotipo *Q. fuscum* Robak (= *Q. tenuissimum* (Peck) Hughes es una especie con conidióforos esbeltos oscuros que crecen verticalmente del sustrato 200 micras antes de ramificarse repetidamente para formar la cabeza de una hifa fértil. Estas hifas se separan escasamente por septación basipeta y llegan a dividirse en un gran número de segmentos cortos. Los segmentos individuales maduros de la cima dan lugar a conidios unicelulares semejanado un árbol diminuto (Fig. 1).

Un hecho interesante en el desarrollo de *Qidiodendron* es que la cabeza llega a ser más densa con la edad; conforme madura la hifa fértil hacia atrás del eje principal del conidióforo, nuevos brazos se elevan inmediatamente detrás de la línea de maduración (36).

**TABLA No. 5. CLASIFICACION TAXONOMICA DE *Qidiodendron tenuissimum*.**

REINO : Fungi  
DIVISION : Eumycota  
SUBDIVISION : Deuteromycotina  
CLASE : Hyphomycetes  
ORDEN : Moniliales  
FAMILIA : Dematiaceae  
GENERO : *Qidiodendron*  
ESPECIE : *tenuissimum* (Peck) Hughes

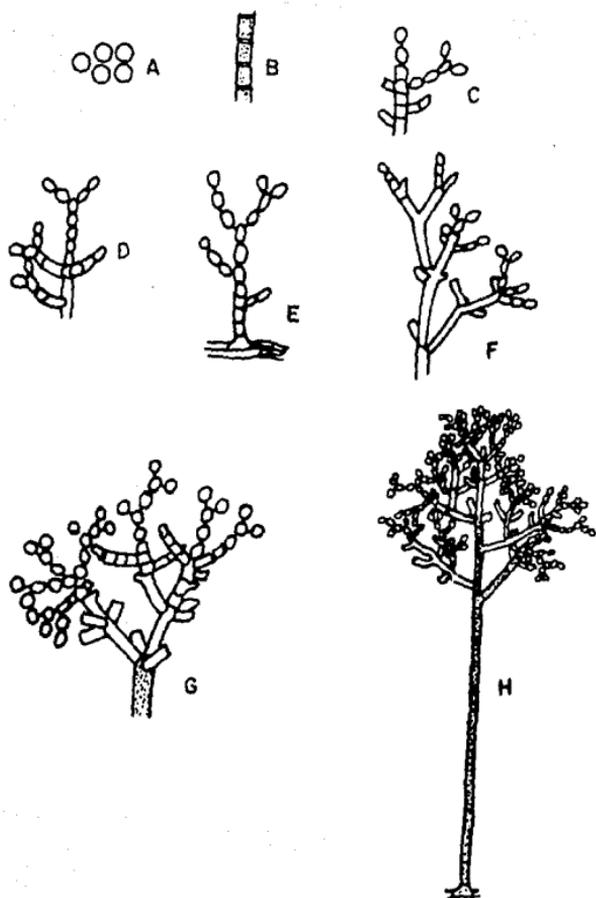


Fig. No. 1 Oidiendron tenuissimum. (A) Conidios. (B-G) Varias etapas en la diferenciación de conidios a partir de hifas fértiles. (H) Conidióforo maduro (36).

## 2.8.2. REPORTE DE LA PRODUCCION DE ANTIBIOTICOS POR EL GENERO

### Didymodendron.

Realmente existen pocos reportes de producción de antibióticos por el género Didymodendron. El primero de ellos fue el de Michael en 1948, donde describe la preparación, propiedades y actividad antibacteriana, particularmente contra todas las bacterias Gram positivas probadas y en menor grado contra microorganismos Gram negativos, de un producto metabólico no descrito, aislado de dos cepas diferentes de Didymodendron fuscum, al que llamaron fucsina (37).

Filipello en 1976 encontró actividad antibiótica en medios de cultivos y micelio de Didymodendron contra algunas bacterias, como Staphylococcus aureus, Escherichia coli, Bacillus subtilis y contra la levadura Candida albicans (38).

En 1981 Crawley aisló, de una cepa de Didymodendron rhodogenum Robak, ácido curvilínico y tres nuevos metabolitos. Una segunda cepa de Didymodendron rhodogenum Robak, numerada ACC6689, no produjo cantidades detectables de los metabolitos mencionados anteriormente, cuando se cultivo en las mismas condiciones, aunque se aislaron metabolitos relacionados, como la fucsina y la dehidrofucsina. En contraste a estos últimos, los metabolitos aislados de la primera cepa no muestran actividad contra Staphylococcus aureus, aunque no menciona contra qué microorganismos son efectivos (39).

Andersen en 1983 reportó que cepas de Didymodendron truncatum producían un nuevo antibiótico que llamó PR-1350, el

cual mostró ser de amplio espectro en ensayos *in vitro* y presentó actividad contra leucemia linfocítica del tipo P-388 en ratón. El antibiótico se aisló de una cepa de *O. truncatum* obtenida de una muestra de suelo que se colectó cerca de Copenhague y se demostró que lo producían todas las cepas de *O. truncatum* probadas, mientras que otras especies de *Didymodendron* carecían de esta propiedad. El producto secundario tiene una mayor especificidad contra bacterias Gram positivas (40). En un reporte posterior el mismo autor detalló los estudios estructurales del antibiótico PR-1350, al cual dió el nombre de clerocidina (41).

### 2.8.3. ESTUDIOS PREVIOS REALIZADOS EN EL LABORATORIO.

El hongo *Didymodendron tenuissimum* fue aislado por el Dr. Valentín Mendoza del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM a partir de cultivos de *Saccharomyces cerevisiae*, contaminados con dicho hongo, y clasificado por el Dr. Miguel Ulloa del Instituto de Biología de la UNAM; en los cultivos de la levadura se observó una marcada inhibición del crecimiento. Con base en esta observación y en que la bibliografía no reportaba algún antibiótico producido por este hongo, se inició un proyecto para el estudio de este producto.

Actualmente se tiene una preparación parcialmente purificada del antibiótico, el cual tiene como características importantes ser termostable, dializable, fotorresistente y estable en un amplio intervalo de valores de pH.

Además se probó la actividad antibiótica contra otras

especies de levaduras, hongos filamentosos y bacterias, incluyendo algunas de interés médico. Entre las bacterias y hongos patógenos que inhibe están *Staphylococcus aureus*, *Nocardia asteroides*, *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans*, *Microsporium canis*, *Microsporus gypseum*, *Trichobryton mentagrophytes*, *Trichobryton cubrum*, *Trichobryton tonsurans*, *Aspergillus fumigatus* y *Sporothrix schenckii*.

### 3. OBJETIVOS:

- 3.1. Aislar cepas naturales productoras del antibiótico y evaluar la actividad antibiótica y estabilidad de la producción, de colonias provenientes de un solo clon.
- 3.2. Determinar si participa un plásmido en la producción del antibiótico.
- 3.3. Obtener cepas con mayor producción de antibiótico por mutagénesis con agentes alquilantes y luz ultravioleta.
- 3.4. Estudiar la estabilidad de producción del antibiótico en las cepas mejoradas aisladas.
- 3.5. Determinar el efecto de la fuente de carbono en el crecimiento del hongo y en el rendimiento de la producción del antibiótico.

#### 4. MATERIAL Y METODOS:

##### 4.1. MATERIAL BIOLÓGICO:

- Cepa de *Saccharomyces cerevisiae* D311-3A. Proporcionó el Dr. James R. Mattoon. Universidad de Colorado. Colorado Springs. Co.
- Cepa de *Didymodendron tenuissimum*. Aislada en el laboratorio de la Dra. A. Brunner por V. Mendoza del Instituto de Fisiología Celular y clasificado por el Dr. M. Ulloa del Instituto de Biología, UNAM.

- UNIDAD DE ANTIBIOTICO. Se define como la cantidad en mg de extracto crudo que inhiben el 50% de crecimiento determinado en peso seco de la cepa *Saccharomyces cerevisiae* D311-3A. Cuando esta se encuentra en la fase de crecimiento logarítmico en medio YPD(2) a 30 C.

##### 4.2. PREPARACION DE MEDIOS DE CULTIVO Y AMORTIGUADORES.

Medio con glucosa al 4%, YPD(4).

- Peptona de gelatina 1 %
- Extracto de levadura 1 %
- Glucosa 4 %
- Agar (medio sólido) 2 %

Medio con glucosa al 2% , YPD(2).

- Peptona de gelatina 1 %
- Extracto de levadura 1 %
- Glucosa 2 %
- Agar (medio sólido) 2 %

Medio de carbohidratos.

- Peptona de gelatina 1 %
- Extracto de levadura 1 %
- Fuente de carbono.

La concentración de fuente de carbono que se adicionó fué en relación al número de carbonos de la molécula de cada uno de ellos.

- Agar (medio sólido) 2 %

#### FUENTES DE CARBONO UTILIZADAS

Acetato de sodio	0.66 M	Galactosa	0.22 M
Glicerol	0.44 M	Glucosa	0.22 M
Xilosa	0.26 M	Lactosa	0.11 M
Citrato	0.22 M	Maltosa	0.11 M
Fructosa	0.22 M	Sacarosa	0.11 M

AMORTIGUADOR DE FOSFATOS, 50 mM pH 7.0.

- Fosfato monobásico de potasio 2.62 g.
- Fosfato dibásico de potasio 7.00 g.
- Agua destilada c.b.p. 1000 ml.

AMORTIGUADOR CITRATO-FOSFATO ESTERIL. (0.2 M. -0.1 M pH 7.7)

- Fosfato dibásico de sodio 0.2 moles
- Acido cítrico 0.1 moles
- Agua destilada c.b.p. 1000 ml.

Disuelva 0.2 moles de fosfato dibásico de sodio y 0.1 moles de acido cítrico en ligeramente menos de un litro de agua. Ajuste a pH 7.7 con hidróxido de sodio (se requieren aproximadamente 30 ml de 10 M). Afore a un volúmen final de un litro.

SOLUCION PATRON N-nitro-N-metil-N-nitrosoguanidina (20 µg/ml).

Disuelva 5 mg de NMG en 250 ml de amortiguador de fosfato citrato estéril. Debe prepararse inmediatamente antes de su uso.

4.3. OBTENCION DE CEPAS PROVENIENTES DE UN SOLO CLON.

El hongo se cultivó en medio líquido de YPD(4), durante 28 días a 25 C, al termino de este tiempo se hizo una suspensión

de esporas en 10 ml de agua destilada estéril; se colocó una asada de esta suspensión en un soporte de agarosa al 2% , se puso en la cámara de disección y se realizó la separación de esporas en un estereomicroscopio con el objetivo de 20x. Las esporas separadas en el soporte de agarosa se transfirieron a una caja de Petri con medio sólido de YPD(4) y se incubó hasta la aparición de crecimiento puntiforme, que indica que la espora aislada germinó. Se separó cada colonia, se colocó individualmente en medio YPD(4) y se probó la actividad antibiótica por bioensayo a los 28 días ( Ver Fig. 2).

#### 4.4. BIOENSAYO PARA EVALUAR Y SELECCIONAR LAS CEPAS PRODUCTORAS DE ANTIBIOTICO.

Este método se ha utilizado para detectar el mejoramiento en rendimientos por incremento en el diámetro de la zona de inhibición contra un organismo sensible, aunque tiene el inconveniente de que muchas veces no se logra visualizar claramente un aumento en el rendimiento aún cuando éste se duplique (42).

En cada una de las cajas que contenía una colonia proveniente de una sola espora, crecidas en medio YPD(4) a 25 C durante 28 días de cultivo, se sembró utilizando una varilla de vidrio un césped de *Saccharomyces cerevisiae* D311-3A (1.5 millones de células en 0.2 ml) sensible al antibiótico. Se incubó a 30°C y se hizo la lectura a las 24 y 48 horas. El resultado se reportó en cm de diámetro del halo de inhibición.

FIG.No.2 DISECCION DE ESPORAS

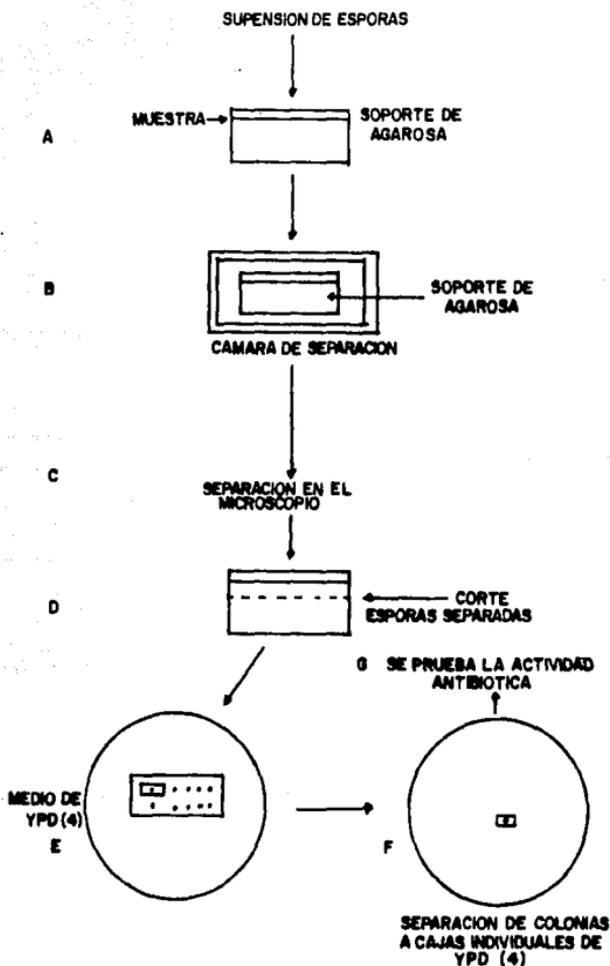


Fig. No. 2. Separación de esporas. (A) Se aplica una muestra de la suspensión de esporas en agarosa. (B) La agarosa se coloca en la cámara de separación. (C). Separación de esporas al microscopio. (D-E) La agarosa se transfiere a medio de YPD(4). (F). Separación de colonias individuales a YPD(4). (G). Se prueba la actividad antibiótica.

#### 4.5. PREPARACION DE SUSPENSION DE ESPORAS.

Un cultivo de *Q. tenuissimum* crecido durante 28 días a 25°C en YPD(4) se homogenizó por agitación y se filtró a través de lana de vidrio para separar los restos miceliales. Todas las manipulaciones se hicieron asépticamente y con equipo estéril. A la suspensión se le determinó el número de esporas por ml en una cámara de Neubauer (42).

#### 4.6. EVALUACION DE LA PRESENCIA DE UN PLASMIDO EN LA PRODUCCION DEL ANTIBIOTICO.

##### 4.6.1. TRATAMIENTO CON BROMURO DE ETIDIO Y ACRIFLAVINA: "CURACION DE PLASMIDO".

A partir de un cultivo líquido de *Q. tenuissimum* crecido en YPD(4) durante 28 días a 25°C se hizo una suspensión de esporas y se le determinó el número por ml. Se adicionaron aproximadamente 100 esporas a medio líquido de YPD(4) que contenían diferentes concentraciones de bromuro de etidio y acriflavina y se tomaron alícuotas a diferentes tiempos. Se graficó contra tiempo de incubación el número de esporas viables a diferentes concentraciones y se seleccionó la concentración más baja de bromuro de etidio y acriflavina en la que se observó efecto marcado sobre la viabilidad (42). Ver resultados.

Una vez que se seleccionó la concentración de bromuro de etidio y acriflavina, se cultivó el hongo con estas

concentraciones de drogas, se incubó por 28 días y se hizo la separación de las esporas individuales. Se determinó el porcentaje de esporas productoras en presencia de estas drogas.

#### 4.6.2. OBTENCION DE ADN TOTAL DE CEPAS DE Didymodendron tenuissimum

Se incubaron 5 g de micelio en hielo seco molido durante una hora. En la licuadora se rompió el micelio congelado. Se añadieron 30 ml de NaCl 0.15 M en EDTA 0.1 M pH 8, se adicionaron 2 ml de SDS al 25% y se agitó. La capa superior de la suspensión de células se transfirió a un matraz Erlenmeyer de 250 ml y se calentó a 60°C en un baño de agua por 10 minutos. Se enfrió a temperatura ambiente y se añadieron 5 ml de perclorato de sodio 6 M, se mezcló y se agitó con un volumen igual de cloroformo : alcohol isoamílico (24:1). La emulsión resultante se centrifugó por 3 min a 5,000 rpm. El sobrenadante se transfirió a un matraz Erlenmeyer de 125 ml y se adicionaron cuidadosamente 70 ml de etanol frío, 4°C. Se mezcló suavemente con una varilla de vidrio, colectando el precipitado fibroso por enrollamiento sobre la varilla y escurriendo el exceso de líquido por las paredes del matraz. El ovillo se pasó a un tubo que contenía 10 ml de agua más 1 ml de la solución salina-EDTA. Tan pronto como el ADN se disolvió, se añadieron 0.5 ml de SDS al 25%, 2 ml de perclorato de sodio 6 M y 10 ml de cloroformo-alcohol isoamílico (24:1). Se repitió el paso de desproteínización. Se pesó la suspensión y se agregó, el

equivalente a el 55% en peso de cloruro de Cesio se incubó toda la noche a 4°C. Al día siguiente la solución se centrifugó a 17 rpm durante 30 min a 4°C y se eliminó la capa de proteínas decantando cuidadosamente a un tubo limpio. Se ajustó el índice de refracción a 1.395-1.396. Se añadieron 120 µl de bromuro de etidio (5 mg/ml) y se centrifugó en un rotor 50Ti a 40,000 rpm por 36 horas.

En un lugar oscuro e iluminando con luz ultravioleta de onda larga se sacaron las fracciones del gradiente con una aguja de raquia y el bromuro de etidio se extrajo con isopropanol saturado con cloruro de Cesio. La muestra se dializó durante dos horas con amortiguador TE (Tris 10 mM, EDTA 1 mM pH 7.5), se agregó la décima parte de acetato de sodio 0.3 M y se dejó precipitar toda la noche en frío (-20°C). El ADN se centrifugó a 10,000 rpm durante 10 min, se lavó con etanol frío al 70%. Se centrifugó nuevamente a 10,000 rpm por 10 min y se secó al vacío. Finalmente se resuspendió el ADN en amortiguador T.E. El ADN así obtenido se analizó por electroforesis en geles de agarosa (43).

#### 4.7. EXTRACCION DE ANTIBIOTICO.

A partir de un cultivo de *O. tenuissimum* de 28 días de crecimiento en YPD(4) a 25°C se separó por filtración el micelio del caldo de cultivo. El caldo de cultivo se extrajo tres veces en un embudo de separación con cloroformo y el micelio se resuspendió inmediatamente después de la filtración en

150 ml de cloroformo y se puso en agitación por 24 hrs a 4° C. Este paso se repite tres veces. Los extractos cloroformicos obtenidos se concentraron en un rotavapor y se determino el peso seco del extracto obtenido del caldo y del micelio (Fig. 3).

#### 4.8. EVALUACION CUANTITATIVA DE LA ACTIVIDAD ANTIBIOTICA (Método de titulación)

El extracto crudo se resuspendió en alcohol etílico absoluto y se hicieron diluciones en 10 ml de medio YPD(2), de 1:50, 1:100, 1:200, 1:400, 1:800, 1:1600, se agregaron  $1 \times 10^6$  células por ml de *Saccharomyces cerevisiae* D311-3A, y se incubó a 30 C durante 24 horas a 250 rpm en un agitador rotatorio. Se colectaron 2 ml de medio en filtros Millipore (tamaño de poro 0.45  $\mu$ ). Los filtros se secaron en la estufa a 60° C durante dos horas y se determinó el peso seco de la levadura. Se graficó mg de extracto crudo contra porcentaje de crecimiento (peso seco de la levadura respecto al control) y se calculó la cantidad de extracto crudo que inhibe el 50% de crecimiento (1 Unidad).

#### 4.9. MUTAGENESIS CON LUZ ULTRAVIOLETA.

##### 4.9.1. CURVA DE SOBREVIVENCIA CON LUZ ULTRAVIOLETA.

Una suspensión de esporas, cuya concentración se determinó por cuenta en un hemocitómetro, se sometió a irradiación con luz ultravioleta con agitación continua a 25°C y se tomaron alicuotas a los 30, 60, 90, y 120 seg. Las muestras

# EXTRACCION DE ANTIBIOTICO

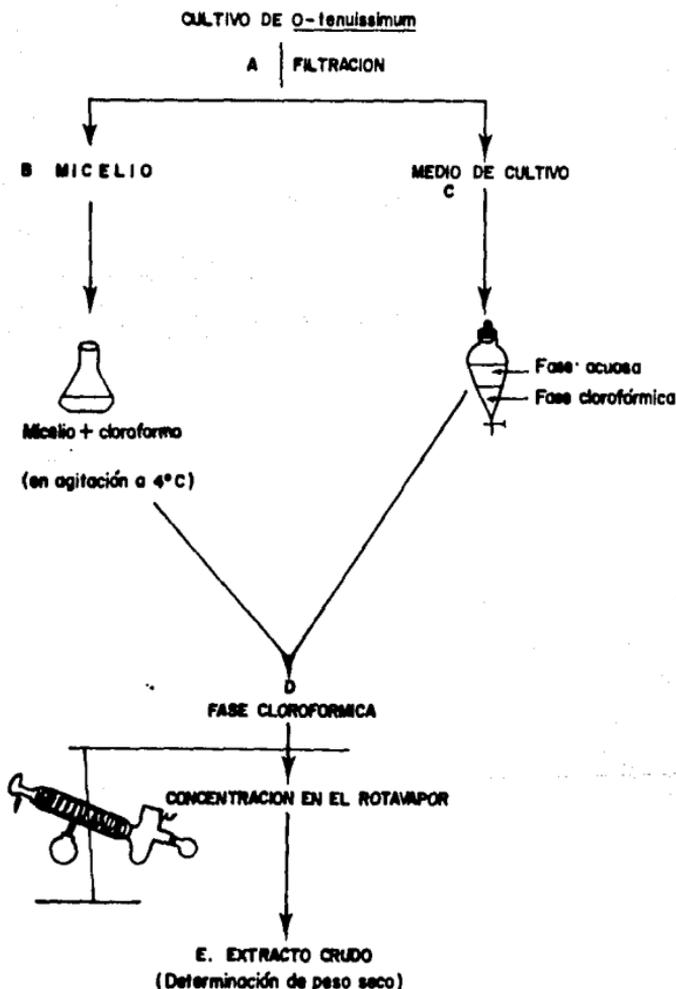


Fig. No. 3. A partir de un cultivo de *O. tenuissimum* se separo el medio de cultivo del micelio por filtración. (B) El antibiótico se extrae del micelio por agitación en cloroformo a 4°C durante 24 hrs. (C) Se extrae el antibiótico de medio de cultivo (D) Los extractos cloroformicos se concentran en el rotavapor. (E) Determinación de peso seco del extracto crudo.

se plaquearon en cajas con medio de YPD(4).

Se contó el número de colonias viables y se elaboró la curva de sobrevivencia graficando el tiempo de tratamiento contra el logaritmo de las colonias formadas. A partir de la gráfica se calculó el tiempo al que se tuvo el 1 y 10% de sobrevivencia (75 y 38 seg respectivamente). Ver resultados.

#### 4.9.2. MUTAGENESIS CON LUZ ULTRAVIOLETA.

La mutagénesis se realizó irradiando una suspensión de esporas a los 38 y 75 seg. tiempos en que se obtuvo el 10 y 1% de sobrevivencia. Se tomaron alícuotas en estos tiempos se sembraron en cajas de YPD(4). A los 7 días se separaron las colonias a cajas individuales con medio de YPD(4) y a los 28 días de crecimiento se midió la actividad antibiótica por bioensayo, las mutantes se seleccionaron en base al diámetro del halo de inhibición.

#### 4.10. MUTAGENESIS CON ETIL METANO SULFONATO (EMS).

##### 4.10.1. DETERMINACION DE DOSIS DE EMS.

Un cultivo de *Q. tenuissimum* de 28 días de crecimiento en YPD(4) a 25°C se resuspendieron en amortiguador de fosfatos 50 mM pH 7.0. A un ml de esta suspensión se le agregaron 50, 100, 200 y 300 µl de EMS (equivalente a 0.0585, 0.117, 0.234, 0.351 g/ml respectivamente), se agitó en baño María a 25°C durante una hora. Al término de la incubación se tomaron 0.2 ml

y se pusieron en 8 ml de tiosulfato de sodio al 5% para destruir el EMS. Se hicieron diluciones y se sembraron aproximadamente 100 esporas en cada caja de Petri con YPD(4). Se hizo una gráfica de dosis contra viabilidad y se seleccionó la concentración mínima a la que se observó un efecto en el porcentaje de la viabilidad (26).

#### 4.10.2. DETERMINACION DEL TIEMPO DE MUTAGENESIS CON EMS.

Las células se resuspendieron en amortiguador de fosfatos pH 7.0. En una cámara de Neubauer se contó el número de esporas. A 1 ml de la suspensión se le agregaron 100  $\mu$ l de EMS, se agitó a 30°C y se tomaron alicuotas de 0.2 ml a los 0, 15, 30, 45, 60, 90 y 120 min, las que se agregaron a tubos con 8 ml de tiosulfato de sodio al 5%. Se hicieron diluciones 1:100 y se sembraron con 0.2 ml de esta suspensión cajas de Petri con YPD(4). Se graficó el tiempo contra el número de esporas viables y se seleccionó el tiempo al que se tuvo el 1 y 10 % de sobrevivida.

#### 4.11. MUTAGENESIS CON N-METIL-N -NITRO-N-NITROSOGUANIDINA: NMG

##### 4.11.1. DETERMINACION DE LA DOSIS DE MUTAGENO.

En un matraz Erlenmeyer de 50 ml se puso 1 ml de suspensión de esporas, cuya concentración se determinó previamente por conteo en un hemocitómetro. Se adicionaron 5 ml de solución de NMG 20, 40, 60, 80, 100, 120, 140, 160, 180 y

200  $\mu$ g/ml en amortiguador de citrato-fosfato estéril (0.2 M -0.1 M pH 7.7) y se incubó durante una hora. Al cabo de este tiempo se tomaron alicuotas de 0.1 ml y se sembraron en cajas de YPD(4). Se graficó la dosis del mutágeno contra el número de esporas viables (26).

#### 4.11.2. DETERMINACION DEL TIEMPO DE MUTAGENESIS CON NMG.

A dos matraces Erlenmeyer se les añadió 1 ml de suspensión de esporas (120,000 esporas/ml). A uno de los matraces se le agregó 5 ml de solución de NMG (100 g/ml) y al control 5 ml del amortiguador de citrato-fosfatos (0.2 M -0.1 M pH 7.7). Se agitó a 25°C y se tomaron alicuotas de 0.1 ml a los 0, 15, 30, 45, 60, 90 y 120 minutos de que se agregaron a tubos que contenían 5 ml de agua estéril (1:50). De ahí se hicieron diluciones 1:100 y se sembraron en placas de medio de YPD(4). Se graficó el número de esporas viables contra el tiempo y se seleccionó el tiempo de mutagénesis al que se obtuvo 1 y 10% de sobrevida.

#### 4.12. DETERMINACION DE LA ESTABILIDAD DE PRODUCCION DE ANTIBIOTICO.

Se determinó la producción de antibiótico por el tamaño de halo de inhibición en un muestreo al azar (25 eventos) hasta la cuarta generación. El resultado se reporta en porcentaje de esporas productoras.

#### 4.13. EVALUACION DE CARACTERISTICAS DE CRECIMIENTO Y PRODUCCION DE ANTIBIOTICO A TRAVES DEL TIEMPO.

En frascos de cultivo Wheaton con 150 ml de medio líquido de YPD(4) se inocularon con 250,000 esporas. Se muestró por triplicado cada semana por un periodo de ocho semanas. Las muestras se colectaron al vacío y a cada una de ellas se le determinó:

- a) Peso seco de micelio.
- b) pH del medio de cultivo
- c) Producción de antibiótico en el medio de cultivo y micelio, por titulación.

Con los datos obtenidos se hicieron gráficas del crecimiento, cambios de pH en el medio con respecto al tiempo y cinética de la producción del antibiótico en relación al tiempo, tanto el excretado como el del micelio.

#### 4.14. MORFOLOGIA COLONIAL DE LAS CLONAS SELECCIONADAS DE *Q. tenuissimum* EN DIFERENTES FUENTES DE CARBONO.

Una suspensión de esporas se sembró en cajas de Petri, con diferentes fuentes de carbono, (aproximadamente 20 esporas por placa). A los 28 días se hizo la lectura de la morfología colonial.

#### 4.15. CRECIMIENTO Y PRODUCCION DE ANTIBIOTICO EN DIFERENTES FUENTES DE CARBONO.

Se inocularon frascos Wheaton que contenían 150 ml de medio de diferentes carbohidratos, con 250,000 esporas. A la 5a. semana de incubación se colectaron todas las muestras, y se les determinó:

- a) Peso seco del micelio.
- b) Producción de antibiótico en el medio de cultivo y en el micelio.

Los resultados se graficaron como crecimiento (peso seco) en diferentes fuentes de carbono y rendimientos de antibiótico en los distintos carbohidratos.

## 5. RESULTADOS:

### 5.1. OBTENCION DE CEPAS PROVENIENTES DE UN SOLO CLON.

Con el fin de obtener cepas naturales productoras de antibiótico y evaluar su actividad y estabilidad de producción se aislaron colonias provenientes de un solo clon.

A partir de colonias seleccionadas al azar provenientes de la cepa contaminante aislada, se separaron esporas por micromanipulación, a las esporas que germinaron se les probó actividad antibiótica y se obtuvieron los siguientes resultados.

TABLA No. 6 CARACTERISTICAS DE GERMINACION Y PRODUCCION DE ANTIBIOTICO.

CLON	ESPORAS SE- PARADAS(No)	ESPORAS QUE GERMINARON	GERMINACION (%)	PRODUCCION DE ANTIBIOTICO
17	110	7	6.36	-
20	101	7	6.93	-
35	80	45	56.25	-
38	88	6	6.81	-
92	72	26	36.00	-
63	50	13	26.00	+

En la tabla 6 se observa que hay diferencias en la germinación de esporas dependiendo de la colonia de que provengan, así como también se observan diferencias en la producción de antibiótico. El único clon productor de antibiótico fué el 63. Con base en el diámetro de inhibición de las clones hijos se seleccionó a la 63-8. A este clon se le probó estabilidad de producción de antibiótico hasta la cuarta generación, encontrándose que fué estable en su producción en este tiempo (Tabla 7).

TABLA NO.7. ESTABILIDAD DE LA CEPA 63-8

GENERACION	No.ESPORAS PROBADAS	PRODUCTORAS ( % )
1a.	25	100
2a.	25	100
3a.	25	100
4a.	25	100

### 5.2. EVALUACION DE LA PRESENCIA DE UN PLASMIDO EN LA PRODUCCION DE ANTIBIOTICO.

Debido a que no todas las esporas aisladas por micromanipulación producen el antibiótico (Tabla 6), se decidió descartar la presencia de un plásmido involucrado en su producción. Por ello, se trató a la cepa 63-8 con drogas curantes, como el bromuro de etidio y la acriflavina, las

concentraciones utilizadas en este experimento se seleccionaron con base en su efecto en la viabilidad de esporas (Figs. 4 y 5). Los resultados obtenidos después del tratamiento se muestran en la tabla 8.

TABLA No.8. EFECTO DEL TRATAMIENTO CON BROMURO DE ETIDIO Y ACRIFLAVINA EN LA PRODUCCION DE ANTIBIOTICO (CEPA 63-8).

TRATAMIENTO	ESPORAS SE- PARADAS	MEDIDA DE LA COLONIA (cm)	HALO INHIBI- CION (cm)	% PRODUC- TORAS.
NINGUNO	20	1.1	5.16	100
EB (10 µg/ml)	20	1.04	5.07	100
EB (50 µg/ml)	20	0.86	4.06	100
ACRIFLAVINA (100 µg/ml)	20	1.06	5.44	100

Como se puede ver no hubo cambio en la producción de antibiótico después del tratamiento con las diferentes drogas, obteniéndose el 100% de productoras en las colonias aisladas (Tabla 8). Estos resultados indican que la producción de antibiótico no depende de un plásmido.

Por otro lado, para detectar la presencia de DNA extracromosomal se aisló ADN total en cepas que mostraron

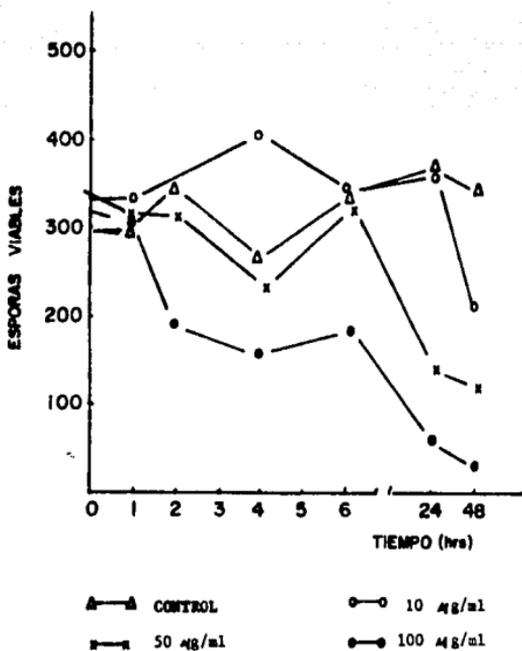


Fig. No. 4 Efecto de la concentración de bromuro de etidio en la viabilidad de *O. tenuissimus*. Se incubó una suspensión de esporas (10,000 células / ml) con diferentes concentraciones de bromuro de etidio en medio líquido de YPD(4).

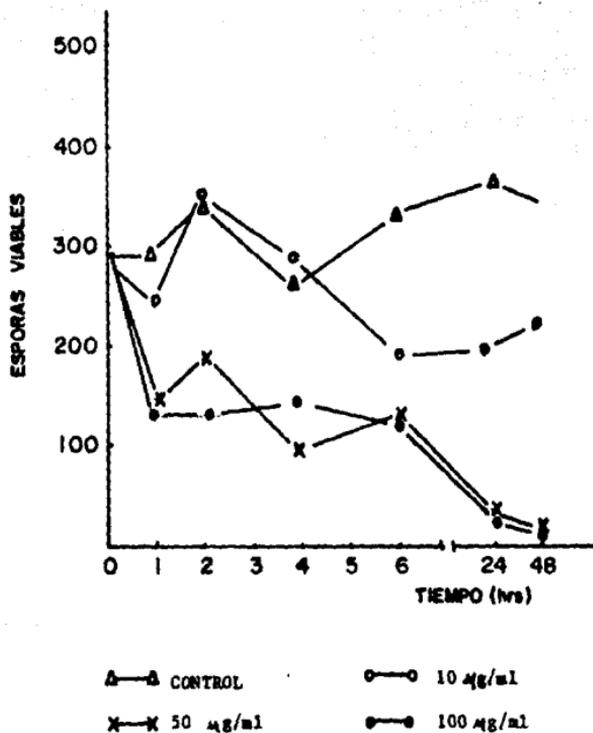


Fig. No. 5. Efecto de la concentración de acriflavina en la viabilidad de *O. tenuissimum*. Se incubó una suspensión de esporas (10,000 células/ml) con diferentes concentraciones de acriflavina en medio de YPD(4) a 25°C.

diferencias en la producción de antibiótico, cuando se determinó su actividad por el método de halo de inhibición. Las cepas utilizadas fueron la inicial, una pobre productora: 35-31, una buena productora: 63-8 y de mutante mejorada en la producción de antibiótico: UV-153 (su obtención se describe más adelante). El ADN se analizó por electroforesis en gel de agarosa. Los resultados se muestran en la fig. 6, donde se observa la ausencia de bandas que indiquen la existencia de un plásmido en alguna de las cepas. Solo se puede ver una banda que indica la presencia de ADN nuclear. Estos resultados concuerdan con los obtenidos después del tratamiento con bromuro de etidio y acriflavina.

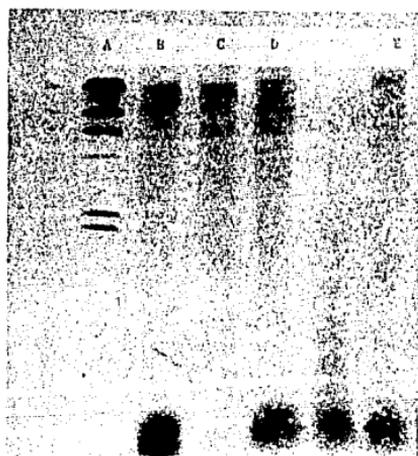


Fig. No. 6. ADN total de Oidiodendron tenuissimum. Los fragmentos se separaron por electroforesis en gel de agarosa al 0.8%. El ADN se visualizo en un transiluminador de luz UV de onda corta después de haberlo teñido con EB (0.5  $\mu$ g/ml). Se uso como control el fago  $\phi$ , que digerido con Hind III da fragmentos de 23.1, 9.4, 6.6, 4.4, 2.3 y 2.0 (44) A. Control. B. Cepa inicial. C. 63-8. D. Mutante UV-153 F. 35-31.

### 5.3. OBTENCION DE LA MUTANTE UV-153.

Para obtener una cepa mejor productora de antibiótico se mutagenizó la cepa 63-B por separado con agentes alquilantes y luz ultravioleta. Las dosis utilizadas de cada uno de los mutágenos fué la mínima en la que se observó un efecto marcado en la viabilidad (Figs. 8, 10) y el tiempo de mutagénesis que se utilizó es cuando se tiene el 1 y 10% de sobrevivencia de la población tratada. En las curvas de sobrevivencia (Figs. 7, 9 y 11) aparecen estos valores.

Por el método de halo de inhibición se evaluó la producción de antibiótico en cada una de las colonias aisladas, con los agentes EMS y NMG no se observó ningún mejoramiento. Sin embargo, con luz ultravioleta se obtuvieron varios clones que aparentemente mejoraban la producción. Se seleccionaron cuatro de ellos y se les determinó la estabilidad en la producción de antibiótico (Tabla 9).

Como se observa en la tabla 9, la cepa UV-153 excreta mayor cantidad de antibiótico que la cepa que la originó, (63-B), tomando en cuenta que la colonia era más pequeña. Por ello se decidió determinar la estabilidad de producción en esta mutante hasta la cuarta generación y se encontró estable en su producción.

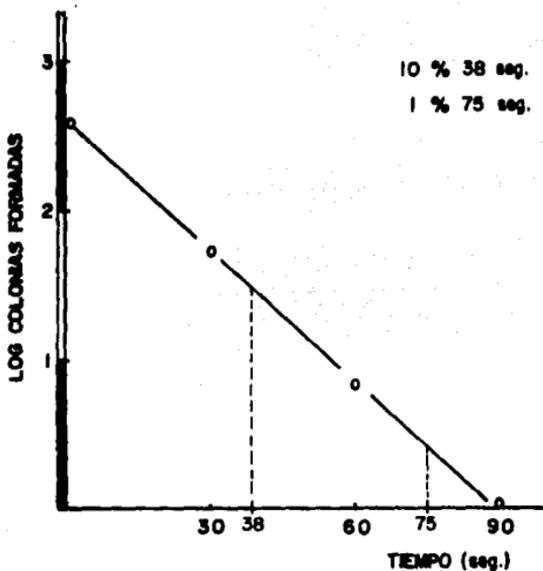


Fig. No. 7. Curva de sobrevida de la cepa 63-8 de Clidodendron tenuissimum con luz ultravioleta. Una suspensión de esporas - (10,000 células /ml) se sometió a irradiación con luz ultravioleta a 25°C. Se tomaron alícuotas a los 30, 60, 90 y 120 seg. El tiempo en que se tuvo el 1 y 10% de esporas viables respecto al control fué de 75 y 38 seg. respectivamente.

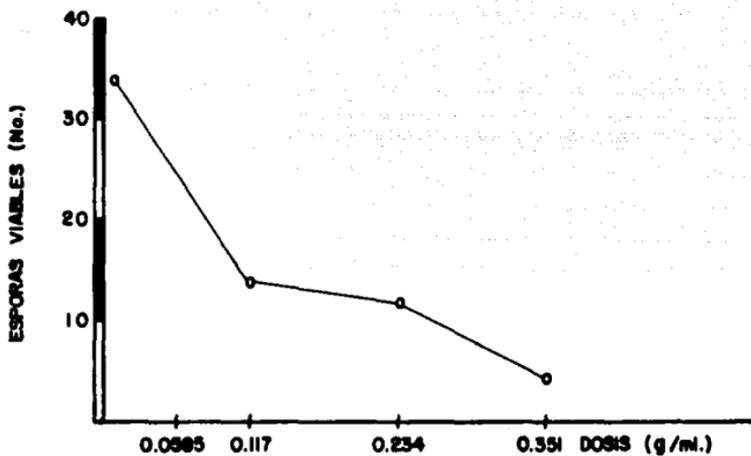


Fig. No. 8. Efecto de la concentración de EMS en la viabilidad de esporas de la cepa 63-8 de *O. tenuissimum*. Se incubaron esporas - (10,000 células / ml) con diferentes concentraciones de EMS durante 60 min a 25°C. Se seleccionó la concentración de 0.117 g/ml que es la mínima a la que se observó un efecto detectable en la viabilidad.

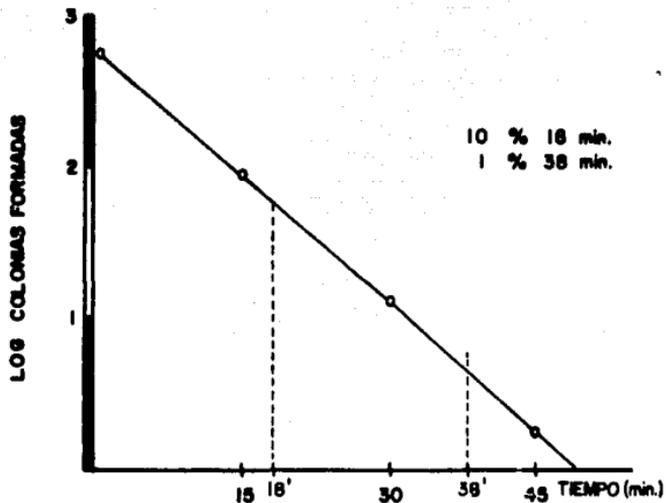


Fig. No. 9. Curva de sobrevivencia de la cepa 63-8 de *O. tenuissimum* con EMS. Se incubaron esporas (10,000 células/ml) con 100  $\mu$ l de EMS en medio de fosfatos 50 mM, pH 7 a 25°C. El tiempo en el que se tuvo el 1 y 10% de viabilidad fue a los 38 y 18 min respectivamente.

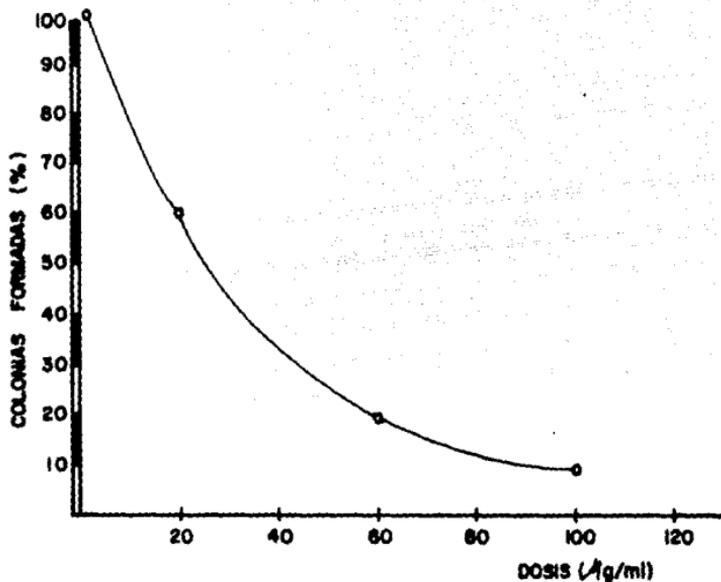


Fig. No. 10. Efecto de la concentración de NMC en la viabilidad de la cepa 63-8 de *O. tenuissimum*. Se incubaron esporas (10,000 células/ml) con concentraciones de 20, 40, 60, 80, 100 y 120 µg/ml en amortiguador de citrato-fosfato (0.2M-0.1M pH 7.7) durante 30 min a 25°C. La concentración que se eligió fué la de 100 µg/ml).

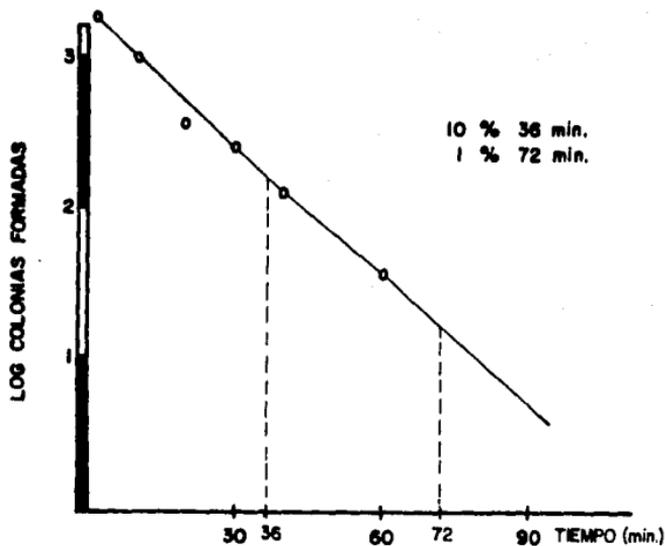


Fig. No. 11. Curva de sobrevida de la cepa 63-8 de *O.tenuissimum* con NMG. Se incubaron esporas (10,000 células / ml) con 5 ml de solución de NMG (100 µg/ml) en amortiguador de citrato-fosfato (0.2 M-0.1M pH 7.7) a 25°C en agitación. Los tiempos en los que se obtuvo el 1 y 10% de sobrevida fueron 72 y 36 min respectivamente.

**TABLA No.9 ESTABILIDAD DE PRODUCCION DE ANTIBIOTICO DE COLONIAS SELECCIONADAS DESPUES DE TRATAMIENTO CON LUZ ULTRAVIOLETA.**

<b>CEPA</b>	<b>ESPORAS PRO- BADAS (No)</b>	<b>DIAMETRO CO- NIA (cm) ( x )</b>	<b>HALO DE INHI- BICION (cm) ( x )</b>	<b>PRODUCTORAS ( % )</b>
<b>CONTROL 68-8</b>	20	1.13	7.03	100
<b>UV-49</b>	22	1.11	7.38	91
<b>UV-137</b>	20	1.03	5.08	100
<b>UV-153</b>	19	0.57	6.0	100
<b>UV-155</b>	21	0.99	7.26	100

#### 5.4. EVALUACION CUANTITATIVA DE LA PRODUCCION DE ANTIBIOTICO EN LAS DIFERENTES CEPAS OBTENIDAS.

Hasta aquí se había hecho el estudio preliminar de la producción de antibiótico en las colonias aisladas a partir de una sola espora por lo que fue necesario probar su actividad por el método de halo de inhibición, ahora que se contaba con cepas seleccionadas y con una mutante, se decidió determinar cuantitativamente la producción de antibiótico en medio de cultivo y en micelio en las cepas aisladas. En la fig. 12 se observa la genealogía de las cepas que se obtuvieron desde el inicio hasta la obtención de la cepa UV-153. Las cepas elegidas fueron las siguientes: la inicial, de la cual se partió, que tiene como características ser una mezcla de cepas que son muy heterogéneas en la producción de antibiótico (Tabla 6); una cepa considerada inicialmente no productora por el criterio del ensayo de halo de inhibición, la ( 35-31), una cepa productora estable, ( 63-8 ) y finalmente, una mutante estable productora de antibiótico, la UV-153.

El antibiótico se extrajo tanto de medio de cultivo como de micelio con cloroformo y después se cuantificó por el método de diluciones. En la tabla 10 se expresan los rendimientos de extracto crudo obtenidos por gramo de micelio en las diferentes cepas.

FIG. No.12 GENEALOGIA DE CEPAS PRODUCTORAS DE ANTIBIOTICO

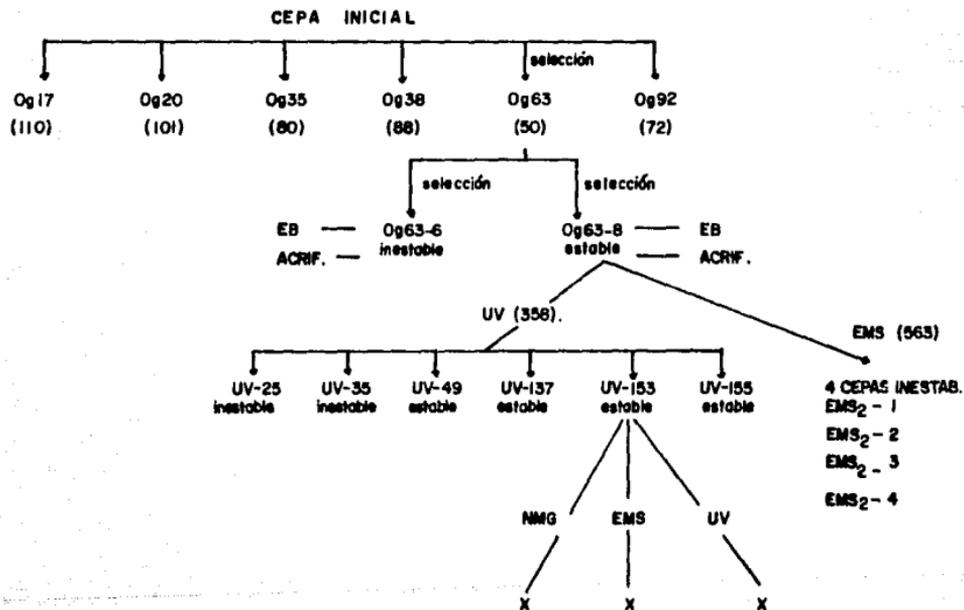


TABLA NO. 10. RENDIMIENTOS DE EXTRACTOS CRUDOS OBTENIDOS (PESO SECO).

CEPA	RENDIMIENTO E.C. (mg) EXCRETADO	RENDIMIENTO E.C. (mg) MICELIO	RENDIMIENTO TOTAL (mg)	MEDIO:MICELIO
INICIAL	21	38.6	59.6	1 : 1.83
63-8	20.8	41.6	62.4	1 : 2.00
Mutante UV-153	22.3	37.7	60	1 : 1.69
35-31	10	28.7	38.7	1 : 2.87

Los resultados reflejan que la cantidad de extracto crudo que se obtiene de micelio es mayor que el que se obtiene a partir del medio de cultivo en relación de 1:2, excepto para la cepa 35-31 que es de 1:3.

Los resultados de la cuantificación de antibiótico excretado al medio de cultivo se muestran en la tabla 11, lo que se puede ver es que el extracto crudo obtenido a partir de la mutante UV-153 tiene mayor actividad específica 3.45 U/mg, y la cantidad equivalente a una unidad es menor que para las otras cepas 0.29, así como las unidades totales es mayor en comparación con las otras (Fig. 13). Otra cosa que se puede ver es que la cepa 35-31 considerada no productora, realmente si produce antibiótico solo que en bajas cantidades, de tal forma que no se puede detectar por el bioensayo de halo de inhibición.

TABLA NO.11. DETERMINACION CUANTITATIVA DE ANTIBIOTICO EXCRETADO AL MEDIO DE CULTIVO.

CEPA	mg EXTRACTO CRUDO.	mg EXTRACTO CRUDO QUE INHIBEN EL 50% (1 UNIDAD)	UNIDADES/mg EX- TRACTO CRUDO Act.específica
INICIAL	21	0.47	2.13
63-8	20.8	0.44	2.27
Mutante UV-153	22.3	0.29	3.45
35-31	10.0	0.81	1.24

La diferencia de rendimientos totales se observa en la Fig. 13 donde se grafican las unidades totales de antibiótico excretado.

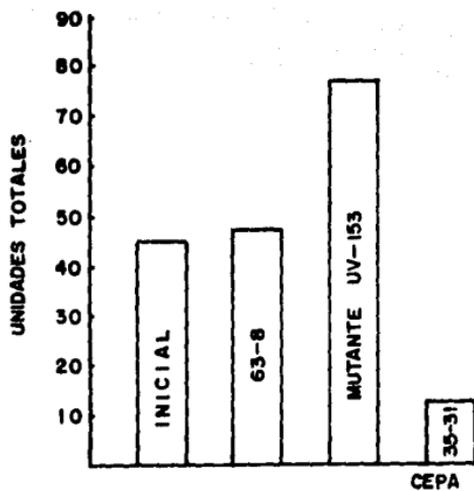


Fig. No. 13. Antibiótico excretado a medio de cultivo por diferentes cepas de *O. tenuissimum*. Las cepas se cultivaron en medio de YPD(4) durante 35 días a 25°C.

La producción de antibiótico que se cuantificó en micelio se muestra en la tabla 12 . Nuevamente el extracto obtenido a partir del micelio de la mutante tiene mayor actividad antibiótica que las otras cepas la actividad específica es de 22.42 U/mg de extracto. el equivalente a una unidad es de 0.03 mg. y las unidades totales de 1267 (Fig. 14). aquí como podemos ver la diferencia de actividad total es mucho más marcada que en medio de cultivo. tal pareciera que la mutante soporta grandes cantidades del metabolito secundario.

TABLA NO.12. DETERMINACION CUANTITATIVA DE ANTIBIOTICO EN MICELIO

CEPA	mg EXTRAC- TO CRUDO.	mg EXTRACTO CRUDO QUE INHIBEN EL 50% (1 UNIDAD)	UNIDADES/mg.EXTRACTO CRUDO. (Act.especifica)
INICIAL	38.6	0.182	5.49
63-8	41.6	0.162	6.17
Mutante UV-153	37.7	0.03	22.42
35-31	28.7	0.135	7.44

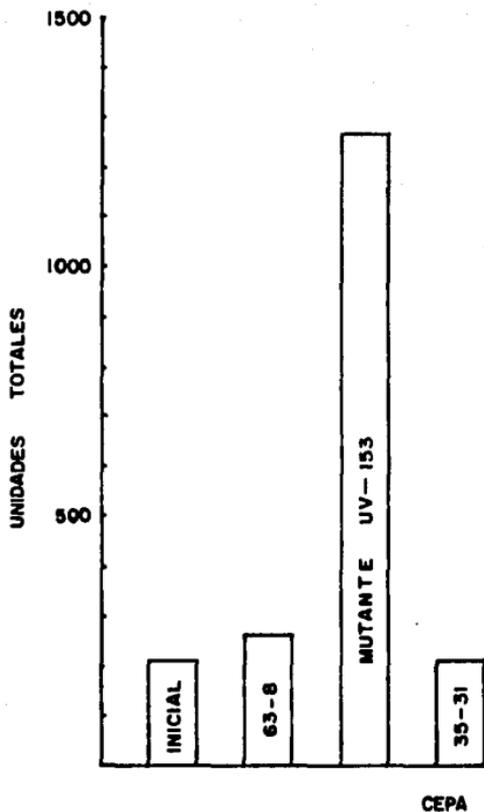


Fig. No. 14. Antibiótico extraído de diferentes cepas de *O. tenuissimum*. Las cepas se cultivaron en medio de YPD(4) por 35 días a 25°C.

En la tabla 13 se muestran los rendimientos totales sumando la producción en medio de cultivo y en micelio. Si tomamos como 100% la producción en unidades totales de la cepa 63-8 vemos que la producción de antibiótico en la mutante aumento con respecto a su progenitora 440%.

TABLA NO. 13. CUANTIFICACION EN UNIDADES TOTALES DE ANTIBIOTICO.

CEPA	PESO DE MICELIO	U. MEDIO	U.MICELIO	U.TOTALES
INICIAL	1.127	44.68	212.08	256.7
63-8	1.154	47.27	258.00	305.27
Mutante UV-153	1.022	76.90	1267.80	1344.70
35-31	1.038	12.35	212.60	224.95

5.5. EVALUACION DE CARACTERISTICAS DE CRECIMIENTO Y PRODUCCION DE ANTIBIOTICO CON EL TIEMPO.

Como ya se describió anteriormente, la cepa UV-153, se obtuvo por mutagénesis de la cepa 63-8 con luz ultravioleta. Las características de ambas cepas se muestran en la Tabla 14. Existen diferencias entre la mutante y su progenitora, entre estas encontramos el color la mutante, es café mas clara que la 63-8, otra es la excreción de pigmento que se observa en cultivos líquidos y que se detecta por un oscurecimiento del

TABLA NO.14. CARACTERISTICAS DE LAS CEPAS 63-8 y UV-153.

CARACTERISTICA	CEPA 63-8	MUTANTE UV-153
COLOR	CAFE	CAFE ALMENDRA
PRODUCCION PIG- MENTO.	+	-
ESPORULACION*	100 %	8-12 %
GERMINACION	20 %	20 %
ESPORAS PRODUCTORAS DE ANTIBIOTICO	100 %	100 %

\* Con base en la cepa 63-8.

medio, es prácticamente nula para la cepa UV-153. Esto tiene como ventaja que en el proceso de purificación del antibiótico, sea más eficiente y se aumente con ello la actividad específica del extracto crudo, ya que se obtiene como un líquido café muy oscuro, debido a la presencia de pigmentos. Por otro lado, el porcentaje de esporulación es menor en la mutante que en la cepa 63-8 y la germinación y estabilidad de producción de antibiótico es igual.

#### 5.5.1. CURVAS DE CRECIMIENTO

Debido a que el crecimiento de la mutante se observaba más lento se decidió evaluar su comportamiento. Para ello se elaboraron curvas de crecimiento a través del tiempo (Fig. 15), ambas curvas tienen el mismo comportamiento, sólo el tiempo en el que se alcanza la idiofase para la cepa 63-8 es en la cuarta semana, mientras que para la cepa mutante UV-153 esta fase es alrededor de la 5a. semana.

#### 5.5.2. CURVAS DE pH

Una cosa interesante que se determinó fué el pH del medio a través del tiempo (Fig. 16). Lo que se puede ver es que hay una marcada diferencia de comportamiento de la curva de pH entre ambas cepas. Esto puede ser debido a que la mutante por su misma condición cambia su metabolismo en referencia a su progenitora y alguno de los metabolitos excretados acidifican el medio. Por otro lado, el tiempo en que se tienen los cambios de

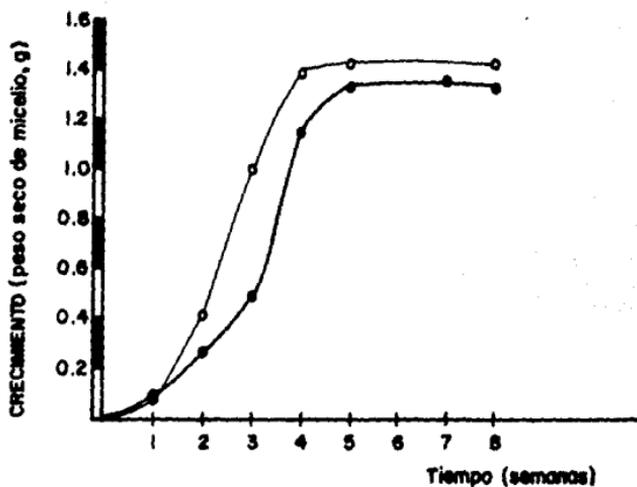


Fig. No 15. Curvas de crecimiento de cepas de *O. tenuissimus*. Las cepas 63-8 y UV-153 se crecieron en medio de YPD(4) a - 25°C. Cada semana se colectaron tres muestras y se determino el peso seco del micelio. La idiofase se alcanza a la cuarta semana para la cepa 63-8 ●—● y a la quinta para la UV-153 ○—○.

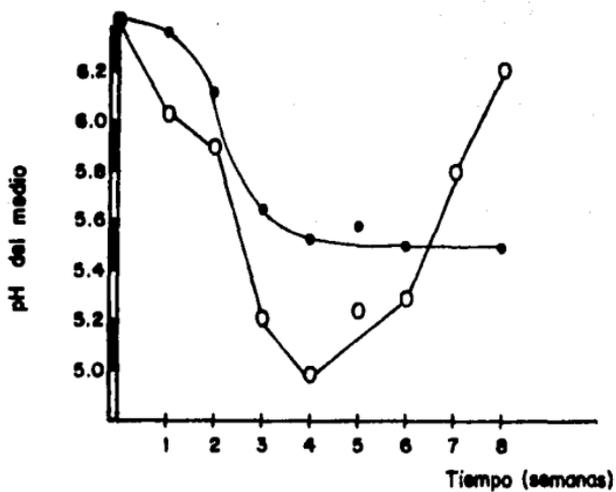


Fig. No. 16: Efecto del crecimiento en el pH del medio de cultivo. Las cepas 63-8 y la UV-153 se cultivaron en medio de YPD(4) a 25°C. Cada semana se colectaron tres muestras y se determinó el pH del medio de cultivo. Ceba 63-8 ○—○, Ceba UV-153 ●—●.

pendientes de las curvas de pH coinciden con el inicio de la idiofase del crecimiento del hongo, observándose este cambio para la cepa 63-8 a la cuarta semana y para la UV-153 a la quinta semana.

### 5.5.3. CURVAS DE CINÉTICAS DE PRODUCCIÓN DE ANTIBIÓTICO.

Se decidió valorar la producción de antibiótico para determinar si había relación con alguna fase del crecimiento. En la fig. 17. se muestra la producción de antibiótico en medio de cultivo y en micelio de la cepa 63-8 y en la fig. 18 la producción en la cepa UV-153. En ambas cepas se observó que la fase de producción constante de antibiótico se alcanza con anterioridad en micelio que en medio de cultivo. El tiempo en que la excreción de antibiótico al medio de cultivo es máxima y constante coincide para las dos cepas con el inicio de la fase de idiofase del crecimiento, esto como vimos anteriormente también coincide con el cambio del pH del medio, a la cuarta semana para la 63-8 y a la quinta para la UV-153, no así para micelio que aproximadamente a la tercera semana, ya casi se alcanzó la fase estacionaria de producción de antibiótico, esto podría indicar que después que se alcanzan ciertos niveles de concentración de antibiótico, se excretan en una mayor cantidad a medio ó bien van relacionados con el crecimiento, una vez que deja de crecer el hongo se excreta en mayor cantidad al medio de cultivo y entonces se mantiene constante la producción.

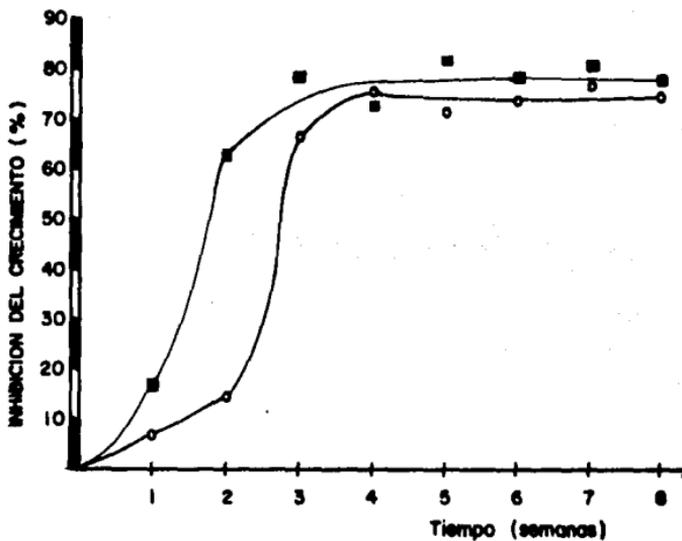


Fig. No. 17. Producción de antibiótico a través de tiempo de la cepa 63-8, cultivada en medio de YPD(4) a 4°C. Cada semana se colectaron tres muestra y se determinó el porcentaje de inhibición de *S. cerevisiae* con los extractos de medio de cultivo y micelio. Inhibición por extractos de medio de cultivo ○—○. Inhibición por extractos de micelio ■—■.

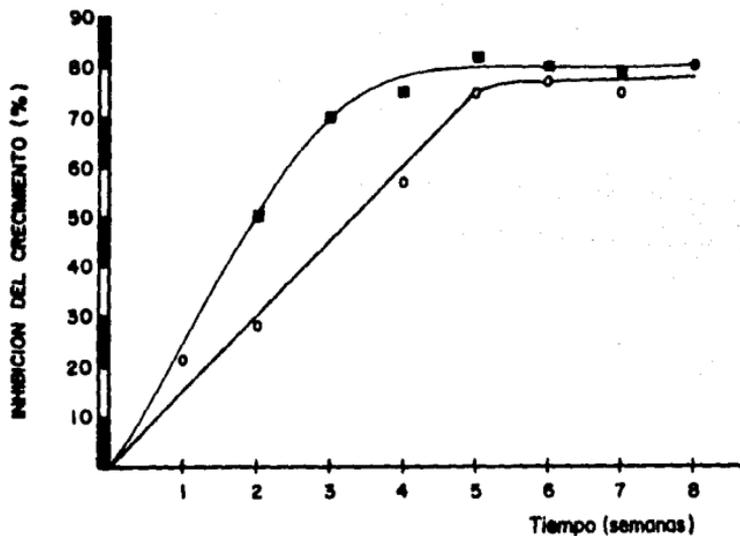


Fig. No. 18. Producción de antibiótico a través del tiempo de la cepa UV-153, que se cultivó en medio de YPD(4), a 25°C. Cada semana se tomaron tres muestras y se determinó el porcentaje de inhibición del crecimiento de *S. cerevisiae* con los extractos de medio de cultivo y de micelio. Inhibición por extractos de medio de cultivo ○—○, Inhibición por extractos crudos de micelio ■—■.

#### 5.6. MORFOLOGIA COLONIAL DE LAS CEPAS SELECCIONADAS DE *Q. tenuissimum* EN DIFERENTES FUENTES DE CARBONO.

Para ver si el crecimiento y la producción de antibiótico pudieran favorecerse con otra fuente de carbono diferente a la glucosa, se utilizaron diferentes fuentes de carbono como nutriente del hongo. Se creció al hongo el medio complejo sólido con diferentes fuentes de carbono, esto permitió ver si las utiliza y cual es la morfología colonial de cada cepa en cada una de ellas. El hongo creció en todas las fuentes utilizadas. Las características morfológicas de la cepa 63-8 y la UV-153 se muestran en las fotografías de la fig. 19, aparece el hongo en las fuentes de carbono donde tuvo mejor crecimiento. Existe un gran cambio de morfología dependiendo de la fuente de carbono que se utilice y de una cepa a otra.

#### 5.7. CRECIMIENTO Y PRODUCCION DE ANTIBIOTICO DE LAS CEPAS DE *Q. tenuissimum* SELECCIONADAS.

Para determinar el crecimiento y la producción de antibiótico del hongo en diferentes fuentes de carbono, el hongo se creció en medio líquido.

El crecimiento de *Q. tenuissimum* expresado en g en las diferentes fuentes de carbono se muestra en la tabla 15. Aquí a diferencia de medio sólido, el hongo no creció en todas las fuentes de carbono utilizadas. Las cepas 63-8 y UV-153 no utilizan el acetato de sodio, el citrato, la lactosa, y almidón.



A



B



C

Fig. No. 19. Morfología colonial de O. tenuissimum. A la izquierda aparecen las fotografías de la cepa 63-8 y a la derecha las de la mutante UV-153. A. glicerol, B. xilosa, C. fructosa, D. galactosa, E. glucosa F. maltosa, G. sacarosa, Fotografías de M. Ulloa.



D



E



F



Utilizan bien la fructosa, la glucosa, y la maltosa, en general, se observa un crecimiento menor en la cepa UV-153 que en la 63-8 en estas fuentes de carbono. La cepa 63-8 crece mejor que la UV-153 en glicerol, sacarosa y galactosa y la UV-153 tiene un mejor crecimiento en xilosa que su progenitora.

TABLA NO.15 CRECIMIENTO DEL HONGO EN DIFERENTES FUENTES DE CARBONO.

	CRECIMIENTO 63-8		CRECIMIENTO UV-153	
	(g)	%	(g)	%
Acetato de sodio	0.057	4.6	0.03	2.2
Glicerol	0.629	50.4	0.274	20.1
Xilosa	0.530	42.5	1.152	84.7
Citrato	0.014	1.1	0.012	0.9
Fructosa	1.264	101.3	1.137	83.6
Galactosa	1.34	107.4	0.673	49.5
Glucosa	1.248	100	1.36	100
Lactosa	0.079	6.3	0.055	4.05
Maltosa	1.099	88.1	0.964	70.9
Sacarosa	1.354	108.5	0.494	36.3
Almidón	0.053	4.2	0.053	3.9

El crecimiento se expresa en g de peso seco de micelio y en porcentaje. Se toma como 100% el crecimiento en glucosa.

### 5.7.1. PRODUCCION DE ANTIBIOTICO EN DIFERENTES FUENTES DE CARBONO.

Para la cepa 63-8, la producción de antibiótico en medio de cultivo se muestra en la fig 20. La mejor producción de antibiótico se obtiene cuando se tiene como sustrato la glucosa y la sacarosa , siendo menor la producción con fructosa galactosa y maltosa. En xilosa no se encontró actividad y en glicerol solo se detecta muy poca en medio de cultivo.

Para la mutante la mayor producción se obtuvo con galactosa, glucosa y fructosa en ese orden y menor en maltosa. Algo interesante es que a pesar de tener buen crecimiento en xilosa (Tabla 15), no se tuvo producción de antibiótico en esta fuente de carbono (Fig. 21). Una gran diferencia entre estas dos cepas es que mientras que la 63-8 es capaz de crecer perfectamente en sacarosa y producir una cantidad considerablemente semejante de antibiótico a el obtenido en glucosa, la mutante no utiliza muy bien este disacárido y la actividad antibiótica obtenida es practicamente nula.

Para las dos cepas la producción de antibiótico siempre es mayor en el extracto crudo obtenido a partir de micelio, en medio complejo con glucosa para la 63-8, y en medio complejo con galactosa para la mutante UV-153, crecidas a 25°C durante 35 días.

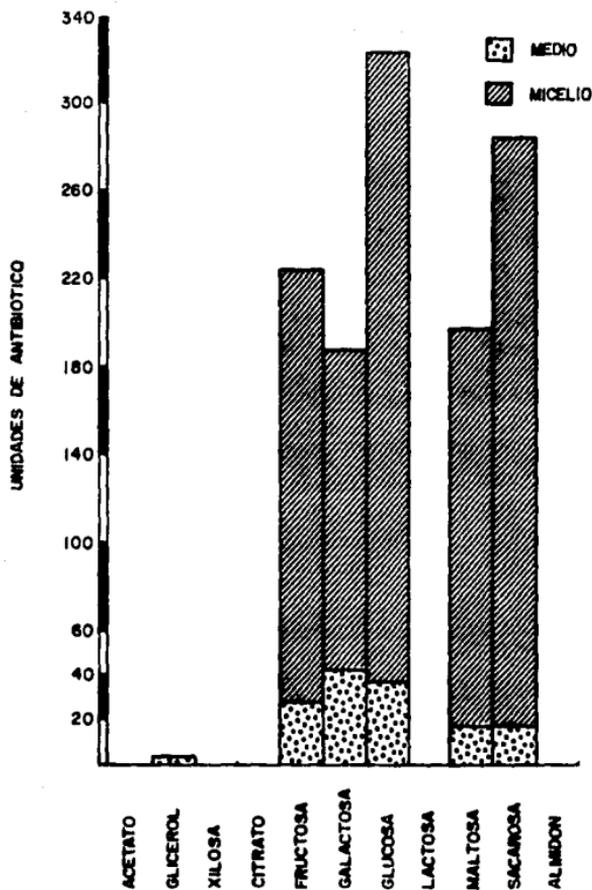


Fig. No. 20. Producción de antibiótico en diferentes fuentes de carbono utilizando la cepa 63-8. La cepa se crece en medio complejo con diferentes fuentes de carbono durante 35 días a 25°C. Se determinaron las unidades de antibiótico extraídas de medio de cultivo y de micelio.

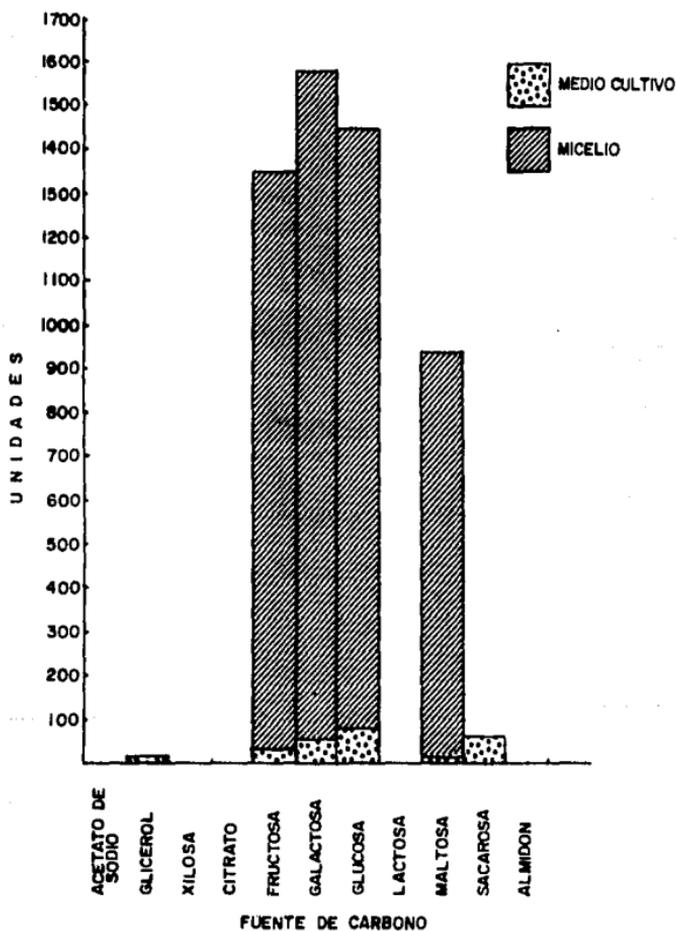


Fig. No. 21. Producción de antibiótico en diferentes fuentes de carbono utilizando la cepa UV-153. La cepa se creció en medio - complejo con diferente fuente de carbono durante 35 días a 4°C.

## 6. DISCUSION:

La importancia del aislamiento de nuevos antibióticos radica en que a pesar de que existe un gran número de éstos, se presentan con muchos de ellos reacciones no deseadas. Las reacciones adversas producidas por agentes antiinfecciosos incluyen resistencia de el microorganismo a las drogas, reacciones de hipersensibilidad y de sobreinfección. La resistencia de los microorganismos a los antibióticos es uno de los problemas mas graves que hacen necesaria la utilización de nuevos antibióticos. Los antibióticos causan también reacciones exclusivas debidas a alteraciones de la flora microbiana del huésped. Todos los individuos que reciben dosis terapéuticas de estos agentes sufren alteraciones de la población microbiana normal de tracto intestinal, respiratorio superior y genitorurinario; algunos presentan sobreinfección que es la presencia de una nueva infección durante la quimioterapia de una infección primaria. Es relativamente común y potencialmente muy peligroso porque los microorganismos responsables de la nueva enfermedad son en muchos casos enterobacterias, *Pseudomonas* y *Candida* u otros hongos que pueden ser muy difíciles de eliminar con las drogas conocidas actualmente. Cuanto más "amplio" es el efecto de un antibiótico sobre los microorganismos mayor es la alteración en la microflora normal y mayor la posibilidad de que un solo microorganismo se haga predominante, invada al huésped y produzca infección. En esta forma, la frecuencia de

sobreinfección es mínima con penicilina G, mayor con tetraciclinas y con cloranfenicol y máxima con combinaciones de antibióticos de amplio espectro y las cefalosporinas de tercera generación de espectro expandido. Será importante desarrollar agentes que destruyan selectivamente los patógenos y preserven al mismo tiempo la flora normal (1).

Por otro lado, la utilidad de los antibióticos se ha extendido a otras áreas de aplicación, como son la nutrición animal, la preservación de alimentos y a la investigación básica (4).

Por lo expuesto anteriormente se hace necesaria la investigación de nuevos antibióticos. En el presente trabajo se estudio un antibiótico que tiene actividad específica contra hongos filamentosos, principalmente dermatófitos y levaduriformes. Este antibiótico es producido por el hongo *Didymosporium tenuissimum* y se presume que se trate de un nuevo antibiótico ya que cuando se hizo una revisión exhaustiva de la bibliografía no se halló ningún trabajo que reportara la producción de antibiótico por esta especie, y en los trabajos hallados para este género pero de especies diferentes, el espectro de actividad no coincide con el encontrado para este antibiótico.

Una parte importante del proyecto lo constituye la purificación e identificación del metabolito. En esta parte se encontraron serias dificultades, la primera de ellas fué el tiempo de crecimiento que es de 28 días (Fig. 15) y el bajo rendimiento de antibiótico que es de 60 mg de extracto

crudo por gramo de peso seco de micelio (Tabla 10).

Al comenzar este trabajo debido al bajo rendimiento en la producción se planteó la posibilidad de obtener cepas sobreproductoras. Se decidió utilizar cultivos provenientes de una sola espora para que no existiera marcada variedad genética de las cepas seleccionadas, ya que si los aislados son derivados de una hifa multicelular u otra forma multicelular se reduce la probabilidad de obtener homogeneidad genética (45-46).

Se probaron 501 conidias individuales que se aislaron por micromanipulación. Al evaluar el potencial genético de producción de antibiótico en cada colonia individual, los resultados (Tabla 6) nos indicaron diferencias en su producción; esto nos sugería dos cosas: la primera es que parte de la información genética de producción de antibiótico no se encontraba en todas las colonias aisladas y que esta pudiera hallarse extracromosomalmente en forma de plásmido (cepa 63) y que las otras cepas que no tenían actividad antibiótica (cepas de *Q. tenuissimum* 17, 20, 35, 38, 92) no tuvieran esta información; la segunda opción era que existiera una variabilidad en la producción de antibiótico que ya ha sido reportada en otros casos (8). La opción de la existencia de un plásmido se veía apoyada además por la existencia de reportes de la participación de material extracromosomal en la producción de antibióticos en bacterias. Kirby (1975) reportó la capacidad para producir metilnomicina y ser resistente a ella en *Streptomyces coelicolor* en el plásmido SCP1 (18-19). Evidencias de participación de un plásmido en la vía biosintética de cloranfenicol en *S. venezuelae*

se obtuvieron después del tratamiento con anaranjado de acridina ya que se aislaron cepas no productoras de el antimicrobiano, se propone que el plásmido lleva información regulatoria de la vía biosintética del cloranfenicol a nivel de la enzima arilamino sintetasa (20). Kähler (1974) encontro que una cepa *S. bigrescens* productora de turimicina perdía esta capacidad después del tratamiento con anaranjado de acridina o bromuro de etidio, además reportó diferentes perfiles de ADN en gradientes de centrifugación entre cepas productoras y no productoras (10). Okanishi (1970), reportó también pérdida de producción de kasugamicina y aureotricina en *Streptomyces kasugaensis* después del tratamiento con anaranjado de acridina o con temperatura elevada y reportó diferencias en el ADN entre la cepa silvestre y las no productoras (22). Finalmente Boronina (1972) reportó cepas de *S. rimosus* productoras de oxitetraciclina sensibles al antibiótico en alta frecuencia después del tratamiento con anaranjado de acridina (10).

Los resultados que se obtuvieron después del tratamiento con acriflavina ó bromuro de etidio de la cepa 63-8 (Tabla 8), nos indican que no se pierde la actividad antibiótica con ninguna de las drogas. Esto, aunado a la ausencia de diferencias en el corrimiento electroforético del ADN en geles de agarosa entre las cepas con diferente producción de antibiótico (Fig. 6), indican que la información para la producción del antibiótico se encuentra codificada en el ADN nuclear sin la posible participación de un plásmido.

El que la información para la producción del

antibiótico estuviera codificada en el ADN nuclear hacia más difícil el intentar la introducción de técnicas de ADN recombinante como se pensó hacerlo inicialmente para el mejoramiento de la producción del antibiótico. Por ello se utilizó la técnica de mutación y selección. Respecto a esto Pontecorvo (1974) menciona "virtualmente todas las cepas mejoradas de hongos industriales se obtuvieron por fuerza bruta (mutagénesis), análisis y selección, este proceso ha sido lento laborioso y costoso para obtener el éxito -cepas con un alto rendimiento- sin hacer inversión en la genética básica de las especies productoras" (47). Tras varios ensayos de mutagénesis con diferentes mutagenos, se logró obtener una cepa que por bioensayo presentaba una mayor actividad antibiótica, la UV-153.

En la fig. 12 se muestra la genealogía de las cepas aisladas partiendo de la cepa aislada a partir de una contaminación hasta llegar a la mutante UV-153.

La cantidad total de extracto crudo expresado en mg. que se obtuvo del medio de cultivo y de micelio es semejante para las cepas inicial, 63-8 y UV-153 y, menor para la 35-31 a su vez la relación de extracto crudo del medio de cultivo:micelio es aproximadamente de 1:2, excepto para la cepa 35-31 que es de 1:3 (Tabla 10). La mutante UV-153 presentó mayor actividad tanto en el extracto crudo obtenido de medio de cultivo como en micelio (Figs. 13-14) y un aumento de las unidades totales producidas por la cepa UV-153 del 524, 440 y 598 % con respecto a las cepas inicial, 63-8 y 35-31 respectivamente. Un hecho interesante es que la mayor parte del antibiótico por

alguna razón se está acumulando dentro del micelio y es poco lo que se excreta al medio (Tabla 11-13). Esto también se ha reportado para otras cepas que acumulan antibiótico dentro de micelio, tal es el caso de *Penicillium griseofulvum* Dierckx, C.M.I. 75832 que produce griseofulvina, que es una droga practicamente insoluble en agua, esta fue aislada de micelio por Oxford (1939). El rendimiento fué aproximadamente el doble obtenido por extracción del micelio que de filtrados de medio de cultivo. Posteriormente se reconoció como producto metabólico de muchas especies de *Penicillium* (48). También existen reportes de la extracción de antibióticos terpénicos de micelio por solventes orgánicos, tal es el caso de la grifolina obtenida del hongo *Grifolia confluens*, el antibiótico se obtuvo con un 2% de las esporas por extracción con etanol al 95%, cromatografía en alúmina y recristalización en éter de petróleo. Otro caso es el de la iluina S que se aisló de cultivos del basidiomiceto *Clitocybe illudens*. El antibiótico se extrajo del hongo con metanol (49). Por otra parte, Demain (1957), estudió la distribución de la penicilina N en el micelio y en el fluido extracelular en *Penicillium chrysogenum* y por ensayo biológico determinó que muy poca cantidad de penicilina N esta presente en micelio (50). Esto mismo reportó Smith (1967) para la cefalosporina C en *Cephalosporium sp* (51). Al revisar su polaridad observamos que tanto la penicilina N como la cefalosporina C son polares y como consecuencia son solubles en agua. Esto nos lleva a pensar que el antibiótico en estudio tiene una polaridad semejante a la griseofulvina y antibióticos

terpenos, del tal forma que al no ser muy soluble en agua se acumula en el micelio y para obtenerlo se extrae con un solvente de polaridad media como es el cloroformo.

Respecto a esto Turner (1971), comenta: en cultivos acuosos los metabolitos secundarios se acumulan en medio de cultivos y en micelio. La distribución entre el medio de cultivo y el micelio puede a menudo correlacionar con su solubilidad en agua; esta aparente correlación pudiera ser resultado también del transporte a través de la membrana (52).

Podríamos preguntarnos también ¿cómo es que tolera un microorganismos concentraciones tan elevadas de antibiótico? Nolan (1986), dice que los organismos sobreproductores son resistentes a los efectos de sus propios productos y están frecuentemente caracterizados porque tienen modificados sus receptores al metabolito sobreproducido; sin embargo, no da una respuesta clara a esto.

Turner (1971), enlista una serie metabolitos secundarios, ellos se sintetizan a partir de solamente unos pocos precursores que se derivan del metabolismo primario en un número limitado de puntos. La acetil-CoA es el precursor más importante en el metabolismo secundario de hongos, a partir de ella se derivan las vías que llevan a la biosíntesis de policétidos, terpenos, esteroides y metabolitos secundarios derivados de ácidos grasos. Esto nos lleva a proponer que la síntesis del antibiótico, de acuerdo a la poca solubilidad del antibiótico en agua se deriva a partir de la acetil-CoA que es la que finalmente nos lleva a la síntesis de los antibióticos

policétidos y terpenos fig. 22 (52).

Otra pregunta que surge es ¿Por qué se aumentó tantas veces la producción en la mutante UV-1537. En los últimos años se ha reportado que varios antibióticos inhiben su propia biosíntesis. Esta regulación de las vías de metabolitos secundarios es similar a el metabolismo primario (10). Un ejemplo de mecanismo de retroalimentación es la represión de la arilaminosintetasa por el cloranfenicol que se reprime totalmente cuando la concentración del antibiótico es de 100 mg/l (54). La regulación por producto final del ácido micofenólico en *Penicillium colonifen* involucra regulación del la S-adenosilmetionina:ácido dimetilmicofenólico o-metil transferasa, que es una enzima que cataliza el paso final de la sintetasa del ácido micofenólico. La actividad de esta enzima se inhibe en un 68% con 25 mM de ácido micofenólico (55).

Martín (1978) afirma que existen mutantes alteradas en sus mecanismos de retroalimentación, que llevan a la sobreproducción de un metabolito requerido (56).

Goulden (1969) mostró que la inhibición de retroalimentación de la sintetasa del ácido hidroxiacético por la valina se encuentra alterado en una mutante mejorada de *Penicillium chrysogenum* en la biosíntesis de la penicilina (57).

Luengo (1979) demuestra el efecto inhibitorio de la lisina en la biosíntesis de la penicilina en *P. chrysogenum* en una cepa de baja producción (Wis 54-1255) y en una de alta producción (ASP-78). La lisina inhibe la sintetasa de homocitrato

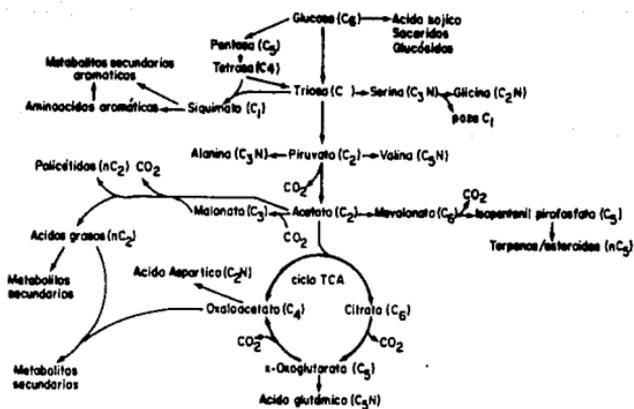


Fig. No. 22. Formación de metabolitos secundarios a partir de intermediarios del metabolismo primario. (52)

es la primera enzima de la biosíntesis de la lisina y de la penicilina. En la cepa de alto rendimiento se inició la síntesis de penicilina en altas concentraciones de lisina (50 mM), inhibiéndose después de cierto tiempo. En la cepa de baja producción no se inició la biosíntesis de penicilina a tales concentraciones de lisina (31-32).

La sintetasa del p-aminobenzoico es una enzima que cataliza la conversión del ácido corísmico en ácido p-aminobenzoico, precursor de la p-aminoacetofenona que a su vez es un intermediario del antibiótico polieno candidicina. Gil (1985), al estudiar la actividad de la sintetasa del ácido p-aminobenzoico de Streptomyces griseus no encontró niveles detectables de la enzima en mutantes no productoras obtenidas por mutagénesis con luz ultravioleta. La literatura cita más casos de mutantes sobreproductoras afectadas en sus mecanismos regulatorios (33).

En la mutante UV-153, no podemos saber a qué nivel se encuentra la mutación que hace que se incremente la producción, pero obviamente ésta pudo afectar cualquier enzima que participe en la producción del metabolito, en especial las enzimas regulatorias de la vía biosintética.

Efectos secundarios de la mutagénesis fueron: diferencias de color, producción de pigmento, esporulación y germinación entre la mutante UV-153 y su progenitora (cepa 63-8), tabla 14. Aunque se ha reportado que existe relación entre el color de la colonia, y la esporulación con la producción de antibióticos (8,58,59). En nuestro caso la mutante UV-153, que es

sobreproductora del antibiótico, esporula menos, es menos oscura y la producción de pigmento excretado a medio es menor, que en la 63-8.

La velocidad de crecimiento es diferente alcanzándose la idiofase a los 35 días para la cepa UV-153 y a los 28 para la 63-8 (Fig. 18). El cambio de pH del medio es consecuencia del mismo crecimiento, esto lo podemos inferir si observamos las curvas de crecimiento y de pH, un cambio en el crecimiento trae consigo un cambio en el pH del medio (Figs. 15-16).

En cuanto a la detección de antibiótico en el medio de cultivo y micelio (Figs. 17-18), la producción de antibiótico comienza desde el inicio del crecimiento. Esto difiere de lo reportado para otros antibióticos que empiezan a producirse cuando el crecimiento micelial se vuelve más lento ó termina y entonces las vías de metabolismo secundario comienzan a operar (8). Sin embargo, Calam (1986), describe dos tipos de comportamiento para la producción de antibiótico (Fig. 23). La curva P1 muestra que la producción de antibiótico comienza con el ciclo de crecimiento, lo que también es apoyado por los datos de Martín y Demain (1980), y la curva P2 ilustra el comportamiento clásico ya mencionado, pues la producción empieza cuando el crecimiento termina (60-61). Reportes de la biosíntesis de ácido micofenólico en las fases iniciales del crecimiento inicial inmediatamente después de la germinación de las esporas en *Penicillium brevicompactum* son presentados por Detroy (1973), la producción de ergosterol que se considera un metabolito primario, comienza seis horas después de la aparición del ácido

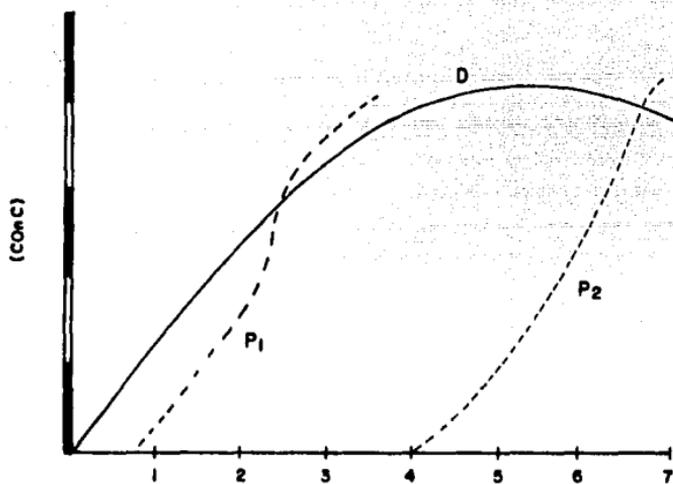


Fig. No. 23. Crecimiento típico y curvas de producción (conc) (D=peso seco : P1, P2 = Producción). (60).

micofendíco (8).

En nuestro trabajo la curva de producción de antibiótico corresponde a un comportamiento del tipo de la curva P1, en donde la producción de antibiótico se inicia con el crecimiento del hongo. En ambas cepas la fase en que se mantiene constante la producción de antibiótico se alcanza más rápidamente en micelio (3a y 4a. semana) que en medio de cultivo (4a. y 5a. semana).

Debido a que sabemos que la naturaleza del sustrato determina el rendimiento celular y la de sus productos, se valoró la morfología colonial, el crecimiento, y la producción de antibiótico de Oidiodendron tenuissimum en diferentes fuentes de carbono.

La morfología colonial de las cepas 63-8 y la UV-153 en diferentes fuentes de carbono cambia dependiendo del carbohidrato que se utilice (Fig. 19). Las principales diferencias que se tienen son en la forma, color y el tamaño. También se observan diferencias morfológicas entre la cepa 63-8 y su mutante UV-153, cuando se crecen en una misma fuente de carbono. Esto nos muestra que en el crecimiento del microorganismo hay una interacción entre las características del microorganismo y las condiciones medio ambientales en que se crece.

El crecimiento de Oidiodendron tenuissimum expresado en porcentaje, tomando como 100% el crecimiento en glucosa, se muestra en la tabla 15. La cepa 63-8 tiene un mejor crecimiento en los monosacáridos fructosa, galactosa y glucosa en los

disacáridos maltosa, y sacarosa, utiliza poco el glicerol, la xilosa y no crece en acetato de sodio, citrato, lactosa y almidón. La cepa UV-153 al igual que la cepa 63-8 muestra buen crecimiento en glucosa, aunque crece menos que la 63-8 utiliza bien la fructosa, la galactosa, la maltosa, la sacarosa y el glicerol. La xilosa la utiliza mejor que la 63-8 y al igual que ella no crece en acetato de sodio, citrato, lactosa y almidón. Estos resultados coinciden con los reportados por Dickinson, quien trabajó con una cepa de *Oidiodendron griseum*; éste, al igual que nuestro hongo utiliza fructosa, glucosa, galactosa, sacarosa y maltosa, no utiliza citrato y, a diferencia de nuestros resultados, reporta la utilización del almidón por esta especie (62). En la fig. 24 se muestran las vías metabólicas donde entrarían como sustrato las fuentes de carbono utilizadas.

En cuanto a la producción de antibiótico se ve claramente que en los monosacáridos y disacáridos utilizados por las cepas 63-8 y UV-153 hay producción de antibiótico, excepto en xilosa donde a pesar de haber buen crecimiento (Tabla 15) no hay producción de antibiótico. El hecho de que con la pentosa xilosa el hongo haya crecido y no produzca antibiótico, podría sugerir que sólo con fuentes de carbono que intervienen directamente en la vía de la glucólisis hay producción de antibiótico (Fig. 24).

Para terminar con la discusión, quisiera comentar el significado de sobreproducción ó producción excesiva de un metabolito. Respecto a esto Calam propone que si se asume que la

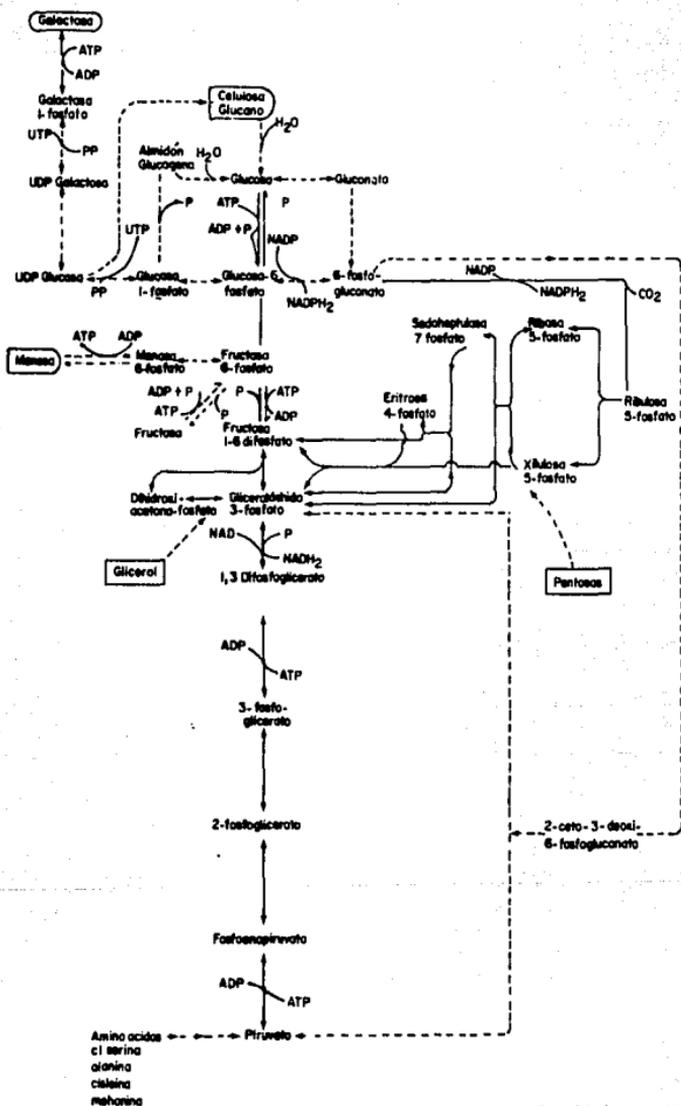


Fig. No. 24. Diagrama de glucolisis y reacciones asociadas. (27).

producción es baja, p.e. 0.1 g por litro o menos, y la mutante da 3-10 g por litro puede considerarse sobreproductora.

También hay que considerar que el rendimiento de producto depende del tipo de fermentación. Calam menciona que hay dos tipos de fermentación para producir metabolitos secundarios. El primero de ellos lo constituyen los sistemas usados en investigación donde el crecimiento es bajo (8-15 g células por litro) y la formación de producto es del orden de 0.5-1.0 g por litro y el segundo, los sistemas industriales, donde el crecimiento es de 30-50 g por litro y 5-15 g de producto por litro ó mucho más (60).

Para la obtención de nuestra mutante se utilizó fermentación de superficie, no hubo aumento en el crecimiento porque el crecimiento depende de la superficie del frasco de fermentación que se utilice. Sin embargo como ya se mencionó hubo aumento en la actividad antibiótica en los extractos obtenidos de la cepa mutante UV-153; este aumento expresado como porcentaje de las unidades totales corresponde a un 440 % (4.4 veces), tomando como referencia la cepa que se utilizó para la mutagénesis, la 63-8. Este aumento en la producción, si lo comparamos con otros trabajos donde se obtuvieron mutantes con una producción mayor de cierto metabolito, es bastante satisfactorio. Ejemplos de aumento en los rendimientos utilizando mutantes mejoradas se dan a continuación: Kurushima (1972), obtiene mutante con luz ultravioleta de Aspergillus nidulans que exhiben aumentos de 6 veces en producción de  $\alpha$ -amilasa (27). Okanishi (1970) obtiene una cepa mutante de

*Candida utilis* aumenta su contenido de metionina proteica en un 24% (63). La producción del ácido orgánico más importante es la del ácido cítrico, el organismo más frecuentemente utilizado para su producción es *Aspergillus niger*. Seichertova (1969) presentó resultados de pruebas de fermentación con las 45 mutantes más activas inducidas por irradiación con luz ultravioleta de 4 cepas de *A. niger*. Los máximos mejoramientos en rendimientos fueron del 11% para unas y 18% para otras (27). Elander (1973) describe la línea de mejoramiento de cepas Wyeth de *Penicillium chrysogenum* derivadas de la Wisconsin Q176 con luz ultravioleta, metil-bis-(p-cloroetil amina CNM) y diepoxibutano. Todas las cepas muestran capacidad progresiva para sintetizar penicilina G (benzilpenicilina) y penicilina V (fenoximetilpenicilina) y reporto un mejoramiento de 25 veces en la producción de penicilina G con respecto a la Q176 (29).

Así, se logró mejorar la producción del antibiótico en estudio, y ésta se puede mejorar aún más si la cepa se somete a más tratamientos mutagénicos o bien se implementa la fermentación sumergida.

## 7. CONCLUSIONES:

- Por mutagénesis con luz ultravioleta se obtuvo la cepa UV-153, que tiene un aumento en la producción de antibiótico de 440 % con respecto a su progenitora, cepa 63-8.
- En la producción del antibiótico no se encontraron evidencias que apoyen la probable participación de un plásmido.
- La producción del antibiótico se inicia con el crecimiento del hongo. La máxima actividad antibiótica se alcanza más rápidamente dentro de micelio, que en el medio de cultivo.
- La mayor parte de antibiótico se encuentra dentro del micelio y es poco lo que se excreta al medio.
- Las cepas de *Didymosporium tenuissimum* utilizan como fuente de carbono glucosa, fructosa, galactosa, sacarosa, maltosa, glicerol y xilosa y producen antibiótico en todas las fuentes de carbono que utiliza excepto en xilosa.

BIBLIOGRAFIA:

1. Goodman, L. S. y Gilman A.G. (1986). Las bases farmacológicas de la terapéutica, 7a. ed. Editorial Médica Panamericana, México, pp. 1019-1178.
2. Ciencia y Desarrollo. Historia de la biotecnología. Vol. XIV (1989). No. 84. CONACyT, México, pp. 19-32.
3. Davis, B. D., Dulbecco, R., Eisen, H. N., Ginsberg, H.S., Wood, W.B. y McCarty, M. (1978). Tratado de microbiología, 2a. ed. Salvat Editores, Barcelona, pp. 154-172.
4. Bérdy, J. (1974). Recent developments of antibiotic research and classification of antibiotics according to chemical structures. Advances in Applied Microbiology, 18 Academic Press, Nueva York, pp. 309-407.
5. Luckner, M. (1984). Secondary metabolism in microorganisms, plants and animals. Springer Verlag, Berlín, 576pp.
6. Calam, C.T. (1982). Overproduction of microbial products. In: Krumphanzl, U., Sikyta, B. and Vanek, Z. (eds). Overproduction of Microbial Products. FEMS Symposium No. 13. Academic Press, Londres, pp. 89-95.
7. Zahner, H. y Maas, W.K. (1972). Biology of antibiotics. Springer-Verlag, Nueva York, pp. 1-14.
8. Vanek, Z. y Blumauerová, M. (1986). Physiology and pathophysiology of secondary metabolite production. In: Vanek, Z. y Hostalek, Z. Overproduction of microbial metabolites. Butterworths, Genova pp. 3-25.
9. Lewin, B. (1985). Genes II, 2a. ed. John Willey & Sons, Singapore, pp. 256-257.
10. Hopwood, D. y Merrick, A. (1977). Genetics of antibiotic production. Bacteriol. Rev. 41 : 595-635.
11. Bouanchaud, D.H., Scavizzi, M. y Chabbert, R. (1969). Elimination by ethidium bromide of antibiotic resistance in enterobacteria and Staphylococci. J. Gen Microbiol. 54: 417-425.
12. Watanabe, T. y Fukasawa, T. (1961). Episome-mediated transfer of drug resistance factors with acridine. J. Bacteriol. 81 : 679-683.

13. Hahn, F.E. y Ciak, J. (1971). Experimental elimination of resistance determinantes. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 182: 295-304.
14. Freifelder, D. (1970). Isolation of extrachromosomal DNA from bacteria. In: Grossman, L. y Moldave, K. (eds). *Methods in Enzymology*. Vol. 21. Academic Press. Nueva York. pp.153-163.
15. Pinney, R. J. y Smith, J.T. (1972). R Factor elimination during thymine starvation : effects of inhibition of protein synthesis and readdition of thymine. *J. Bacteriol.* 111: 361-367.
16. Salisbury, V.R., Hedges, W. y Datta, N. (1972). Two modes of "curing" transmissible bacterial plasmids. *J. Gen. Microbiol.* 70: 443-452.
17. Lepecq, J.B. y Paoletti, G. (1967). A fluorescent complex between ethidium bromide and nucleic acid. *J. Mol. Biol.* 27: 106.
18. Kirby, R. y Hopwood, D.A. (1977). Genetic determination of methylenomicina synthesis by the SCP1 plasmid of *Streptomyces coelicolor* A3 (2). *J. Gen. Microbiol.* 98: 239-252.
19. Kirby, R., Wright, L.F. y Hopwood, D.A. (1975). Plasmid-determined antibiotic synthesis and resistance in *Streptomyces coelicolor*. *Nature (Londres)*. 254: 265-267.
20. Akaqawa, H., Okanishi M. y Umezawa, H. (1975). A plasmid involved in chloramphenicol production in *Streptomyces venezuelae*: evidence from genetic mapping. *J. Gen. Microbiol.* 90: 336-346.
21. Kahler, R. y Noack, D. (1974). Action of acridine orange and ethidium bromide on growth and antibiotic activity of *Streptomyces hygroscopicus* JA 6599. *Z. Allg. Mikrobiol.* 14: 329-333.
22. Okanishi, M., Otha, T. y Umezawa, H. (1970). Possible control of formation of aerial mycelium and antibiotic production in *Streptomyces* by episomic factor. *J. Antibiot.* 23: 45-47.
23. Baltz, R.H. (1986). Strain Improvement. In: Demain, A. L. y Solomon, N.A. (eds.) *Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology*. American Society of Microbiology. Washington. 154 pp.
24. Hopwood, D.A. (1970). The isolation of mutants. In: Norris, J.R. y Ribbons, D.W. (eds.). *Methods in Microbiology*. Vol. 3A. Academic Press. Nueva York. pp. 363-433.

25. Brown, W.F. y Elander, R.P. (1966). Some biometric considerations in an applied antibiotic. AD-464 strain development program. *Dev. Ind. Microbiol.* 7: 114-123.
26. Calam, C. (1970). Improvement of microorganisms by mutation, hybridization and selection. In: Norris, J.R. y Ribbons, D.W. (eds.). *Methods in Microbiology* Vol. 3A. Academic Press. Nueva York, pp. 435-459.
27. Johnston, J.R. (1975). Strain improvement and strain stability in filamentous fungi. In: Smith, J.E. y Berry, D.V. (eds.) *The Filamentous Fungi* Vol. I. *Industrial Mycology*. Edward Arnold, Londres, pp. 64-72.
28. Backus, M. P. y Stauffer, J. F. (1955). The production and selection of a family of strain in *Penicillium chrysogenum*. *Mycologia* 47: 429-461.
29. Elander, R.P., Espenshade, M.A., Pathak, S.C. y Pan, C.H. (1973). The use of parasexual genetics in industrial strain improvement programme with *Penicillium chrysogenum*. In: Vanek, Z., Hostalek Z. y Cudlin, J. (eds.). *Genetics of Industrial Microorganisms*. Prague Academia, pp. 239-253.
30. Dennen, D. W. y Carver, D.D. (1969). Sulfatase regulation and antibiotic synthesis in *Cephalosporium acremonium*. *Gen. J. Microbiol.* 15: 75-81.
31. Luengo, J.M., Revilla, G., Villanueva, J.R., y Martín, J.F. (1979). Lysine regulation of penicillin biosynthesis in low-producing and industrial strains of *Penicillium chrysogenum*. *J. Gen. Microbiol.* 115: 207-211.
32. Luengo, J.M., Revilla, G., López, M.J., Villanueva, J.R., y Martín, J.F. (1980). Inhibition and repression of homocitrato synthase by lysine in *Penicillium chrysogenum*. *J. Bacteriol.* 144: 869-876.
33. Gil, J.A., Liras, P., Naharro, G., Villanueva, J.R. y Martín, J.F. (1980). Regulation by aromatic amino acids of biosynthesis of candidicin by *Streptomyces griseus*. *J. Gen. Microbiol.* 118: 189-195.
34. Gil, J.A., Naharro, G., Villanueva, J.R. y Martín, J. F. (1983). Characterization and regulation of p-aminobenzoic acid synthase from *Streptomyces griseus*. *J. Gen. Microbiol.* 131: 2179-2287.
35. Mendelovitz, S. y Aharonowitz, Y. (1983). -Lactam antibiotic production by *Streptomyces clavuligerus* mutants impaired in regulation of aspartokinase. *J. Gen. Microbiol.* 127: 2063-2069.

36. Barron, G.L. (1962). New species and new records of *Qidiodendron*. *Can. J. Bot.* 40: 589-607.
37. Michael, S. (1948). Fucsin, a metabolic product of *Qidiodendron fuscum*. Robak I. Preparation properties and activity antibacterial. *Biochem. J.* 48: 528-533.
38. Filipello, M.V. (1976). On the antibiotic activity of "*Diheterospora chlamydospora*" and *Qidiodendron truncatum*. *ALLION IA* (Turin) 21: 67-72.
39. Crawley, G.C. (1981). Isolation of 3-one metabolites from *Qidiodendron rhodogermum* Robak. *J. Chem. Soc. Perkins Inst. IQ* (1) : 221-223.
40. Andersen, N.R., Boisen Lorck, O.H. y Rasmussen, P. R. (1983). Fermentation isolation of antibiotic PR-1350. *J. Antibiot.* (Tokyo). 36: 753-760.
41. Andersen, N.R. y Rasmussen, P.R. (1984). The constitution of clerocidin, a new antibiotic isolated from *Qidiodendron truncatum*. *Tetrahedron Lett.* 25: 465-468.
42. Fantini, A. A. (1975). Strain development. In: Hash, J. H. (ed.) . *Methods in Enzymology (Antibiotics)* Vol. XLIII. Academic Press, Nueva York, pp. 24-55.
43. Rendina, G. (1971). *Experimental Methods in Modern Biochemistry*. W.B. Saunders Company, USA, pp. 113-114.
44. Maniatis, T., Tritsch, E. F. y Sambrook, J. (1982). *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory. Cold Spring Harbor. Nueva York.
45. Lockwood, L.B. (1975). Organic acid production. In: Smith, J.E. y Berry, D. (eds.) *The Filamentous Fungi* Vol. I. *Industrial Mycology*. Edward Arnold, Londres. pp. 140-157.
46. Guenner, S.W. y Lively, D.H. (1984). Screening and selection for strain improvement. In: Demain, A. L. y Solomon, N. A. (eds.) . *Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology*. American Society of Microbiology. Washington. pp. 155-169.
47. Bennett, J. W. (1985). Molds, manufacturing and molecular genetics. In: Liss, A.R. (ed.) . *Molecular Genetic of Filamentous Fungi*. Nueva York. pp. 345-366.
48. Grove, J.F. (1967). Griseofulvina. In: Gottlieb, D. y Schaw, P.D. (eds.) . *Antibiotics II. Biosynthesis*. Springer-Verlag. Nueva York, pp. 124-133.

49. Bates, R.B. (1967). Terpenoides antibiotic. In: Gottlieb, D. y Schaw, P.D. (eds.). *Antibiotics II. Biosynthesis*. Springer Verlag. Nueva York. pp. 124-133.
50. Demain, A. L. (1957). The site of penicillin accumulation during biosynthesis. *Antibiotics & Chemotherapy*, 7 pp. 359.
51. Abraham, E.P. y Newton, G.G.F. (1967). Penicillins and cephalosporins. In: Gottlieb y Schaw, P.D. (eds.). *Antibiotics II. Biosynthesis*. Springer Verlag Nueva York. pp. 1-16.
52. Turner, W.B. (1971). *Fungal metabolites*. Academic Press. Londres y Nueva York.
53. Demain, A. L. (1972). Cellular and environmental factors affecting the synthesis and excretion of metabolites. *J. Appl. Chem. Biotechnol.* 22: 345-362.
54. Malik, W.S. y Vining, L. C. (1972). Effect of chloramphenicol on its biosynthesis by *Streptomyces* species. *Can J. Microbiol.* 18: 137-143.
55. Muth, W. L. y Nash, C. H. (1975). Biosynthesis of mycophenolic acid: purification and characterization of S-adenosyl-L-methionine: demethylmycophenolic acid O-methyltransferase. *Antimicrob. Agents Chemoter.* 8: 321-327.
56. Martin, J.F. (1978). Manipulation of gene expression in the development of antibiotic production. In: *Antibiotic and other metabolites: Biosynthesis and production*. FEMS Symposium No. 5. pp. 19-37.
57. Goulden, S.A. y Chattaway, F.W. (1969). End-product control of acetohydroxiacid synthetase by valine in *Penicillium chrysogenum* Q176 and a high penicillin-yielding mutant. *J. Gen. Microbiol.* 59: 111-118.
58. Spalla, C. y Marnetti, M.P. (1978). Genetic aspects of the formation of Ergot alkaloids. In: Leisinger, H. y Wehrli, W. (eds.). *Antibiotics and other Secondary Metabolites: Biosynthesis and Production*. FEMS Symposium No. 5. Academic Press. pp. 219-232.
59. Ibb, M., Taylor, S.J.C., Weedon, C.M. y Mantle, P. G. (1987). Submerged fermentation of *Penicillium oxillii* biosynthesizing Paxilline a process inhibited by calcium-induced sporulation. *J. Gen. Microbiol.* 133: 3109-3119.
60. Calam, C.T. (1986). Physiology of the overproduction of secondary metabolites. In: Vanek, Z. y Hostalek, Z. (eds.). *Overproduction of Microbial Metabolites*. Butterworths. Genova. pp. 29-50.

61. Martín, J.F. y Demain, A.L. (1980). Control of antibiotic biosynthesis. *Microbiol. Rev.* 44 : 230-251.
62. Dickinson, C. H. y Boardman, F. (1970). Physiological studies of some fungi isolated from peat. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 55: 293-305.
63. Okanishi, M. y Gregory, K. F. (1970). Isolation of mutants of *Candida tropicalis* with increased methionine content. *Can. J. Microbiol.* 16: 1139-1143.