

AISLAMIENTO DE MUTANTES DE *STREPTOMYCES CLAVULIGERUS* RELACIONADAS CON ANTIBIOTICOS β -LACTAMICOS

G. Rosabal, C. Rodríguez y C. Vallín.

Departamento de Biotecnología, Centro de Química Farmacéutica 200 y 21 Atabey, Playa, Ciudad de La Habana, Cuba.

Recibido: 23 de mayo de 1994.

RESUMEN. Se aislaron y caracterizaron morfológicamente seis mutantes de *Streptomyces clavuligerus* bloqueadas en la biosíntesis de antibióticos β -lactámicos. El tratamiento empleado fue la mutagénesis con N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina. Tanto las mutantes con mayores niveles de producción (tres) como las que no produjeron (tres) el inhibidor β -lactámico: ácido clavulánico, fueron seleccionadas mediante determinación de actividad antibiótica en medio sólido y se comprobó la estabilidad del fenotipo. Los niveles de producción alcanzados fueron aproximadamente cuatro veces superiores a los obtenidos con la cepa parental. Se observó una relación entre la capacidad esporulativa, la pigmentación de las mutantes y los niveles de producción de β -lactámicos. Las mutantes se encuentran alteradas en las rutas biosintéticas de otros β -lactámicos.

ABSTRACT. Six mutants of blocked *Streptomyces clavuligerus* in the β -lactam antibiotic biosynthesis were isolated and morphologically characterized. N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine was employed in this mutagenesis. Three of them produce more β -lactam inhibitor (clavulanic acid) than the wild-type strain and the other one doesn't. The antibiotic activity was determined in solid medium and the phenotype stability was proved. The antibiotic production was four times more than the original strain. A relationship between sporulation, pigmentation, and antibiotic production was observed. The mutants are damaged in the other β -lactam biosynthetic pathways.

INTRODUCCION

El micelio bacteriano Gram positivo *Streptomyces clavuligerus*, produce una diversidad de antibióticos β -lactámicos entre los que se incluyen cefamicina C, cefalosporinas y el potente inhibidor de las β -lactamasas, el ácido clavulánico.¹ La resistencia de bacterias patógenas Gram positivas y negativas a antibióticos β -lactámicos, es debido a mutaciones de carácter adaptativo al apresencia de plásmidos o regiones en el cromosoma responsables de la producción de β -lactamasas.² A nivel mundial, esto ha planteado la necesidad clínica del uso de inhibidores de estas enzimas para hacer efectivo el tratamiento de las enfermedades infecciosas^{3,4} y ha demostrado, la importancia que reviste su obtención.

De los inhibidores hallados en programas de tamizaje, el ácido clavulánico ha experimentado un uso terapéutico potente.⁵

En el campo de la Genética, se desarrollan técnicas clásicas y novedosas para obtener nuevas cepas hiperproductoras. Para lograr este objetivo, se han elaborado diversos procedimientos mutagénicos en *Streptomyces*,⁶⁻¹⁰ siendo uno de los más utilizados, el tratamiento con N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina (NTG). Se ha observado que las esporas de esta familia, resultan mucho más resistentes que las células de otras bacterias, por lo que para la obtención de una mutagénesis eficiente, se requiere de condiciones drásticas, dadas aquí, por altas concentraciones de NTG y pH alto.¹¹

En este trabajo, los autores se propusieron llevar a cabo el aislamiento de mutantes con altos niveles de producción del ácido clavulánico para la optimización del proceso de su obtención a escala industrial y de mutantes que no lo producen por su importancia en el clonaje de genes relacionados con la biosíntesis y su regulación.

MATERIALES Y METODOS

Cepas y medios

Streptomyces clavuligerus ATCC 27064 (productora de ácido clavulánico y otros β -lactámicos).

Streptomyces lividans TK-21 SQF-37 (cepario Centro de Química Farmacéutica).

Klebsiella pneumoniae ATCC 29665 (productora de β -lactamasas).

Escherichia coli ESS 22-31 (cepa sensible a β -lactámicos).

Alcaligenes faecalis ATCC 8750 (cepa sensible a cefalosporinas).

Medio de regeneración (ALM) (almidón 0,4 %; extracto de levadura 0,4 %; extracto de malta 1 %; agar técnico #3 2 %; pH 7,2).

Medio fondo de producción (GPE)⁴ (para determinar actividad antibiótica en medio sólido y líquido).

Medio inóculo (MI) (extracto levadura 0,3 %; peptona 0,5 %; extracto de malta 0,3 %; glicerol 1 %; sacarosa 10 %, pH 7,0).

Caldo Mueller-Hinton y agar nutriente (medios para el ensayo microbiológico).

Mutagénesis

Se empleó el método descrito por Délic y col.¹¹ Una suspensión de esporas de concentración inicial de 5.1×10^7 esporas/mL de la cepa parental *Streptomyces clavuligerus* ATCC 27064 fue suspendida en amortiguador TM (0,05 mol/L Tris-hidroximetil-aminometano y 0,05 mol/L de ácido maleico) pH 9 y mutagenizada¹² con 1 mg/mL de NTG a 30 °C durante 1 h. Con estas condiciones, la sobrevivencia una hora después, resultó del 1 %.

Selección de mutantes

Las esporas tratadas en ALM se plaquearon e incubaron a 30 °C por 465 d. Después, se aplicaron a GPE sólido y se incubaron por 3 d más para determinar la actividad antibiótica de inhibición de β -lactamasa, utilizando el método de las piezas de agar.¹³ Las colonias seleccionadas por su resultado en el ensayo anterior, fueron replicadas dos veces para comprobar su fenotipo estable y luego, se realizó el ensayo en medio líquido.

Las mutantes seleccionadas fueron inoculadas en MI y colocadas en zaranda rotatoria a 280r/min y 28 °C durante 48 h. Este inóculo se transfirió a GPE líquido y se fermentó en las mismas condiciones. Se recogieron las muestras del caldo fermentado a las 96 h y se realizó el ensayo microbiológico para la determinación de la producción del ácido clavulánico. La determinación de los niveles de producción de otros β -lactámicos, se realizó a las 48, 72 y 96 h durante la fermentación.

Determinación de antibióticos β -lactámicos

La detección y el análisis cuantitativo del ácido clavulánico, se realizó según método descrito por Romero y col.,¹⁴ empleando como microorganismo prueba la *Klebsiella pneumoniae* ATCC 29665. La ampicilina utilizada, fue suministrada por la Empresa Farmacéutica "8 de Marzo", La Habana. Se empleó como patrón, el ácido clavulánico (BEECHAM).

En la determinación de la producción del resto de los antibióticos β -lactámicos, se emplearon —como microorganismos prueba en la placa de difusión del antibiótico— *E. coli*

ESS 22-31 como indicador del total de β -lactámicos producidos durante la fermentación y *Alcaligenes faecalis* ATCC 8750 como indicador específico de los metabolitos cefalosporánicos.¹⁵ En ambos casos, se empleó como patrón, la cefalosporina C (Empresa Farmacéutica "8 de Marzo", La Habana).

Se empleó como control negativo en los ensayos *Streptomyces lividans* TK-21 y como control positivo la cepa salvaje *Streptomyces clavuligerus* ATCC 27064.

Los resultados fueron expresados como valores medios, luego de realizar varias fermentaciones para comprobar la estabilidad en la producción y fenotipo de las cepas mutantes.

RESULTADOS Y DISCUSION

De acuerdo con la actividad microbiológica de inhibición de β -lactamasa, fueron seleccionadas seis mutantes: tres con niveles de producción de ácido clavulánico superiores a la cepa original que fueron denominados: Mp3, Mp11 y Mp24 y el resto que no lo produce, Mnp7, Mnp9 y Mnp22.

Las primeras mutantes mencionadas presentan como características comunes, la producción de un pigmento carmelita intenso y la pobreza o ausencia de esporulación. Estas cualidades probablemente están asociadas a la producción del inhibidor o de otro antibiótico β -lactámico como se ha referido para otras especies de *Streptomyces*.

A pesar de presentar aspectos en común, se diferenciaron entre sí fenotípicamente por la diversa tonalidad de la coloración del micelio (Tabla I) y genotípicamente, por los diferentes niveles de producción de antibióticos β -lactámicos (Tabla II).

TABLA I
Características morfológicas y de producción del ácido clavulánico en la cepa salvaje *Streptomyces clavuligerus* ATCC 27064 y mutantes seleccionadas

Cepas	Medio		
	ALM		GPE
	Esporulación	Pigmentación	Producción (μ g/mL)
ATCC 27064	Buena	No pigmenta (blanca)	5
Mp-3	NO	Carmelita oscuro	$\approx$ 20
Mp-11	NO	Carmelita oscuro intenso	25
Mp-24	NO	Carmelita oscuro	25
Mnp-7	Buena	Violeta intenso	No produce
Mnp-22B	Buena	Naranja	No produce
Mnp-9	Buena	No pigmenta	No produce

Las segundas presentan entre sí, diferencias en el caso de la coloración de las esporas, sin embargo, muestran una magnífica esporulación, reafirmando la posible asociación entre este factor y la producción del ácido clavulánico en esta cepa de *Streptomyces* (Tabla I).

En las mutantes que presentan altos niveles de producción del ácido clavulánico, se detectó que sus caldos de fermentación, también ejercían un efecto inhibidor mayor sobre la cepa *Alcaligenes faecalis* y *E. coli*, que la cepa original (Tabla II). Por lo tanto, estas mutantes producen mayores niveles del resto de los antibióticos β -lactámicos biosintetizados por esta cepa: cefamicina C y cefalosporinas, teniendo en cuenta que el ácido clavulánico no interfiere en estos dos ensayos, ya que es un antibiótico de acción muy débil.⁶

Las mutantes no productoras del inhibidor, en el resto de los ensayos, no produjeron antibióticos β -lactámicos (Tabla II), demostrando que se encontraban dañadas en las rutas biosintéticas en general de este grupo de compuestos.

Sólo en la Mnp22, se detectó un efecto inhibidor del caldo fermentado, tanto sobre la cepa *Alcaligenes faecalis* como sobre *E. coli*. Esto demuestra que la mutante se encuentra bloqueada en la ruta biosintética del ácido clavulánico preferentemente y no en la producción de otro antibiótico β -lactámico. De esta forma, se evidencia que las reacciones involucradas en la formación de ese ácido y de otros β -lactámicos, son diferentes, a pesar de pertenecer al mismo grupo de compuestos, como ha sido sugerido con anterioridad.^{14,16}

Teniendo en cuenta que es frecuente que este mutágeno produzca co-mutaciones (deseadas y no deseadas) y que

en el cromosoma las rutas biosintéticas de antibióticos β -lactámicos estén muy cercanas o relacionadas con alguna forma de regulación, podría explicarse el aumento simultáneo de la formación de estos antibióticos en las mutantes con mayores

niveles de producción, así como su ausencia total en las mutantes que no producen ácido clavulánico, aspectos que han sido sugeridos y demostrados parcialmente por otros autores.^{16,17}

TABLA II
Peoducción de cefalosporinas y β -lactámicos totales por el caldo de fermentación en la cepa salvaje *Streptomyces clvuligerus* ATCC 27064 y mutantes seleccionadas en tres tiempos

Cepas	<i>Alcaligenes faecalis</i>			<i>Escherichia coli</i>		
	Producción (mg/mL)					
	Cefalosporinas			β-lactámicos		
	48 h	72 h	96 h	48 h	72 h	96 h
ATCC 27064	25	45	45	400	400	500
Mp-3	25	60	804	450	650	700
Mp-11	10	50		400	500	650
Mp-24	60	90	100	500	600	650
Mnp-7	————				———	
Mnp-22	25	50	90	100	150	200
Mnp-9	————				———	

*Los resultados han sido expresados como $\bar{X}$.

CONCLUSIONES

Se aislaron mutantes con mayores niveles de producción de ácido clavulánico a través de mutagénesis con N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina, los cuales resultaron cuatro veces superiores a los de la cepa productora original, siendo un hecho de interés industrial en el campo de la fermentación de antibióticos.

Se demostró que las mayores producciones de ese inhibidor, están asociadas con la formación de un pigmento y la pérdida de la capacidad esporulativa, lo cual podría facilitar los trabajos futuros de aislamiento de mutantes con altos rendimientos. Esas mutantes también pudieran ser empleadas para obtener otros antibióticos β -lactámicos.

Se aislaron mutantes que no producen ácido clavulánico, y que presentan morfológicamente, una buena esporulación, lo que parece reafirmar la asociación producción-esporulación en esta cepa de *Streptomyces*. Estas mutantes se encuentran además bloqueadas en rutas biosintéticas de otros β -lactámicos, lo cual es de importancia para el clonaje de genes relacionados con el inhibidor u otro β -lactámico, pudiendo ser específico como en el caso de la Mnp22.

BIBLIOGRAFIA

1. Higgens C. E., Kastner R. E. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **29**, 1526, 1971.
2. Richmond M. H. *Phil. Trans. R. Soc. Lond.*, **B289**, 349, 1980.
3. Brown A.G., Butterworth D., Cole M., Hanscomb G., Hood J.D. and Reading C. *The Journal of Antibiotics*, **29**, 668, 1976.

4. Reading C., Cole M. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **11**, 852, 1977.
5. Brookes G. *Lancet*, **1**, 620, 1980.
6. Bailey C. R., Butler M.J., Normansell I.D., Robert T.R. and Winstanley D.J. *Bio/Technology*, **2**, 808, 1984.
7. Earl A. *J. Chem. Tech. Biotech.*, **50**, 123, 1991.
8. Hopwood D. A. and Chater F. K. *Genetics and Breeding of Industrial Microorganisms*. Chapter 2: *Streptomyces*. Christopher Ball (Chairman and chief executive officer Penlab Genetics Bellevue, Washington) (Ed.) CRC Press, Inc. Boca Ratón, Florida, 7-42, 1984.
9. Hopwood D. A. Sixth Int. Sympon *Actinomycetes Biology*. G. Szabó, S. Biró and M. Goodfellow (Ed.), Debrecen, Hungary, Aug., L1, 26-30 1985.
10. Rowlands T. R. Fifth International Symposium on the Genetics of Industrial Microorganisms. Book of Abstracts, GIM, Yugoslavia W 10-5, 180, 1986.
11. Délic V., Hopwood D. A., Friend E. J. *Mutacion Research*, **9**, 167, 1970.
12. Hopwood D. A, Biblo M.J., Chater K.F., Kieser T., Bruton C.J., Kiser H.D., Lydiate D.J., Smith C. P. and Ward J.M. Genetic manipulation of *Streptomyces* A laboratory manual. Cap. I and II, The John Innes Foundation. Norwich, England, 1-68, 1985.
13. Ichikawa T. *Folia Microbiol.*, **16**, 218, 1971.
14. Martín J. F., P. Liras, J. Romero *Applied and Microbiology Biotechnology*, **27**, 510, 1988.
15. Claridge C. A., Johnson D. L. *Antib. Agents Chemother.*, **682**, 1962.
16. Martín J. F., Liras P., Romero J. *Applied Microbiol. Biotechnol.*, **20**, 318, 1984.
17. Martín J. F., Y. Aharonowitz, G. Cohen *Annu. Rev. Microbiol.*, **46**, 461, 1992.