

# AISLAMIENTO Y SELECCION DE CEPAS DE ACTINOMICETOS CON ACTIVIDAD FARMACOLOGICA. REPORTE PRELIMINAR

I. González, S. Planas, C. Vallín, L. Herrera\*

Centro de Química Farmacéutica, Calle 200 y 21, Atabey, Playa, Ciudad de La Habana,

\*Centro Nacional de Biopreparados, Bejucal, La Habana, Cuba.

Recibido: 23 de octubre de 1991.

**RESUMEN.** Se llevó a cabo una caracterización preliminar de un grupo de cepas de actinomicetos, aisladas a partir de muestras de suelo, con el objetivo de obtener cepas productoras de sustancias con actividad antimicrobiana, antiviral, antitumoral y cepas productoras de sustancias inhibidoras de proteasas. Se probaron un total de 231 cepas, de las cuales 30 presentaron actividad antitumoral, 54 actividad antimicrobiana y tres como posibles productoras de inhibidores de tripsina.

**ABSTRACT.** A preliminary characterization of 231 actinomycetes strains isolated from soil, was done. The aim of the work was to obtain biologically active compounds producing-strains. The main biological activities screened were antitumoral, antiviral, antibacterial as well as protease inhibition. Finally, 30 strains were selected for their antitumoral properties, 10 for their antiviral activities, 54 for their antibacterial activities and three for their capacity to inhibit the enzyme tripsin.

## INTRODUCCION

Los actinomicetos son bacterias Gram positivas que presentan una serie de características notables que las distinguen del resto de los procariontes, como es, la presencia de un ciclo de vida con verdaderos procesos de diferenciación celular, formación de micelio aéreo, esporas, etcétera. Otra característica importante de este grupo de microorganismos es la producción de un gran número de metabolitos secundarios de interés industrial como los antibióticos, agentes antivirales, inhibidores enzimáticos y muchos otros compuestos.

El surgimiento de cepas resistentes a los antibióticos ya establecidos ha impulsado la búsqueda de nuevos compuestos más eficientes para el tratamiento de ciertas infecciones, especialmente aquellas provocadas por hongos y virus, así como para el tratamiento del cáncer.<sup>1</sup>

Teniendo en cuenta estos aspectos, este trabajo se realizó con el objetivo de caracterizar desde el punto de vista farmacológico, un grupo de cepas de actinomicetos aisladas de muestras de tierra, mediante el establecimiento de diferentes modelos biológicos *in vitro*.

## MATERIALES Y METODOS

### Material biológico utilizado

Se utilizaron un total de 231 cepas de actinomicetos aisladas de muestras de suelo, de ellas 110 cepas procedentes de la Facultad de Biología.

*E. coli* K-12 ( $\lambda$ ) utilizada en la prueba de inducción del profago.

*E. coli* C-600 ( $\lambda$ ) utilizada en la prueba de difusión en agar (BIP).

*Bacillus subtilis* ATCC 6633 cepa supersensible a antibióticos.

En la determinación de la actividad antibiótica fueron utilizadas un grupo de cepas de *Staphylococcus aureus* (845, 641 y 872), *Pseudomonas aeruginosa* (27853, 279 y 274), *Escherichia coli* y *Salmonella sp.*, procedentes del Instituto de

Higiene y Epidemiología (Centro Habana) y del Hospital Pediátrico "Juan Manuel Márquez".

### Medios de cultivo

Medio de aislamiento MA.<sup>2</sup>

Medio de conservación MC.<sup>3</sup>

Medio líquido de selección MS.<sup>4</sup>

Medio agar antibiótico #2 (OXOID).

Medio T, Medio LB y amortiguador SM.<sup>5</sup>

Se utilizó una solución de tripsina pancreática bovina (BDH) en amortiguador borato pH 7,6 a 2 mg/mL.

Los antibióticos mitomicina C (Kyoto Pharmaceuticals Co.) y doxorubicina (Farmitalia Co.), fueron empleados como controles positivos en las pruebas de inducción del profago y difusión en agar (BIP), respectivamente.

### Aislamiento de cepas de actinomicetos

El aislamiento de cepas a partir de muestras de suelo se realizó según la metodología descrita por Zsábó en 1976.<sup>6</sup>

### Determinación de la actividad antibiótica

Para la determinación de la actividad antibiótica frente a las diferentes cepas utilizadas, se siguió el método clásico de difusión en agar.<sup>7</sup>

### Determinación de la actividad antitumoral y antiviral

Para la selección de cepas productoras de sustancias con actividad antitumoral se empleó la prueba de inducción del profago<sup>8</sup> y la prueba de difusión en agar BIP.<sup>9</sup> Esta última también fue utilizada como criterio de selección de cepas productoras de sustancias con actividad antiviral.

### Determinación de sustancias inhibidoras de tripsina

Muestras de 0,2 mL de caldo de fermentación de cada aislamiento se probaron como posibles inhibidoras frente a la enzima tripsina pancreática bovina y como sustrato de la reacción se utilizó la solución de caseína al 1% en I

mismo amortiguador y el reactivo de folin como indicador de la reacción.<sup>10</sup>

En cada caso, se tuvo en cuenta el valor de la muestra blanco y como posibles inhibidores enzimáticos se seleccionaron aquellas cepas que mostraron un porcentaje de inhibición mayor del 50%.<sup>11</sup>

## RESULTADOS Y DISCUSION

La identificación de las colonias de *Streptomyces* se llevó a cabo teniendo en cuenta las características morfológicas que distinguen este grupo de microorganismos del resto, así como la observación al microscopio óptico de sus esporas de pequeño tamaño agrupadas en cadenas y la formación de un micelio constituido por hifas muy finas.<sup>12</sup>

En la Tabla I aparecen los resultados de la determinación de la actividad antibiótica frente a *B. subtilis*

**TABLA I**  
**Determinación de la actividad antimicrobiana frente a *B. subtilis***

Total de cepas	Nivel de actividad antibiótica [diámetro del halo de inhibición (mm)]
41	
40	II
10	III
177	IV

I hasta 10 mm de diámetro; II de 10 a 20 mm; III de 20 o más; IV ausencia de halo.

Con vistas a ampliar el espectro de actividad antibiótica de las cepas, las mismas fueron probadas frente a diferentes cepas patógenas de *Staphylococcus* y *Pseudomonas* resistentes a la mayoría de los antibióticos comúnmente utilizados (Tabla II).

**TABLA II**  
**Determinación de la actividad antimicrobiana frente a los géneros *Pseudomonas* y *Staphylococcus***

Nivel de actividad antibiótica	Cepas					
	<i>Staphylococcus</i>			<i>Pseudomonas</i>		
	845	641	872	27853	279	274
I3		4	-	-	-	-
II	27	7	1	-	-	-
III	9	-	-	-	-	-

I hasta 10 mm de diámetro; II de 10 a 20 mm; III de 20 o más; IV ausencia de halo.

Las cepas 146, 172, 216 y 219 mostraron los mejores resultados frente a diferentes cepas de *E. coli* patógenas y *Salmonella* grupo E (Tabla III).

En la tabla IV aparecen los resultados obtenidos en la prueba de inducción del profago. Como puede observarse 18 del total de cepas probadas representan cepas potencialmente productoras de antibióticos antitumorales.

Por otra parte, un total de 31 cepas se mostraron positivas en la prueba de difusión en agar BIP, representando uno u otro tipo de respuesta y en algunos casos se obtuvieron cepas con sus combinaciones, lo cual concuerda con lo reportado para aquellos antibióticos que presentan efectos anti-

tumorales y antivirales, siendo su sitio de acción el ADN de la célula o el ADN viral.

**TABLA III**  
**Actividad de algunas de las cepas seleccionadas frente a microorganismos patógenos**

Cepas de <i>Streptomyces</i>	Cepas de <i>E. coli</i>				<i>Salmonella</i> grupo E
	ETP	URT	HMC	URC	
146	---			-	-
172	---			+	-
216	---			-	-
219	+++			-	+

ETP *E. coli* enteropatógena; URT *E. coli* uretral; HMC *E. coli* hemocultivo; URC *E. coli* urocultivo.

**TABLA IV**  
**Respuesta de las cepas estudiadas a las pruebas de inducción del profago frente a las células *E. coli* C-600 y K-12**

Tipo de respuesta	Prueba de inducción del profago C-600K-			12
	AM	AIP	AV	
Positiva	4	30101		8
Negativa		200		213

AM actividad antimicrobiana; AIP actividad inductora del profago; AV actividad antiviral.

Debido a la importancia que representa el aislamiento de sustancias inhibitoras de proteasas, siendo los inhibidores de tripsina los más frecuentes en la naturaleza y en muchas patologías,<sup>13</sup> se llevó a cabo la determinación enzimática de inhibidores de tripsina en cada uno de los caldos de las cepas de *Actinomicetos* aisladas (Tabla V).

**TABLA V**  
**Cepas positivas en la prueba de inhibidores de proteasas utilizando la tripsina como enzima de referencia**

Cepas	Inhibición (%)
155	94
197	93
2107	7

## CONCLUSIONES

A partir de estos datos, se cuenta con un grupo de cepas posibles productoras de sustancias antibióticas con efecto antitumoral y antiviral y debe completarse su estudio mediante la evaluación de la actividad citotóxica *in vitro* e *in vivo* frente a células tumorales.

Por otra parte, debe continuarse el trabajo con las cepas productoras de sustancias inhibitoras de tripsina con vistas a probar su efectividad frente a otros tipos de proteasas.

Es necesario realizar la identificación taxonómica de las cepas aisladas, así como la purificación y caracterización de la sustancia activa en cada caso.

## BIBLIOGRAFIA

1. Hopwood D.A. Antibiotics: **Phil. Trans. R. Soc. London B.**, **324**, 549, 1989.
2. Kuster E. and Williams S. T. **Nature**, **202**, 928, 1964.
3. Kuster E. **Int. Bull. of Bacteriological Nomencl. Taxon.**, **11**, 91, 1961.
4. Kiyoto S.A. **J. Antibiotics**, **40**, 594, 1987.
5. Maniatis T., Fritseh E. F. and Sambrook. **Molecular Cloning. A Laboratory Manual**. Editorial Cold Spring Harbor, 1982.
6. Szabó I.M. **Rendzing Ecosystem**. Akademiai Kiadó. Budapest, 1974.
7. Grove D. and Randle W. **Microbiology. A Laboratory Manual**, Editorial Mir, Moscú, 1978.
8. Heinemann B. **Chemicals mutagens principles and methods for their detection (1)**. Editorial Plenum Press, New York, Paris, London, 1978.
9. Fleck W. **Progress. Hig. J. Med. Dosy**, **28**, 479, 1974.
10. Yaginuma S., Asahi A., Monshita A., Hayashi M., Tsujino M. and Takado M. **J. Antibiotics**, **42**, 1362, 1989.
11. Suda H., Aoyagi T., Hamad M., Takeuski T. and Umesawa H. **J. Antibiotics**, **4**, 263, 1972.
12. Fernández C. y Novo S. **Vida Microbiana en el suelo**. Editorial Pueblo y Educación, 86-91, 1981.
13. Barret A. J. **Proteins and Inhibitors**. Editorial Elsevier Pub. B. V., London, 1986.