

Consideraciones actuales para la selección de actinomicetos productores de metabolitos novedosos. Nuevas tendencias de los programas de tamizaje industrial

Alina Niebla, Ileana González y Carlos Vallín.

Laboratorio de Microbiología, Departamento de Biotecnología, Centro de Química Farmacéutica, Avenida 25 y 158, Cubanacán, Playa, Apartado Postal 6414, Ciudad de La Habana, Cuba.

Recibido: 5 de abril de 1999. Aceptado: 19 de abril del 2000.

Palabras clave: actinomicetos, biotecnología, antibióticos, fermentación, Industria Farmacéutica.
Key words: actinomyces, biotechnology, antibiotics, fermentation, Pharmaceutical Industry.

RESUMEN. Con el descubrimiento de los microorganismos y el desarrollo subsecuente de los métodos para su cultivo, surgió y se desarrolló la biotecnología, impulsando los sistemas de tamizaje microbiano con fines industriales. Los programas industriales de esta índole son los encargados de la selección de nuevos microorganismos con actividades biológicas de interés. El éxito de este tipo de programas depende de varios factores tales como: la definición del microorganismo que se desea aislar, la actividad de la sustancia, la fuente de microorganismos a emplear, las condiciones de enriquecimiento y sistemas de tamizaje, etcétera, cuyas particularidades han cambiado con la introducción de nuevas técnicas. El proceso de selección de las cepas es la clave del éxito en un programa de este tipo, pero sólo culmina con el desarrollo del producto unido a la optimización de su producción, el escalado y su producción. Todas estas etapas presentan sus propias características y han cambiado profundamente con el desarrollo de técnicas automatizadas, moleculares y ultra-analíticas que permiten la identificación de productos en breves periodos. Estos aspectos serán abordados durante la revisión. Un especial énfasis se hará en el descubrimiento y desarrollo de nuevos agentes antimicrobianos, los problemas que confrontan los programas de tamizaje modernos y sus tendencias futuras, donde la ingeniería genética y de proteínas tiene y tendrá sin lugar a dudas, un impacto muy grande.

ABSTRACT. The discovery of microorganisms and the development of methods for their culture, brought about the biotechnology and its current status, providing an impulse to the development of industrial microbial screening with industrial purposes. The Industrial Screening Programs are responsible for the selection of new microorganisms with biological activity of interest. The success of this kind of programs depend on different factors such as: the definition of the microorganism to be isolated, the activity of the substance, the source of microorganism to be used, the development of the enrichment parameters and the screening system. Their particularities have been changing with the introduction of new techniques. The strains selection process is the key to success on this sort of programs, but only finish with the development of the product together with the optimization of the production, the scaling up and the final production. All these stages have their own features and they have changed dramatically with the development of automatized, molecular and ultra-analytic techniques which make possible a speedy identification of products. These topics are going to be the subjects to be discussed on this review. A special emphasis will be taken in the discovery and development of new antimicrobial agents, the problems that are confronting the modern screening programs and their future tendencies, where the genetic engineering area and proteins certainly have and will have a strong impact.

INTRODUCCION

Los microorganismos fueron utilizados desde tiempos prehistóricos por el hombre para la producción de brebajes, alimentos, productos textiles y antibióticos.¹ Posteriormente, con el descubrimiento de ellos y el desarrollo subsecuente de los métodos para su cultivo, surgió y se desarrolló la biotecnología.

El desarrollo alcanzado por el tamizaje microbiano y las técnicas de cultivo ha llegado a un punto que ha permitido que los productos obtenidos por vía microbiana ocupen un lugar muy importante en la Industria y estén presentes en la mayor parte de la vida del hombre.^{2,3}

Este trabajo se propuso revisar las características y complejidades de un programa industrial para la búsqueda de nuevas entidades biológicamente activas producidas por bacterias, en particular, los Actinomicetos. Un especial énfasis se hará en el descubrimiento y desarrollo de nuevos agentes antimicrobianos, los problemas que confrontan los programas de tamizaje modernos, el proceso de descubrimiento de nuevos agentes antimicrobianos y las tendencias de la Industria Médico-Farmacéutica.

MICROORGANISMOS Y PRODUCTOS

Los microorganismos son utilizados para la producción de cientos de

productos comerciales valorados en más de diez billones de dólares en el mundo¹⁻¹⁰ (Tabla 1).

Los productos obtenidos por microorganismos tienen la ventaja de ser considerados por sí mismos como naturales, y por lo tanto, son aprobados mucho más fácilmente para su comercialización que los producidos por microorganismos manipulados genéticamente. La diversidad microbiana es tan amplia que pudiera satisfacer prácticamente todas las necesidades que exige la tecnología moderna y por otra parte, las soluciones que ofrece resultan inocuas al medio ambiente. Por esta razón, la mayoría de las industrias en la actualidad dan preferencias a la producción de productos de origen microbiano.⁷⁻⁹

¿Cómo se podría definir un proceso de tamizaje para una industria o compañía?

TAMIZAJE

Tamizaje significa escudriñar, examinar, buscar y no es más que la selección de microorganismos específicos con una actividad biológica determinada y por tanto, con una potencial aplicación en la industria. Es un proceso de búsqueda que se realiza dentro de una población muy grande de organismos.¹¹

Existen muchos modelos de tamizaje buscando infinidad de actividades microbianas, algunos ejemplos clásicos son aquellos diseñados para la búsqueda de microorganismos capaces de degradar hidrocarburos, de producir enzimas de interés en la industria, antibióticos, inhibidores enzimáticos relacionados con patologías humanas, inmunomoduladores antitumorales, herbicidas, reguladores del crecimiento en plantas, antifitopatógenos, antihelmínticos, antiparasitarios, inhibidores de la adherencia celular, atrapadores de radicales libres, etcétera. Existen otros más modernos dirigidos a blancos específicos, en los que se busca una actividad biológica determinada. En estos modelos si se encuentra un compuesto positivo, el mecanismo de acción correspondiente se conoce de antemano, pues se predefine en el diseño. Casos de este tipo son aquellos que buscan inhibidores de la adherencia celular para cuyo montaje debe tenerse un pleno conocimiento de los atributos de patogenicidad del germen en cuestión. El diseño de estos modelos de tamizaje está siempre asociado a proyectos básicos previos destinados a la profundización del co-

Tabla 1. Microorganismos y productos comerciales.

Producto	Microorganismo
Enzimas	
Amilasa	<i>Bacillus</i> spp., <i>Aspergillus</i> spp.
Celulasa	<i>Aspergillus</i> spp., <i>Trichoderma</i> spp.
Lactasa	<i>Aspergillus</i> spp., <i>Kluyveromyces</i> spp.
Lipasa	<i>Mucor</i> spp., <i>Aspergillus</i> spp.
Proteasa	<i>Bacillus</i> spp., <i>Aspergillus</i> spp.
Acido cítrico	<i>Aspergillus</i> spp.
Etanol	<i>Saccharomyces</i> spp.
Dextrana	<i>Leuconostoc</i> spp.
Vitamina B ₁₂ y aminoácidos	<i>Pseudomonas</i> spp.
L-lisina	<i>Corynebacterium</i> spp.
Antibióticos farmacéuticos	<i>Penicillium</i> spp., <i>Streptomyces</i> spp., <i>Bacillus</i> spp.
Insulina	<i>Escherichia coli</i> (recombinante).
Transformación de esteroides	<i>Arthrobacter</i> spp.

nocimiento con el objetivo de usar modelos mucho más específicos y eficientes.^{4,11}

Para el éxito de un programa de tamizaje se requiere disponer de sistemas de tamizaje bien diseñados para la sustancia que se desea aislar, así como una sistematización en los estudios básicos. El programa no puede convertirse en una tarea de rutina y resulta muy importante reforzar los vínculos de trabajo entre biólogos, microbiólogos y farmacólogos.

El desarrollo de un programa de tamizaje consta de diferentes etapas, siendo la primera una de las más importantes: la definición del microorganismo que se desea aislar.

Dentro del mundo microbiano se ha reportado una gran cantidad de especies productoras de diferentes compuestos con actividad biológica, entre las que se destacan los hongos y las eubacterias. Pero dentro de ellas, los principales productores de metabolitos con actividad farmacológica, y en especial antibiótica, son los Actinomicetos. Se plantea que solo el 10% de los metabolitos secundarios producidos por Actinomicetos son conocidos hasta el momento y por tanto, queda un 90% por descubrir, siendo este grupo de microorganismos uno de los favoritos en programas de este tipo.^{7-10, 12,13}

En segundo lugar, se requiere definir la actividad del producto o tipo de sustancia que se desea aislar.

En este punto, se pueden seguir diferentes alternativas:

- Búsqueda
 - de nuevos miembros de familias de compuestos bien conocidos.

- de nuevos grupos químicos con actividad biológica.

- de compuestos dirigidos a una aplicación específica.

- Seleccionar diferentes compuestos ya conocidos para ver su actividad

Resulta muy importante el desarrollo de las condiciones de enriquecimiento y sistema de tamizaje para lo cual, se debe definir previamente la fuente de microorganismos a emplear. Las tendencias actuales señalan hacia la búsqueda de nuevos medios ambientes o nichos ecológicos.

El camino más prometedor es el que conduce hacia la investigación de nuevos medios ambientes donde puedan encontrarse nuevas especies. Como por ejemplo: aguas termales, hielo glacial, desechos de fábricas para el tratamiento de residuos, en los que determinadas poblaciones de microorganismos están en abundancia a causa de determinadas presiones físicas y químicas. Estos medios ambientes suministran un autoenriquecimiento y selección natural para organismos adaptados a condiciones específicas. Algunos autores han especulado que probablemente menos del 1% de los microorganismos de la Tierra han sido identificados y caracterizados.¹¹⁻¹⁶ De este modo, un gran grupo de ellos potencialmente útiles aún esperan por ser descubiertos. La experiencia ha demostrado que cuando un medio ambiente es muestreado usando múltiples variaciones de medios de cultivo y enriquecimientos, se aíslan nuevos microorganismos.

Casos como estos se les encuentra en la búsqueda de microorganismos que producen quitinasa y oxidan amonio a partir del guano producido por los murciélagos en el suelo de cuevas vírgenes, así como el aislamiento de novedosas sustancias con propiedades anticongelantes a partir de cepas aisladas de los Andes del Perú y Bolivia, donde el medio ambiente experimenta cambios extremos de temperatura (congelación-descongelación) del día a la noche y los microorganismos productores de amilasas con potencial industrial, los cuales han sido aislados a partir de desperdicios de plantas de tratamiento de residuos de papas y frutas.¹¹

¿Qué se entiende por enriquecimiento y métodos de aislamiento del microorganismo blanco?

Es el proceso mediante el cual se suministra un medio ambiente adecuado para el crecimiento y la reproducción de un microorganismo específico mientras que es inhibidor o letal para los microorganismos no seleccionados.^{11,14}

Es muy frecuente el uso de compuestos particulares como única fuente de carbono buscando la utilización y degradación de tales compuestos. La manipulación del pH resulta muy útil, tal es el caso de los organismos capaces de crecer a pH elevado (< 10) para el aislamiento de bacterias alcalofílicas, condiciones en que los microorganismos capaces de producir enzimas activas tienen un gran potencial industrial en la formulación de detergentes para el lavado, la producción de papel y pulpa y el procesamiento de los alimentos.

La temperatura también puede ser manipulada para el aislamiento de psicrófilos y termófilos. Las enzimas que son estables y activas a temperaturas extremas tienen una gran demanda en diversos procesos industriales (procesamiento de frutas, vegetales, almidón), e incluso en la Biotecnología donde la Taq polimerasa, ha permitido la automatización de la técnica del PCR.⁹ Estos detalles revelan la importancia que tiene la comprensión de los mecanismos fisiológicos que operan en estos microorganismos y cómo el avance del conocimiento en el área de la fisiología microbiana es vital para el mejoramiento futuro y el éxito de la aplicación de las técnicas de enriquecimiento y aislamiento.

La conservación de los microorganismos y la fermentación son pa-

sos muy importantes en este tipo de programas.

Una vez aislados, los cultivos microbianos tienen que ser conservados, cualquier actividad observada en la prueba inicial, tiene que ser reproducida en las subsecuentes fermentaciones, a menudo semanas o meses más tarde. Se pueden preservar por liofilización o por congelación a -70 °C en glicerol 2 a 30 % u otro medio líquido.

Para el próximo paso es muy importante tener en cuenta que la diversidad de metabolitos y su producción están en función de las capacidades biosintéticas del microorganismo y de las condiciones de fermentación que permitirán la expresión de sus capacidades.

Usualmente las rutas biosintéticas para la producción de estas moléculas son activadas en la fase logarítmica tardía a la estacionaria de crecimiento del cultivo, después que ha ocurrido la división celular y cesó la acumulación de biomasa. El tiempo necesario para la aparición de estos metabolitos en el medio de fermentación puede ser reducido creciendo primeramente al organismo en un medio semilla que ha sido optimizado para promover su crecimiento celular. Una vez que ha crecido en este medio, el inóculo es transferido al de producción. Estos difieren en las fuentes de carbono, de nitrógeno y otros componentes que promueven la producción de diferentes metabolitos y pueden rotarse para promover su diversidad.¹⁷⁻²⁰ Numerosos parámetros de la fermentación tales como temperatura, pH y aereación pueden influir en la diversidad y productividad del metabolito.

Hay una gran contradicción en este punto acerca de qué resulta más factible, si viajar hasta el fin del mundo y traer microorganismos exóticos o usar una pequeña cantidad de microorganismos a fermentar provenientes de fuentes convencionales y fermentarlos en una gran variedad de medios bajo diferentes condiciones. En este aspecto no existe un consenso y cada laboratorio se ajusta a sus capacidades de fermentación y recursos.

La preparación de las muestras de fermentación para el tamizaje es un procedimiento muy sencillo. Aquí se considera el método óptimo para capturar los metabolitos secundarios.

El metabolito de interés puede ser secretado al exterior o permanecer intracelular. Para su extracción

pueden utilizarse diferentes métodos, los cuales no deben interferir en el ensayo posterior, ellos dependen del número de muestras a procesar y del tipo de análisis a realizar posteriormente.

Métodos

- Calentamiento del caldo total (puede inactivar metabolitos lábiles al calor).

- Filtración del sobrenadante a través de un filtro de exclusión de elevado peso molecular con subsecuente liofilización del filtrado

- Extracción del caldo-micelio o sobrenadante con disolventes orgánicos de diferentes polaridades tales, como metanol, acetato de etilo, etc., seguida de evaporación a secado.

- Mezclar caldo con resina de poliestireno. Se lava con agua, se eluye con metanol o acetona y se evapora hasta sequedad

Aquí resulta muy importante determinar la cantidad de extracto a ser ensayada, ya que la selección de su concentración es un compromiso entre tener suficiente extracto para detectar los compuestos (sensibilidad del ensayo) y el efecto de la elevada concentración de extracto en la desviación estándar del ensayo.

El tamizaje de actividad biológica o tamizaje primario no es más que el conjunto de ensayos que se realiza para encontrar una actividad en particular dentro de una amplia población de microorganismos, en que los aspectos: sencillez, bajo costo, especificidad y velocidad desempeñan un papel importantísimo y determinan el éxito o el fracaso del proceso.

Los ensayos que se realizan en este proceso generalmente son indirectos y consisten en detecciones enzimáticas acopladas o no a una reacción colorimétrica o fluorimétrica.

Frecuentemente se utilizan placas de agar donde el compuesto de interés se incluye en el medio de cultivo, por ejemplo, caseína, o almidón, y se buscan las zonas hidrolíticas para detectar producción de enzimas microbianas del tipo proteasas o amilasas.

También se emplean los bioensayos para la selección de microorganismos con actividad antibiótica y antitumoral. Estos ensayos son dirigidos a diferentes "blancos" de la célula como la síntesis de la pared celular y la actividad metabólica o biosintética. Un ejemplo de modelo específico dirigido a la primera, lo constituye el empleo de un receptor

mimético de la pared celular bacteriana (diacetil-L-lisil-D-alanil-D-alanina) para detectar antibióticos glicopéptidos con una gran eficiencia. Empleando este sistema se detectaron nuevos compuestos a una proporción de 1 por cada 320 microorganismos ensayados en relación con el estimado usual de 10 000 a 100 000 para encontrar un nuevo compuesto.¹¹

Existen novedosos sistemas de tamizaje para la detección de actividades antibacterianas, antitumorales y antifúngicas. Los estudios antibacterianos incluyen organismos mutantes supersensibles a grupos específicos o microorganismos modificados genéticamente con genes reporteros como el gen β -gal o los genes lux que se expresan ante la activación de un determinado "blanco" al cual están fusionados o bajo una situación de estrés para la bacteria. Por ejemplo, para el tamizaje de antitumorales se diseñó un ensayo donde en presencia del compuesto se produce la inducción de un profago y por tanto, de bioluminiscencia en un mutante "dim" de *Photobacterium leiognath*.¹¹

Los ensayos para antifúngicos incluyen desde la inhibición de la quitina, la manano y la β -glucano sintasas, hasta la inducción de alteraciones morfológicas y la inhibición de la formación de la pared celular con modelos clásicos como en el mutante osmótico-1 de *Neurospora crassa*.

Se han diseñado bioensayos para la búsqueda de insecticidas naturales en los que se combinan la actividad antibiótica e insecticida para eliminar la detección de agentes antimicrobianos conocidos y tóxicos, los cuales tienen actividad insecticida. Otro tanto sucede con los biosurfactantes cuyo modelo se basa en la capacidad de estos compuestos de lisar los hematíes en placas de agar sangre.

Ensayos que comúnmente se realizan para la detección de actividad, compuestos antimicrobianos y antitumorales

Clásicos: Ensayos con cepas supersensibles o superresistentes; ensayos con sistemas de fagos.

De actividad biológica no relacionados con la inhibición del crecimiento: Ensayos para detectar alteraciones morfológicas; inhibición de la quimiotaxis.

De sistemas libres de células: Sistema de detección *in vitro* de inhibición de enzimas "blanco"

Químicos: TLC, HPLC, isótopos radioactivos

El tamizaje secundario es un proceso vital en la selección de microorganismos importantes para la industria. Durante esta etapa se deben eliminar rápidamente los falsos negativos y positivos antes de que se realicen grandes esfuerzos en la optimización de la producción y el escalado.

En esta etapa la analítica tiene un gran impacto, los que se caracterizan por su gran sensibilidad, rapidez y selectividad. Se utilizan ampliamente técnicas tales como: cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), cromatografía gaseosa (GC), espectrometría de masas, espectrometría de resonancia magnética nuclear (RMN), las cuales permiten una detección muy sensible, rápida y selectiva de los productos metabólicos. Por ejemplo, el uso de la HPLC acoplada a arreglo de fotodiodo es una práctica común para evaluar la presencia de más de un compuesto.

Por último, se tiene el desarrollo del producto unido a la optimización de su producción, el escalado y la producción como tal.

A modo de ejemplo podemos citar un antibiótico antibacteriano de origen natural y de gran importancia en la actualidad: la tienamicina. Es el más potente de todos los antibióticos de amplio espectro conocidos hasta el día de hoy. Aunque es un β -lactámico no es miembro del grupo de las penicilinas y cefalosporinas, es un carbapenem. Es activo contra bacterias aerobias y anaerobias, Gram positivos y Gram negativos incluyendo *Pseudomonas*. Esta nueva estructura fue aislada por esfuerzos cooperativos entre científicos de la compañía Merck Sharp & Dohme (Research Laboratories) en los EUA y de la Compañía Española de la Penicilina y Antibióticos (CEPA) en España, a partir de una nueva especie del suelo que recibió el nombre de *Streptomyces cattleya* (1976). Este cultivo también produce penicilina N y cefamicina C. A pesar del bajo nivel de producción de tienamicina y de la inestabilidad de la molécula, la estructura fue elucidada en 1976.^{11,14}

Las principales diferencias entre este antibiótico y los β -lactámicos convencionales es la posesión de un átomo de carbono en lugar del azufre en el anillo unido al anillo β -lactámico y la configuración trans del átomo de hidrógeno del anillo β -lactámico. Además de su amplio espectro y gran potencia, la molécula

posee resistencia a β -lactamasas plasmídicas y cromosomales y tiene actividad contra patógenos resistentes a penicilinas, cefalosporinas y otras drogas como los aminoglicósidos. Su inestabilidad química es debido a una reacción de autodestrucción (el anillo de una molécula de tienamicina es destruida vía aminólisis por el grupo amina de la segunda molécula de tienamicina). Para eliminar este problema, los científicos de la Merck crearon una molécula semisintética: el imipenem, adicionando un grupo formimidolil a la cadena lateral, obteniéndose un antibiótico no sólo más estable, sino también, diez veces mucho más activo. Su mecanismo de acción es la inhibición de la síntesis de la pared celular a nivel de las transpeptidasas y es bactericida.

Se encontró que el imipenem en humanos era metabolizado por una enzima del riñón: la dehidropeptidasa-I renal, la cual actúa como una β -lactamasa. Ya que esta enzima parece no tener un papel esencial en el metabolismo humano, los científicos de la Merck desarrollaron un inhibidor competitivo sintético, la cilastatina, la cual es usada en combinación con el imipenem para comercializarlo como primaxin o tienam, antibiótico que fue introducido en la práctica médica en 1985 (nueve años después de ser descubierto).

Este antibiótico tiene un carácter único en cuanto a su actividad. Es capaz de atravesar muy bien la membrana externa de las bacterias Gram negativas a través de los canales porinas a una velocidad 10 a 20 veces mayor que los clásicos no es destruido por las β -lactamasas del espacio periplásmico; se une e inhibe todas las PBP, pero es principalmente activo contra la PBP-2 y la PBP-1b más que la PBP-3, la cual es atacada fundamentalmente por las penicilinas y cefalosporinas convencionales. Ante las propiedades inigualables de este antibiótico cabe preguntarse, ¿si la tienamicina es tan potente, por qué tomó unos 25 años de tamizaje para ser descubierta?

Hoy se conoce que los carbapenems no son raros, muchos miembros de esta familia han sido aislados en los laboratorios en todas partes del mundo, aunque no resultan iguales en actividad y espectro. La respuesta probablemente sea el bajo nivel de producción de la cepa salvaje y su inestabilidad. Los procedimientos de tamizaje convencionales evidentemente perdieron su activi-

dad y sólo después del desarrollo de procedimientos de ensayos sensibles y específicos pudo ser encontrada. La tienamicina fue descubierta por un procedimiento de tamizaje muy sensible cuyo modo de acción aún no ha sido revelado.

ESTRATEGIAS GENERALES QUE PERMITIRAN EL AISLAMIENTO DE NUEVOS PRODUCTOS

Entre las estrategias generales que permitirán el aislamiento de nuevos productos se tiene:

- Empleo de nuevas cepas y géneros de microorganismos.
- Utilización de modelos de tamizaje dirigidos a blancos específicos, como por ejemplo los llamados blancos no clásicos de la célula:
 - Permeabilización de las barreras a los agentes antimicrobianos.
 - Las enzimas que provocan la inactivación antimicrobiana.
 - Los procesos de secreción de proteínas a través de la membrana citoplasmática.
 - La formación de factores de virulencia.
 - Las superficies de adhesión.
 - La transferencia de plasmidios de resistencia.
- Empleo de modelos dirigidos contra agentes activos farmacológicamente que afectan "blancos" no microbianos de importancia en patologías humanas.
- Introducción de tamizajes inversos o químico.

TAMIZAJE QUÍMICO

El tamizaje químico es el proceso de selección e indentificación de nuevos metabolitos para su posterior estudio de actividad biológica de acuerdo con su estructura química, en el que lo inusual o novedoso en la estructura es lo primario y lo secundario, la actividad biológica.^{8,11,14,16,21,22}

Ventajas

- Probabilidad de encontrar un elevado número de nuevas estructuras químicas debido a la gran cantidad de metabolitos secundarios que son capaces de producir los microorganismos, aún cuando la estructura no tenga actividad biológica.
- Reducción al mínimo de interferencias y falsos negativos

Desventajas

- Se requiere de mucho material para la realización de los ensayos
- La selección de manchas en los cromatogramas resulta engorrosa

y no se tienen criterios sólidos para la selección de una muestra. Este método ha sido desarrollado fundamentalmente por Japón y Alemania y no ha tenido mucha aceptación en el resto del mundo.

¿CÓMO ES EL DESARROLLO DE UN NUEVO ANTIBIÓTICO?

Desde el descubrimiento de un nuevo antibiótico hasta su puesta en el mercado, transcurren aproximadamente unos 10 años. Un año consumen los estudios preclínicos, mientras que los estudios clínicos fase I consumen otro, que sumado a dos años de la fase II y tres años de la fase III, cuya culminación comienza con la nueva aplicación de la droga al cabo de los siete años. Posteriormente, la FDA (Federation Drugs Administration) en un período de dos años, debe hacer una revisión exhaustiva de todo el proceso de validación y producción del medicamento, así como de las instalaciones donde será acometido el proceso de producción. Por lo tanto, sólo al cabo de los 9 a 10 años podrá realizarse el lanzamiento del producto.

Con estos datos se puede suponer cuán importante es acelerar el proceso desde el descubrimiento de un nuevo compuesto hasta su introducción en la clínica, mucho más si se tiene en cuenta la velocidad con que se ha desarrollado la resistencia a antibióticos en las bacterias, pues prácticamente al cabo de unos 5 años de uso masivo de un antimicrobiano, ya el 50 % de las cepas circulantes resultan resistentes a él.

POTENCIAL, FUTURO Y NECESIDADES DE LOS PROGRAMAS DE TAMIZAJE

Hasta este momento, la ingeniería genética y de proteínas ha influido mucho en el desarrollo de la microbiología industrial a nivel de optimización del producto. No obstante, el progreso increíble alcanzado en estas áreas no ha tenido el mismo efecto en los programas de tamizaje. Se espera que con las nuevas tecnologías disponibles y el desarrollo acelerado de proyectos de estudio del genoma de diversos microorganismos, se podrá conocer con precisión la estructura de los nuevos "blancos terapéuticos" en los microorganismos causantes de las patologías más importantes en el hombre, así como el total conocimiento de las rutas biosintéticas de los antibióticos de origen natural de mayor interés. Esto hará posible el diseño de nuevos programas de tamizaje diri-

gidos a compuestos con un mecanismo de acción específico o el total diseño de un nuevo antibiótico por manipulación genética de rutas biosintéticas de compuestos conocidos. En este caso, se han dado grandes pasos en el campo de los poliquétidos y antitumorales.^{15,27-34}

Técnicas que pueden ser muy útiles para el tamizaje son la hibridización de colonias para detectar secuencias de ADN específicas para rutas catabólicas de importancia. Tamizajes similares basados en hibridización de ADN extraídos de muestras del medio ambiente (*dot blot*) pueden ser usados para buscar microorganismos con secuencias de ADN específicas. La aplicación de técnicas del PCR (*Polymerase Chain Reaction*) deberá incrementar su sensibilidad en el futuro.¹⁵⁻²⁵ Ha sido empleado ampliamente el PCR para el estudio de poblaciones de microorganismos *in situ* con fines ecológicos y se han logrado amplificar directamente del suelo secuencias de genes desconocidas pertenecientes a grupos microbianos que no son cultivables. La puesta a punto de esta técnica en combinación con la secuenciación automatizada, sin dudas permitirá en el futuro caracterizar la población presente en cada suelo y evaluar su potencial como fuente de microorganismos novedosos. También podría permitir el aislamiento de *clusters* de genes de interés y su clonaje en hospederos ya caracterizados para la producción de nuevos compuestos sin la necesidad del cultivo.

El potencial del tamizaje microbiano para la obtención de productos industriales recae en la gran diversidad microbiana de la Tierra y la iniciativa del investigador. Los microorganismos están ahí, se deben desarrollar técnicas para seleccionarlos y aislarlos. El gran impedimento para esto, lo constituye la falta de programas de investigación dedicados al desarrollo de técnicas de tamizaje.⁶ Este es un problema multidisciplinario y su solución está en la cooperación de muchas disciplinas: químicos, ingenieros, bioquímicos y microbiólogos.

CONCLUSIONES

Las experiencias discutidas permiten asumir que sólo se conoce una pequeña parte del espectro de los metabolitos secundarios producidos por microorganismos. Si se suma a esto el potencial que brinda la tremenda diversidad de microorganismos que existe sobre la tierra, se

podría concluir que del esfuerzo que realicen los científicos en este campo por desarrollar nuevas técnicas de aislamiento y selección, dependerán

los nuevos productos del metabolismo secundario que serán descritos en el futuro, pues la fantasía de la naturaleza es ilimitada.³⁵

The microorganism is *always right*
your friend
a sensitive partner.

There are no stupid microorganisms.
Microorganisms

	<i>smarter</i>		<i>chemists</i>
are	<i>wiser</i>	than	<i>engineers</i>
	<i>more energetic</i>		<i>others.</i>

If you take care of your microbial friends, they will take care of your future (and you will live happily ever after . . .

BIBLIOGRAFIA

- Demain A.L. The New Biology: Opportunities for the fermentation industry. Chapter 7, Vol. 4 In: Annual Reports on Fermentation Processes. Academic Press, London, 193-208. 1980.
- Piret J.M. and Demain A.L. Actinomycetes in Biotechnology: An Overview Academic Press, London. 461-480, 1988.
- Gootz T.D. Discovery and Development of new Antimicrobial Agents. **Clinical Microbiology Reviews**, 3, 13, 1990.
- Zahner H. *et al.* Ways to new metabolites from Actinomycetes. *Biology of Actinomycetes* '88, I, 171, 1988.
- Demain A.L. Functions of Secondary Metabolites. In: Genetics and Molecular Biology of Industrial Microorganisms. Edited by: C.L. Hershberger, S.W. Queener and G. Hegeman. American Society for Microbiology. Washington, DC 20005. 1-11, 1989.
- Egorov N.S., Baranova I.P. Bacteriocins. Production, properties, application. *Antibiotika. Khimioteraki*, 44, 33, 1999.
- De Schrijver A., De Mot R. Degradation of pesticides by actinomycetes. **Critical Review in Microbiology**, 25, 85, 1999.
- Brown A.G. Recent examples of novel secondary metabolites. **Folia Microbiologica**, 40, 31, 1995.
- Vandamme E.J. The search for novel microbial fine chemicals, agrochemicals and biopharmaceuticals. **Journal of Biotechnology**, 37, 89, 1994.
- Sanglier J.J., Haag H., Huck T.A., Fehr T. Novel bioactive compounds from Actinomycetes: a short review (1988-1992). **Research in Microbiology**, 144, 633, 1993.
- Steele D.B. Techniques for selection of industrially important microorganisms. **Annual Review Microbiology**, 45, 89, 1991.
- Szabo G., Biro S., Goodfellow M. Control of Secondary Metabolism in Actinomycetes. Ed. A.L. Demain. In: Sixth Int. Symp. On Actinomycetes Biology, 215-225, 1985.
- Franco C.M., Coutinho L.E. Detection of novel secondary metabolites. **Critical Review in Biotechnology**, 11, 193, 1991.
- Yarbrough G.G., Taylor D.P., Rowlands R.T., Crawford M.S. and Lasure L.L. Screening microbial metabolites for new drugs-theoretical and practical issues. **The Journal of Antibiotics**, 46, 535, 1993.
- Baker J.T. *et al.* Natural Product Drug discovery and Development: New Perspectives on International collaboration. **Journal of Natural Products**, 58, 1325, 1995.
- Schmid M.B. Novel approaches to the discovery of antimicrobial agents. **Current Opinion Chemistry Biol.**, 2, 529, 1998.
- Hopwood D. Towards an understanding of gene switching in Streptomyces, the basis of sporulation and antibiotic production. Proceedings Royal Society London, B. 235, 121, 1988.
- Drew S.W. and Demain A.L. Effect of primary metabolites on secondary metabolism. **Annual Review Microbiology**, 3, 343, 1977.
- Vining L.C. Functions of Secondary Metabolites. **Annual Review Microbiology**, 44, 395, 1990.
- Maplestone R.A., Martin J.S. and Williams D.H. The evolutionary role of secondary metabolites- a review. **Gene**, 115, 151, 1992.
- Rohr J. and Zeeck A. Biogenetic-chemical classification of secondary metabolites produced by fermentation. In: Research and Development. Ed. Dr. J. Rohr and Prof. Dr. A. Zeeck. Germany, 251-282, 1988.
- Vining L.C. Secondary metabolism, inventive evolution and biochemical diversity-a review. **Gene**, 115, 135, 1992.
- Parry C.M. Untreatable infections. The challenge of the 21st Century. Southeast Asian. **Journal of Tropical and Medical Public Health**, 29, 416, 1998.
- Wise R. The development of new antimicrobial agents. **British Medical Journal**, 317, 643, 1998.
- Setti E.L., *et al.* New trends in antimicrobial development. **Current Medical Chemistry**, 5, 101, 1998.
- Moellering R.C. Antibiotic resistance: lessons for the future. **Clinical Infectious Diseases**, Suppl. 1. S 135, 1998.
- Chand S., Lusundi I., Veal D.A., Williams L.R. and Karuso P. Rapid screening of the antimicrobial activity of extracts and natural products. **The Journal of Antibiotics**, 47, 1295, 1994.
- Spizek J. and Tichy P. Some aspects of overproduction of secondary metabolites. **Folia Microbiologica**, 40, 43, 1995.
- Norman P. New GEN Section: Drug Discovery. **Genetic Engineering News**, 17, 35, 1997.
- Bryskier A. Novelities in the field of anti-infectives in 1997. **Clinical Infectious Diseases**, 27, 865, 1998.
- Duncan K. The impact of genomics on the search for novel tuberculosis drugs. Novartis Found Symposium, 217, 228, 1998.
- Huygen K. DNA vaccines: applications to tuberculosis. **International Journal of Tuberculosis and Lung Diseases**, 2, 971, 1998.
- Salas J.A., Mendez C. Genetic Manipulation of antitumor agent biosynthesis to produce novel drugs. **Trends in Biotechnology**, 16, 475, 1998.
- Lal R. *et al.* Engineering antibiotics producers to overcome the limitations of classical strains improvements programs. **Critical Reviews in Microbiology**, 22, 201, 1996.
- Perlman D. 1979. Laws in Applied Microbiology. **Biotechnology and Bioengineering**, 22, Suppl. 1, 1-3. 1980.