

# AISLAMIENTO Y SELECCION DE CEPAS DE ACTINOMICETOS PRODUCTORAS DE INHIBIDORES DE $\beta$ -LACTAMASAS Y ANTIBIOTICOS $\beta$ -LACTAMICOS

Y. Iznaga, A. Niebla, I. González, M. Lemus y C. Vallín.

Centro de Química Farmacéutica, Departamento de Biotecnología, Calle 200 y Avenida 21 Atabey, Apartado Postal 6990, Playa, Ciudad de La Habana, Cuba.

Recibido: 18 de julio de 1996.

**RESUMEN.** Se llevó a cabo el aislamiento y la selección de bacterias pertenecientes al orden *Actinomycetales* productoras de compuestos con actividad inhibidora de las  $\beta$ -lactamasas y antibióticos  $\beta$ -lactámicos. Para el aislamiento de estos microorganismos, se emplearon tres medios de cultivo y métodos descritos en el Proyecto Internacional de *Streptomyces* y para el ensayo de la actividad antibiótica, se siguieron los lineamientos descritos en las guías NCCLS92. Como organismos indicadores de la actividad antibiótica, se empleó un grupo de bacterias patógenas portadoras de las enzimas  $\beta$ -lactamasas de mayor importancia en clínica. Se emplearon tres ensayos complementarios para la eliminación de compuestos no deseados pertenecientes a otras familias de antibióticos (macrólidos, aminoglucoósidos y antitumorales). La presencia del anillo  $\beta$ -lactámico fue determinada mediante cromatografía en capa fina y ensayos de autobiografía. De 273 cepas de actinomicetos aislados, cuatro resultaron productoras de sustancias de interés, dos cepas posibles productoras de metabolitos inhibidores de  $\beta$ -lactamasa tipo TEM y dos posibles productoras de antibióticos  $\beta$ -lactámicos que a su vez, manifiestan actividad inhibidora de  $\beta$ -lactamasas del tipo TEM y metalo $\beta$ -lactamasas.

**ABSTRACT.** The isolation and selection of bacteria belonging to the *Actinomycetales* order that produce compounds with inhibitory activity of  $\beta$ -lactamasas and  $\beta$ -lactams antibiotics was carry out. The culture media and methods from the International *Streptomyces* Project were used for the isolation of these microorganisms and the antibiotic activity assay was performed according to NCCLS92 guidelines. A group of pathogenic bacteria that carry the  $\beta$ -lactamasas enzymes of major importance in clinics was used as markers of the antibiotic activity. Three complementary assays to eliminate compounds of other families of antibiotics (macrolides, aminoglucoosydes and antitumorals) were used. The presence of the  $\beta$ -lactam ring was determined by thin layer chromatography and autobiography. Many strains of actinomycetes were isolated (273) but only four were producers of interesting substances; two were potential inhibitors of TEM  $\beta$ -lactamase and two were potential  $\beta$ -lactamic antibiotics that also had inhibitory activity against TEM  $\beta$ -lactamasas and metallo  $\beta$ -lactamasas.

## INTRODUCCION

En la búsqueda de nuevos medicamentos a partir de fuentes naturales los microorganismos pertenecientes al orden *Actinomycetales* han sido los de mayor utilidad.<sup>1-3</sup> Dentro de ellos, el género *Streptomyces* es el más importante como productor de antibióticos.<sup>4,5</sup> Por otra parte, los compuestos  $\beta$ -lactámicos constituyen el grupo de antibióticos más ampliamente usado. Las enzimas  $\beta$ -lactamasas son el mecanismo principal de resistencia entre las bacterias frente a este grupo de antibióticos,<sup>6-8</sup> las cuales hidrolizan el puente amido en el anillo  $\beta$ -lactámico<sup>9,10</sup> que es el responsable de la actividad antibiótica de estos compuestos.<sup>11,12</sup>

Un gran número de inhibidores de las  $\beta$ -lactamasas ha sido reportado. La mayoría pertenece a la familia de los antibióticos  $\beta$ -lactámicos, algunos de ellos con muy poca actividad como antibióticos, pero muy buenos potenciadores de otros miembros de la familia, como el ácido clavulánico.<sup>13-15</sup>

La ineficacia de los antibióticos  $\beta$ -lactámicos ya existentes y la presencia cada vez mayor de  $\beta$ -lactamasas en aislados clínicos ha impulsado la búsqueda de nuevos antibióticos resistentes a estas enzimas, así como de sustancias inhibidoras de su acción. Sobre esta base, se realizó una búsqueda preliminar de compuestos pertenecientes a dicha familia que presentaran actividad antibiótica e inhibidora de las  $\beta$ -lactamasas, empleando como fuente microbiana actinomicetos presentes en muestras de suelos de Cuba.

## MATERIALES Y METODOS

Para el proceso de aislamiento se emplearon cinco muestras de tierra de Ciudad de La Habana procedentes de cultivos de yuca, café, boniato y plátano.

Como control positivo durante todo el proceso se empleó la cepa 134 (*Streptomyces clavuligerus*). En los diferentes ensayos se utilizaron las bacterias 11 (*Bacillus subtilis*), 66 (*Escherichia coli*), 72 (*Escherichia coli*), 94 (*Escherichia coli*), 95 (*Escherichia coli*), 118 (*Staphylococcus aureus*), 139 (*Stenotrophomonas maltophilia*) y 140 (*Escherichia coli*) (Tabla I).

### Aislamiento de las cepas de actinomicetos a partir de muestras de suelos

Se siguió la metodología descrita en el Proyecto Internacional de *Streptomyces* (PIS).<sup>16</sup>

Los medios de cultivo empleados fueron: agar KW, agar avena, agar MMN y agar CG.<sup>16</sup> La selección de las cepas se basó en criterios morfológico-culturales y observaciones al microscopio óptico.<sup>16</sup>

Cada cepa aislada fue sembrada en los medios agar ISP-2 e ISP-4 y registradas sus características principales.<sup>16</sup>

Las cepas aisladas fueron conservadas en glicerol al 20% y almacenadas a -70 °C.<sup>16</sup>

### Fermentación de las cepas de actinomicetos

Se inocularon 0,1 mL de la suspensión de esporas de cada cepa en erlenmeyers que contenían 20mL del medio

MIA (2,5 % almidón, 0,25 % extracto de carne, 0,4 % triptona, 0,5 % harina de soya, 0,2 % glucosa, 0,3 % extracto de levadura, 0,5 % CaCO<sub>3</sub>) a justadoap H7<sup>16</sup>, incubándose durante 48 h a 28 °C y 200 r/min de agitación.

**TABLA I**  
**Características de las cepas empleadas en los diferentes ensayos\***

No.	Cepa	Origen	β-lactamasas	Plasmidio/cromosoma	Características
11	<i>Bacillus subtilis</i> 6633	ATCC	—	—	Super-sensible a antibióticos.
66	<i>E. coli</i> J53-2	Dr. George Jacoby, USA	TEM-5 (tipo serina inducible)	Plasmidio pCFF14	Resistente a β-lactámicos.
72	<i>E. coli</i> J53-2	Dr. George Jacoby, USA	SHV-5 (tipo serina inducible)	Plasmidio pAFF2	Muy resistente a β-lactámicos y a aminoglucósidos.
94	<i>E. coli</i> K-12 GM 1104	E. Power, UK	—	Cromosomal	Tiene fusión gen lacZ-gen umuC (S.O.S.).
95	<i>E. coli</i> K-12 GC 4415	E. Power, UK	—	Cromosomal	No tiene fusión gen lacZ-gen umuC.
118	<i>S. aureus</i>	Aislado clínico	—	—	Porta una metilasa inducible por eritromicina que confiere resistencia a macrólidos.
134	<i>S. clavuligerus</i>	NRRL 3585	—	—	Productor de ácido clavulánico.
139	<i>S. maltophilia</i>	Dr. Ian Chopra, UK	Metaloenzima (inducible)	Cromosomal	Resistente a carbapenemas y a ácido clavulánico.
140	<i>E. coli</i> C600	Antone A. Medeiros, USA	MIR-1 (inducible)	Plasmidio R 96 D PMLC 28	Resistente a ácido clavulánico ya β-lactámicos.

\* Se muestra, en los casos debidos, si la resistencia que confieren es plasmídica o cromosomal.

Posteriormente, se transfirieron 0,2 mL del medio MIA crecido a erlenmeyers que contenían 20mL del medio MPA (4,7 % almidón, 3,0 % Farmamedia, 0,01 % FeSO<sub>4</sub>, 0,01 % K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) a justadoap H7<sup>16</sup>, incubándose a 28 °C durante 60 h a 200 r/min de agitación. Después se centrifugó durante 5 min a 10 000 r/min y los sobrenadantes se emplearon para el ensayo de actividad antibiótica.

#### Ensayo de susceptibilidad antibiótica

El ensayo se realizó según las guías NCCLS,<sup>17</sup> utilizando como microorganismos indicadores a las bacterias: 11, 66, 72, 139 y 140 (Tabla I) y se empleó como medio de cultivo agar Mueller-Hinton<sup>18</sup>.

Para las cepas que portaron β-lactamasas se realizó además, el ensayo en el medio agar Mueller-Hinton<sup>18</sup> + a micopilina (10 µg/mL) para favorecer la inducción de la enzima.

Sobre las placas Petri se colocaron discos de papel de filtro (Whatman #3) estériles de 6 mm de diámetro, a los cuales se les añadieron 25 µL de los sobrenadantes, se dejó difundir durante una hora a temperatura ambiente y se incubó posteriormente durante 18 a 24 h. Finalmente, se realizaron las mediciones de los halos de inhibición.

#### Ensayo de termoestabilidad en medio ácido

Se empleó para determinar la posible presencia de antibióticos aminoglucósidos, estreptotricinas y poliéteres ionóforos por su estabilidad bajo estas condiciones.<sup>19</sup>

Muestras de 500 µL de cada sobrenadante fueron ajustadas a pH 3 con HCl 0,1 mol/L, sometiéndolos a 121 °C durante una hora en autoclave. Después, se ajustó el pH a 7 y

se determinó la actividad biológica frente a las bacterias sensibles al caldo original.

#### Determinación de la presencia de antibióticos macrólidos

Sobre las placas de medio agar Mueller-Hinton<sup>18</sup> inoculadas con *Staphylococcus aureus* (118) (Tabla I), se colocaron discos de eritromicina (15 µg) (OXOID) y se incubaron durante 30 min a 37 °C. Discos de papel de filtro Whatman #3 impregnados con los caldos de fermentación fueron situados cerca del disco de eritromicina. Posteriormente se incubó de 18 a 24 h a 37 °C.

Si el antibiótico es un macrólido, se aprecia un halo de inhibición cortado hacia el disco de eritromicina<sup>20</sup> pues es inactivado por la enzima.

Se empleó como control positivo un disco de oleandomicina (15 µg) (OXOID).

#### Determinación de la inducción del mecanismo S.O.S.

Se inocularon placas de agar de MacConkey<sup>18</sup> con las cepas *E. coli* K-12 94 y 95 (Tabla I), se colocaron los discos impregnados con los sobrenadantes y fueron incubadas de 18 a 24 h a 37 °C. Como antibiótico control positivo se utilizó un disco de 10 µg de norfloxacin (OXOID).

La cepa 94 es no fermentadora de la lactosa pero en presencia de compuestos que actúan a nivel del ADN se activa el mecanismo S.O.S. y la fermentación de aquella, observándose un halo de inhibición del crecimiento seguido de la formación de un anillo de color rojo<sup>21</sup> alrededor del disco de norfloxacin. La cepa 95 se empleó como control negativo.

### Ensayo de cromatografía en capa delgada

Se utilizaron como antibióticos β-lactámicos patrones: penicilina G y cefalosporina C (10 mg/mL) a los cuales se les realizó extracción 1:1 en acetato de etilo y se tomó la fase orgánica. A los sobrenadantes de los caldos de fermentación se les realizó también una extracción 1:1 con acetato de etilo. La fase orgánica se concentró en un evaporador rotatorio a 40 °C (volumen final: 1 mL).

Se empleó como fase móvil n-butanol-etanol-agua (4:1:5 v/v) y se utilizaron placas (5X10) cm de gel de sílice G activadas de un grosor de 0,5 mm sobre las que se puntuaron 500 µL de ambos patrones y una de las muestras para una longitud de corrida de 8,5 cm.

La técnica de desarrollo del cromatograma fue ascendente y se utilizó como reactivo revelador el reactivo de Ehrlich (300 mg de p-dimetilaminobenzaldehído en 9 mL de alcohol etílico, 54 mL de n-butanol y 9 mL de ácido clorhídrico concentrado). Manchas de color rosado confirmaron el carácter positivo del ensayo<sup>22</sup>.

### Autobiografía

Las placas de agar Mueller-Hinton inoculadas con las cepas 11 y 66 fueron cubiertas con el cromatograma en capa

delgada no revelado, el cual se retiró después de 15 min. Un tiempo de incubación de 24 h mostró crecimiento bacteriano excepto en las zonas donde difundió el antibiótico.

## RESULTADOS Y DISCUSION

Se aislaron 273 actinomicetos, de los cuales mostraron actividad 110 cepas (40,3 %). De ellas, fueron activas frente a *E. coli* 66 (TEM-5) 27 cepas (24,5 %), 9 (8,2 %) frente a *E. coli* 72 (SHV-5), 11 (10%) frente a *E. coli* 140 (MIR-1) y 11 (10 %) frente a *Stenotrophomonas maltophilia* (metaloβ-lactamasa).

De las cepas positivas sólo 32 (29,1 %) fueron de interés dentro del programa de búsqueda primario. Asimismo, se eliminaron las que sólo resultaron activas frente a microorganismos Gram-positivos y otras diez después de su caracterización taxonómica.

Las 32 cepas de interés fueron sometidas a un tamizaje secundario. Primeramente, se repitió el ensayo de susceptibilidad antibiótica con una nueva fermentación con vistas a confirmar resultados y después, a las cepas que con seguridad resultaron positivas, se les realizaron tres ensayos complementarios: capacidad de inducir el mecanismo S.O.S. por el metabolito, termoestabilidad a pH < 7 y detección de posibles antibióticos de la familia macrólidos (Tabla II).

**TABLA II**  
Resultados correspondientes al tamizaje secundario

Cepas positivas frente a:		
Inducción del mecanismo S.O.S.	Termoestabilidad a pH < 7	Detección de macrólidos
33, 242, 147, 201 y 328	1, 67, 33, 89, 92, 103, 242, 320, 147, 201 y 328	75, 267 y 108

Fueron descartados los caldos de fermentación que mostraron una inducción del mecanismo S.O.S., los cuales a su vez fueron termoestables a pH < 7, por ser posibles antitumorales. Tampoco se valoraron los que resultaron positivos en el ensayo para la detección de macrólidos y los que fueron termoestables a pH < 7 por ser posibles miembros de las familias de los aminoglucósidos, estreptotricinas, antracidinas y poliéteres ionóforos.

Cinco cepas resultaron negativas frente a los tres ensayos, una de las cuales correspondió a un *Streptomyces clavuligerus*, ya reportado como productor de ácido clavulánico<sup>14</sup>, quedando seleccionadas para estudios de profundización las cepas: 73, 77, 294 y 306, las cuales fueron parcialmente caracterizadas por ensayos químico-microbiológicos (Tablas III y IV).

**TABLA III**  
Perfiles de actividad obtenidos a partir de las cepas 73, 77, 294, 306 y 134 (actinomicetos)

Cepa	Bacterias empleadas en el ensayo							
	66	66 <sup>+</sup>	72	72 <sup>+</sup>	139	139 <sup>+</sup>	14014	0 <sup>+</sup>
	Halos de inhibición (mm)							
73	9	9	—	—	18	20—	—	—
77	11	14	—	—	—	—	—	—
294	—	8	—	—	—	—	—	—
306	—	13	—	—	—	—	—	—
134	—	17	—	22	—	—	—	—

+ Con ampicilina. — Cero actividad.

La cepa 134 correspondiente a *Streptomyces clavuligerus*, no mostró actividad antibiótica frente a las bacterias 139 y 140 que expresan enzimas resistentes al ácido clavulánico (Tabla III), pero sí frente a 66 y 72 siempre que estuvo presente en el medio el antibiótico. El ácido clavulánico presente en el caldo de fermentación actuó como inhibidor y potenciador de la ampicilina frente a las enzimas TEM-5 y SHV-5, que son susceptibles a la acción de inhibidores de esta familia.

La cepa productora del metabolito presente en el caldo 73 pertenece al género *Streptovercillium*. Dicho metabolito no fue activo frente a microorganismos Gram-positivos, pero sí frente a Gram-negativos. Este compuesto inhibió el crecimiento de la cepa 66 en presencia y ausencia de ampicilina por lo que es resistente a la enzima que expresa dicha cepa y por tanto, podría tener valor como antibiótico, no como inhibidor de esta. También mostró actividad frente a la cepa 139 en presen-

cia y ausencia de ampicilina, observándose con el inductor un ligero incremento del halo de inhibición, lo que indica una posible actividad como inhibidor de metaloenzimas. Estos resultados, unido a la termolabilidad del compuesto a

pH < 7, así como la correspondencia entre la mancha obtenida por cromatografía y el halo de inhibición en el ensayo autobiográfico (Tabla IV) indican la presencia de un posible antibiótico de la familia de los  $\beta$ -lactámicos.

**TABLA IV**  
**Resultados correspondientes a la cromatografía en capa delgada y a autobiografía**

Muestra aplicada	Cromatografía (capa delgada)		Autobiografía			
			Bacteria 11		Bacteria 66	
			Manchas	Rf	Halos	Distancia recorrida (cm)
73	1	0,94	—	—	1	8,0
77	1	0,24	—	—	1	2,0
	2	0,71	—	—	2	6,0
294	1	0,65	1	5,5	—	—
306	1	0,59	1	5,0	—	—
Pen G	1	0,59	1	5,0	—	—
Cef C	1	0,29	—	—	1	2,5

El caldo 77, obtenido a partir de un *Streptovercillium*, no es activo frente a microorganismos Gram-positivos, pero sí frente a Gram-negativos, muestra actividad frente a la cepa 66 con y sin antibiótico, aumentando el halo de inhibición en presencia de ampicilina por lo que es un posible antibiótico con actividad inhibidora de  $\beta$ -lactamasa tipo TEM. Esta sustancia resultó termolábil y se observaron dos halos de inhibición al realizar el ensayo autobiográfico, que al corresponderse con los resultados cromatográficos indican la presencia de dos compuestos probablemente pertenecientes a la misma familia.

Los compuestos pertenecientes a los caldos 294 y 306 fueron producidos por cepas de *Streptomyces*, siendo activos frente a microorganismos Gram-positivos. Mostraron además, actividad frente a la cepa 66, pero sólo en presencia de ampicilina, perfil característico de compuestos inhibidores de  $\beta$ -lactamasas del tipo TEM. Ambos compuestos fueron termolábiles y en el ensayo autobiográfico frente a la cepa 11 mostraron halos de inhibición que se correspondieron con las manchas obtenidas en la cromatografía en capa delgada, pero con diferencias en las distancias recorridas. Aunque ambas cepas de *Streptomyces* fueron aisladas a partir de la misma muestra de suelo, las características morfológicas y culturales descartan la posibilidad de que correspondan a una misma cepa.

La detección de actividad al realizar el ensayo autobiográfico constituye una evidencia más de la posible presencia de compuestos de la familia de los antibióticos  $\beta$ -lactámicos,<sup>18</sup> pues en todos los casos, dicha actividad fue encontrada en la fase del solvente orgánico empleado (acetato de etilo) el cual se consideraselectivo para estos antibióticos.<sup>22</sup>

### CONCLUSIONES

Se aislaron 273 cepas de actinomicetos, las cuales fueron caracterizadas parcialmente por métodos microbiológicos y químicos.

El modelo de tamizaje empleado permitió seleccionar cuatro cepas de actinomicetos posibles productoras de com-

puestos de la familia de los  $\beta$ -lactámicos: *Streptovercillium sp.* 73 (productor de un posible antibiótico/inhibidor resistente a  $\beta$ -lactamasa tipo TEM y metalo $\beta$ -lactamasas); *Streptovercillium sp.* 77 (productor de un posible antibiótico/inhibidor resistente a  $\beta$ -lactamasa tipo TEM) y *Streptomyces sp.* 294 y 306 (productores de un posible inhibidor de  $\beta$ -lactamasa tipo TEM).

### BIBLIOGRAFIA

- Jawetz E., Melnick L. y Adelberg E.A. En: Manual de Microbiología Médica. Novena edición, 31-127, 1985.
- Williams S.T. **Res. Microbiol.**, **144**, 653, 1993.
- Sangler J. J. **Res. Microbiol.**, **144**, 633, 1993.
- Marsh P. and Wellington E.M.H.XIV. O'Gara F., Dowling D.N. and Boesten B. Ed., 133-150. 1994.
- Goodfellow M. Numerical classification and identification of *Streptomyces* species - a review **Gene**, **115**, 225, 1992.
- Mitsuhashi S. **J. Int. Med. Res.**, **21**, 1, 1993.
- Davies J. **J. Gen. Microbiol.**, **138**, 1553, 1992.
- Dever L.A., Dermody T. S. **Arch. Intern. Med.**, **151**, 886, 1991.
- Medeiros A.A. **Ann. Intern. Medicin.**, **119**, 428, 1993.
- Payne D.J. **J. Med. Microbiol.**, **39**, 93, 1993.
- Cohen M.L. **Scienc.**, **257**, 1050, 1992.
- Lancini G. and Parenti F. In: **Antibiotics (An integrated view)**. 93-118, 172-174, 1982.
- Cole M. **Drug. Fut. VI**, **11**, 697, 1981.
- Brown A. G. **J. Antibiotic.**, **29**, 668, 1976.
- Requera J.A. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, **27**, 569, 1991.
- Gottlieb D. and Shirling E.B. **Int. J. Syst. Bacteriol.**, **17**, 315, 1967.
- National Committee for Clinical Laboratory Standards, (NCCLS). Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests. Fourth Edition. NCCLS document M2-A4 10(7) 1-28. 1992.
- The Manual OXOID. 6th Edition. England. Unipath Ltd. 2-162.1990.
- Etienne G. **J. Antibiotic.**, **44**, 1357, 1991.
- Mazzei T. **J. Antimicrob. Chemother.**, **31** (Suppl. C), 1, 1993.
- Power E. J.M. and Phillips I. **J. Med. Microbiol.**, **36**, 78, 1992.
- Cole M. United States Patent (Patent number: 4.525,353) Beecham group. England. 1-42, 1985.