



Revista CENIC. Ciencias Biológicas

ISSN: 0253-5688

editorial.cenic@cnic.edu.cu

Centro Nacional de Investigaciones Científicas  
Cuba

Rodríguez Valdés, Caridad; Sardiñas, Grisel Rosabal; Morales Pérez, Yurima; Vallín Plous, Carlos  
Evaluación de la capacidad de producción de antibióticos por la cepa *Streptomyces diastaticus*

SQF108 modificada genéticamente

Revista CENIC. Ciencias Biológicas, vol. 36, núm. 2, 2005, pp. 93-96

Centro Nacional de Investigaciones Científicas

Ciudad de La Habana, Cuba

Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=181220438005>

- Cómo citar el artículo
- Número completo
- Más información del artículo
- Página de la revista en redalyc.org

redalyc.org

Sistema de Información Científica

Red de Revistas Científicas de América Latina, el Caribe, España y Portugal

Proyecto académico sin fines de lucro, desarrollado bajo la iniciativa de acceso abierto

# Evaluación de la capacidad de producción de antibióticos por la cepa *Streptomyces diastaticus* SQF108 modificada genéticamente

Caridad Rodríguez Valdés, Grisel Rosabal Sardiñas, Yurima Morales Pérez y Carlos Vallín Plous.

Centro de Química Farmacéutica, Calle 200 esquina a Avenida 21, Reparto Atabey, Playa, Ciudad de La Habana, Apartado Postal 6414, Cuba.

Recibido: 28 de octubre de 2003. Aceptado: 26 de enero de 2004.

Palabras clave: *Streptomyces*, conjugación, antibióticos, actividad antifúngica.  
Key words: *Streptomyces*, conjugation, antibiotics, antifungal activity

**RESUMEN.** En el presente trabajo, se evaluó la capacidad productiva de la cepa *Streptomyces diastaticus* SQF108 modificada genéticamente. La cepa produce dos compuestos con marcada actividad antifúngica contra *Candidas* y hongos filamentosos: uno identificado como rimocidina y otro aun no reportado. Ambos compuestos son caracterizados como macrólidos poliénicos pertenecientes al grupo de los poliquétidos. Debido a la necesidad de obtener elevados rendimientos en la fermentación de ellos y además, mayor cantidad del no reportado, se modificó la cepa genéticamente mediante el proceso de la conjugación con el que se introdujo un plasmidio con potencialidades para activar rutas biosintéticas de compuestos poliquétidos. Además, se empleó un medio selectivo que favoreció la producción del compuesto no reportado. Para evaluar el comportamiento de la producción de los antibióticos, se realizó una cinética de fermentación en medio líquido, en análisis comparativo de las cepas exconjugantes con respecto a la cepa original. A los caldos obtenidos en la cinética de fermentación, se les realizaron ensayos microbiológicos de actividad antibiótica frente a *Bacillus subtilis* y antifúngica frente a *Aspergillus niger*. Los resultados evidenciaron un aumento notable de la producción de los metabolitos con actividad antifúngica en la cepa exconjugativa *S. diastaticus* SQF108/pRKT-1 a las 72 h con respecto a su producción en la cepa original y controles, lo cual permitió aumentar los niveles de producción mediante la modificación genética. Además, el medio ensayado resultó selectivo para el principio activo no reportado.

**ABSTRACT.** The capacity to produce antibiotics of *S. diastaticus* SQF108 genetically modified was evaluated in this work. The strain produces two compounds with a remarkable antifungal activity against *Candidas* and filamentous fungi: one of them identified as rimocidine and another one has not been reported yet. Both compounds have been characterized as polyenic macrolides belonging to polyketides group. Because of the necessity to obtain high amounts of both metabolites, the strain was modified by a conjugative plasmid able to activate the polyketides biosynthetic pathway. A selective medium has been tested in order to favor the production of the unidentified compound. In order to compare the behavior of antibiotic production between exconjugants and wild type strains a kinetic study was carried out. The antibiotic and antifungal susceptibility tests against *Bacillus subtilis* and *Aspergillus niger* were assayed with the fermentation broths taken at several intervals. An increase in the metabolites production with antifungal activity in the exconjugants strain *S. diastaticus* SQF108/pRKT-1 was demonstrated.

## INTRODUCCION

Los *Streptomyces* son bacterias filamentosas Gram positivas del suelo, que se diferencian morfológicamente por formar esporas.<sup>1</sup> Son importantes desde el punto de vista comercial porque producen más del 60 % de los antibióticos conocidos,<sup>2</sup> por lo que han sido objeto de numerosos estudios para mejorar su productividad. La aplicación en *Streptomyces* de técnicas moleculares avanzadas se ha incrementado rápidamente en las últimas décadas, trayendo consigo un mejor conocimiento, control y manipulación de este género.<sup>3</sup>

Generalmente, los *Streptomyces* presentan la limitación de poseer un potente sistema de restricción, esto se convierte en una barrera efectiva para la introducción de ADN procedente de otras fuentes. El uso de la técnica de conjugación para lograr introducir ADN foráneo y mantener un genotipo estable ha resultado un proceso efectivo.<sup>4</sup>

Como fruto de un programa desarrollado para la búsqueda de sustancias con actividad antibacteriana y antifúngica, se aisló una cepa de *Streptomyces* sp., la cual, fue identificada como *Streptomyces diastaticus*. Esta cepa produce dos compuestos con marcada actividad antifúngica contra *Candidas* y hongos filamentosos: uno identificado como rimocidina y otro aun no re-

poliénicos pertenecientes al grupo de los poliquétidos.<sup>5,6</sup>

Con el propósito de obtener elevados rendimientos en la fermentación de ambos compuestos y lograr mayores cantidades del principio activo aun no reportado, la cepa original fue modificada genéticamente, empleando la técnica de la conjugación. A través de esta técnica se introdujo un plasmidio con un fragmento de ADN clonado, activador de compuestos poliquétidos, con lo que se obtuvieron los correspondientes exconjugantes.

Se realizó una cinética de fermentación con la cepa original y los exconjugantes obtenidos para evaluar la producción de los antibióticos en medio líquido, a través de ensayos microbiológicos de actividad antibiótica frente a *Bacillus subtilis* y actividad antifúngica frente a *A. niger*.

Los resultados evidenciaron un aumento notable de la producción de los metabolitos con actividad antifúngica en la cepa conjugativa *S. diastaticus* SQF108/pRKT-1 a las 72 h con respecto a la producción de estos metabolitos en la cepa original.

## MATERIALES Y METODOS

### Material biológico y plasmidios

La Tabla 1 aporta el material biológico y los plasmidios empleados, así como el material obtenido en este trabajo.

### Medios de cultivo y métodos utilizados

#### Medios

Medio SYM<sup>9</sup> para la esporulación de la cepa SQF 108 y las diferentes exconjugantes.

Medios de producción: SYM líquido y II: sacarosa 2,0 %, glucosa 1 %, extracto de levadura 0,5 %, K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,05 %, MgCl<sub>2</sub> · 7H<sub>2</sub>O 1,0 % a pH 7,2.

Para la conjugación se empleó el medio MS,<sup>9</sup> LB para crecer la *E. coli*,<sup>10</sup> TSB para el aislamiento de ADN plasmídico de *Streptomyces* y para las pruebas microbiológicas de actividad antibacteriana y actividad antifúngica Agar Müller-Hinton MHA y Agar Sabouraux MSA respectivamente, suministradas por Centro de Biopreparados, Ciudad de La Habana.

#### Métodos

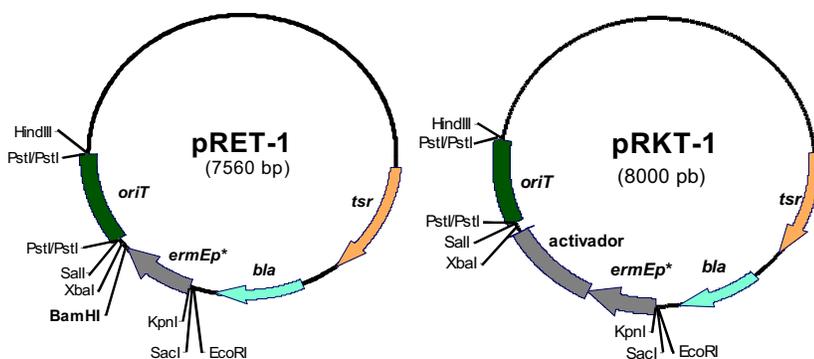
Para la conjugación se empleó una modificación del método de Mazodier y colaboradores.<sup>11</sup>

El aislamiento de ADN plasmídico en *E. coli* se realizó como está descrito,<sup>10</sup> igual que en el caso de *Streptomyces*.<sup>9</sup> Cuando fue necesario, se empleó ampicilina 100 µg/mL (Em-

presa Farmacéutica "8 de Marzo", Ciudad de La Habana), ácido nalidíxico 100 µg/mL (Sigma), kanamicina 50 µg/mL (Sigma), cloranfenicol 25 µg/mL (Böehringer Mannheim) y tioestreptona (Calbiochem). Las endonucleasas de restricción empleadas fueron de las firmas Amersham y Fermentas.

Para la determinación de la concentración celular (suspensiones de esporas) se aplicó el método de diluciones seriadas. Se incubaron por un periodo de 7 d a 30 °C. Al cabo de este tiempo, se realizó el conteo de cada espora formadora de colonia.

Para la cinética de fermentación, se inocularon las suspensiones de esporas a la concentración adecuada SQF108, SQF108/pWO15, SQF108/pRET-1 y SQF108/pRKT-1 en matraces de 250 mL que contenían 25 mL de medio de producción: SYM y medio II, y se incubaron durante



**Fig. 1.** Esquema del vector conjugativo-replicativo pRET-1 y del plasmidio conjugativo recombinante pRKT-1. *tsr*, resistencia a tioestreptona; *ermEp\**, promotor del gen regulador del gen de resistencia a eritromicina; *bla*, resistencia a ampicilina; *oriT*, fragmento para la conjugación *E. coli*-*Streptomyces*; *activador* de compuestos de naturaleza poliquétida.

**Tabla 1.** Descripción de las cepas ensayadas.

Cepas	Características
<i>Streptomyces diastaticus</i> SQF108	Del cepario del Centro de Química Farmacéutica, aislada a partir de un tamizaje realizado en suelo cubano (cepa original).
<i>Escherichia coli</i> ET12567	Cepa donante para la conjugación de <i>E. coli</i> a <i>Streptomyces</i> .
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	Para la determinación de la actividad antibacteriana.
<i>Aspergillus niger</i>	Para la determinación de la actividad antifúngica.
Exconjugante <i>S. diastaticus</i> 108/pOW15	Cepa <i>Streptomyces diastaticus</i> SQF108 conjugada con el plasmidio pOW15 <sup>7</sup> que contiene el fragmento de 769 pb <i>oriT</i> para la transferencia conjugativa de ADN de <i>E. coli</i> a <i>Streptomyces</i> . Amp <sup>R</sup> , Thio <sup>R</sup> (Cepa control negativo).
Exconjugante <i>S. diastaticus</i> 108/pRET-1	Cepa <i>Streptomyces diastaticus</i> SQF108 conjugada con el plasmidio pRET-1 <sup>7</sup> (Fig. 1) que contiene el fragmento de 760 pb <i>oriT</i> y el promotor del gen regulador del gen de resistencia a eritromicina <i>ermEp</i> , que posee una capacidad promotora fuerte Amp <sup>R</sup> , Thio <sup>R</sup> (Cepa control negativo).
Exconjugante <i>S. diastaticus</i> 108/pRKT-1	Cepa <i>Streptomyces diastaticus</i> SQF108 conjugada con el plasmidio pRKT-1 <sup>7</sup> (Fig. 1) que contiene el pRET-1 con un fragmento de ADN clonado probado activador de

96 h a 30 °C y 235 r/min . Este ensayo se realizó por triplicado.

Para los ensayos de susceptibilidad antibiótica y antifúngica se inoculó a profundidad a 50 °C con esporas de *Bacillus subtilis* ATCC 6633 y *Aspergillus niger* en una proporción de 25 µL de esporas conservadas por cada 25 mL de medio con agar. Se colocaron discos de papel (Whatman #3), de 6 mm de diámetro con 25 µL de los caldos de fermentación. Se dejó difundir 1 h a temperatura ambiente y se incubaron las placas a 37 °C durante 18 a 24 h para *B. subtilis* y a temperatura ambiente para *A. niger*. Transcurrido este tiempo, se realizaron las mediciones del halo de inhibición. Estos ensayos se realizaron siguiendo los lineamientos establecidos por las NCCLS para la detección de actividad antibiótica.<sup>12</sup>

### RESULTADOS Y DISCUSION

Se emplearon esporas de *Streptomyces diastaticus* SQF108 crecidas en SYM para la conjugación, ya que este proceso morfo-fisiológico lo tiene bien desarrollado. Una vez que se chequeó la presencia de los plasmidios por aislamiento y restricción, las exconjugantes de SQF108 con pWO15, pRET-1 y pRKT-1 mantuvieron su fenotipo estable luego de realizar varios pases de replicación a medio fresco con antibiótico tiosreptona.

Las frecuencias de conjugación que se conocen para otras especies de *Streptomyces*, conjugadas con otros plasmidios son similares o inferiores<sup>13-15</sup> a las obtenidas en este trabajo (Tabla 2). Se debe señalar que en el caso del plasmidio recombinante pRKT-1, el número de exconjugantes obtenidos por placa era menor que con los otros dos debido probablemente al efecto tóxico del fragmento de ADN activador clonado. Este efecto ha sido reportado para otras cepas de *Streptomyces* productoras también de compuestos poliquétidos.<sup>7</sup>

Se pudo observar en las cinéticas de fermentaciones realizadas (Fig. 2), que los niveles de actividad antibiótica son relativamente bajos. Esto es debido a que estos compuestos no presentan una actividad efectiva contra bacterias. Se conoce que en general, los macrólidos poliénicos tienen una actividad antifúngica excelente, pero poca o ninguna actividad antibacteriana.<sup>16</sup>

Comparativamente se pudo ob-

esto se debe a que no resulta un medio selectivo para la producción de uno de los dos antibióticos en particular, sino que es el efecto cooperativo de ambos. El medio II es selectivo y es probable que se esté produciendo uno preferentemente. No se encontraron diferencias notables entre los niveles de producción de las cepas exconjugativas con respecto a la original en cuanto a actividad antibiótica.

Los resultados de actividad antifúngica solo fueron analizados a las 72 h de fermentación, (Fig. 3) puesto que el microorganismo ensayado resulta un agente muy patógeno.<sup>17</sup> Se observó una marcada actividad antifúngica de estos com-

puestos tanto para la cepa original como para las exconjugantes. En el caso de la cepa conjugativa con el plasmidio pRKT-1 los niveles de inhibición fueron notablemente superiores sugiriendo que la productividad en esta cepa se incrementa mediante la modificación genética empleada.

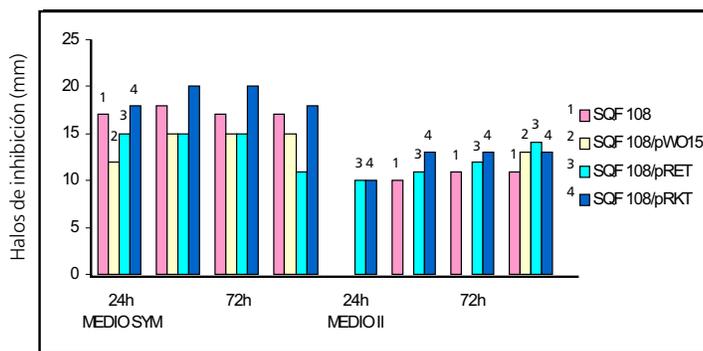
### CONCLUSIONES

Se obtuvieron exconjugantes de la cepa *Streptomyces diastaticus* SQF108 con los plasmidios pOW15, pRET-1 y pRKT-1 de forma fácil y rápida, por lo que la técnica de conjugación resulta efectiva en esta especie. Se comprobó mediante la cinética de fermentación y ensayo

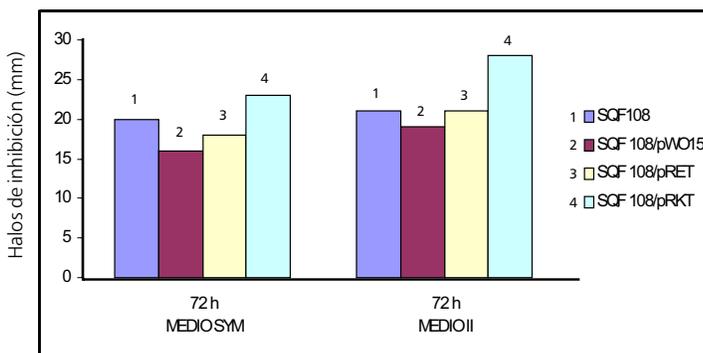
**Tabla 2.** Frecuencia de exconjugantes de *S. diastaticus* SQF-108 obtenidos en este trabajo

Cepas de <i>Streptomyces</i>	pOW-15	pRET-1	pRKT-1
	(%)		
<i>S. diastaticus</i> SQF-108	20 a 25	20 a 25	15 a 18

El porcentaje está referido a la población viable inicial de esporas.



**Fig. 2.** Resultados de susceptibilidad antibiótica en la cinética de fermentación en dos medios de cultivo de la cepa original SQF-108 y las cepas exconjugantes obtenidas en este trabajo SQF-108/pWO15, SQF-108/pRET-1, SQF-108/pRKT-1. Microorganismo ensayado: *Bacillus subtilis*.



**Fig. 3.** Resultados de actividad antifúngica en dos medios de cultivo de la cepa original *S. diastaticus* SQF-108 y las cepas exconjugativas obtenidas en este trabajo SQF-

microbiológico que tanto la cepa original como las cepas exconjugativas tienen marcada actividad antifúngica y poca actividad antibacteriana y que el medio II resulta selectivo para el principio activo no reportado.

Se observó un aumento significativo de la producción de los metabolitos con actividad antifúngica en la cepa conjugativa *Streptomyces* SQF108 pRKT-1 a las 72 h, con lo que se logra aumentar la producción mediante modificación genética.

### CONCLUSIONES

Se obtuvieron exconjugantes de la cepa *Streptomyces diastaticus* SQF108 con los plasmidios pOW15, pRET-1 y pRKT-1 de forma fácil y rápida, por lo que la técnica de conjugación resulta efectiva en esta especie. Se comprobó mediante la cinética de fermentación y ensayo microbiológico que tanto la cepa original como las cepas exconjugativas tienen marcada actividad antifúngica y poca actividad antibacteriana y que el medio II resulta selectivo para el principio activo no reportado.

Se observó un aumento significativo de la producción de los metabolitos con actividad antifúngica en la cepa conjugativa *Streptomyces* SQF108 pRKT-1 a las 72 h, con lo que se logra aumentar la producción mediante modificación genética.

### BIBLIOGRAFIA

1. Chater K.F. Genetics of differentiation in *Streptomyces*. **Annu. Rev. Microbiol.**, **47**, 685, 1993.
2. Tabakov V.Y. and Voeikova T.A. Elements of regulatory systems of antibiotic biosynthesis in *Streptomyces*. **Russ. J. Genet.**, **33**, 1249, 1997.
3. Steele J.M. and Stowers, M.D. Techniques in for selection of industrially important microorganisms. **Annu. Rev. Microbiol.**, **45**, 1991.
4. Flett F., Vassiliou M. and Smith C.P. High efficiency intergeneric conjugal transfer of plasmid DNA from *E. coli* to methyl DNA-restricting *streptomycetes*. **FEMS Microbiol. Lett.**, **155**, 223, 1997.
5. Iznaga Y. Actinomicetos como fuente microbiana para la búsqueda de antifúngicos. Tesis de Maestría, Facultad de Biología, Universidad de la Habana, 2001.
6. Pérez M.E. Aislamiento e identificación de un macrólido poliénico de origen natural. Tesis de Maestría, Facultad de Farmacia-Alimentos, Universidad de la Habana, 2000.
7. Rosabal G. *et al.* Vector de clonación para la transferencia conjugativa de ADN de *E. coli* a *Streptomyces* spp. **Revista CENIC Ciencias Biológicas**, **32**, 123-126, 2001.
8. Rodríguez C. *et al.* Efecto activador de un fragmento de ADN proveniente de *S. rochei* sobre la biosíntesis de antibióticos. **Revista CENIC Ciencias Biológicas**, **27**, 24-27, 1996.
9. Kieser T., Bibb M.J., Buttner M.J., Chater K.F. and Hopwood D.A. Manual Practical *Streptomyces* genetics. The John Innes Foundation, Norwich, UK, 2000.
10. Maniatis T. *et al.* Molecular cloning. A Laboratory Manual 2nd Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. 1989.
11. Mazodier P. *et al.* Intergeneric conjugation between *E. coli* and *Streptomyces* species. **J. Bacteriol.**, **171**, 3583, 1989.
12. NCCLS. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility test. Fourth Edition. NCCLS document M-2A4 10(7) 1-28, NCCLS, 1992.
13. Bierman M., Logan R., O'Brien K., Seno E.T., Nagaraja Rao R. and Schoner B.E. Plasmid cloning vectors for the conjugal transfer of DNA from *Escherichia coli* to *Streptomyces* spp. **Gene**, **116**, 43, 1992.
14. Motamedi A. and Sheng-Juan C. Integrative vectors for heterologous gene expression in *Streptomyces*. **Gene**, **160**, 25, 1995.
15. Smokvina T. *et al.* Construction of a series pSAM2-based integrative vectors for use in actinomycetes. **Gene**, **94**, 1996.
16. Cybulska B. *et al.* Identification of the structural elements of amphotericin B and other polyene macrolide antibiotics of the heptaen group influencing the ionic selective of the permeability pathways formed in the red cell membrane. **Biochem. Biophys. Acta**, **178**, 27-34, 1995.
17. Ibrahim Al-Mohsen, Walter T. and Hughes M.D. Systemic antifungal therapy: past, present and future. *Annals of Saudi Medicine* is a bi-monthly multidisciplinary medical journal published by the King Faisal Specialist Hospital and Research Centre in Riyadh, Saudi Arabia. <http://www.kfshrc.edu.sa/annals/181/97-129.html>. Septiembre de 2003.



PUBLICACIONES CIENTIFICAS DESTACADAS  
MINISTERIO DE EDUCACION SUPERIOR DE CUBA

## EL MANEJO EFECTIVO DE LA SIMBIOSIS MICORRIZICA, UNA VIA HACIA LA AGRICULTURA SOSTENIBLE. ESTUDIO DE UN CASO: EL CARIBE

Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas.

*La simbiosis micorrízica, fascinante asociación que se establece entre la mayoría de las especies vegetales de importancia económica y ciertos hongos del suelo, es la regla y no la excepción. Los hongos micorrizógenos son tan antiguos como las plantas (400 millones de años) y ambos han ido evolucionando, de forma conjunta, hasta los tiempos actuales.*

*En el libro se pretende definir las bases para el manejo efectivo de dicha simbiosis y las vías para su establecimiento e inserción con las prácticas agrícolas en los diferentes sistemas productivos, los cuales se basan en el modelo biológico de las plantas micorrizadas eficientemente, donde la simbiosis, con sus beneficios sobre los procesos de absorción de nutrientes y de agua, sobre el crecimiento y vigor de las plantas y sobre el rendimiento de estas, sea un elemento constitutivo de la sostenibilidad agrícola.*