

Aislamiento y caracterización de bacterias filamentosas con actividad antimicrobiana

Faes, V.^{1,2}; Vaccari, M. C.¹; Beccaria, A. J.^{2,*}

1- Cátedra de Microbiología General.

2- Laboratorio de Fermentaciones.

Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas. Universidad Nacional del Litoral.

Ciudad Universitaria. Paraje "El Pozo". S3000ZAA Santa Fe. Argentina.

RESUMEN: Las bacterias filamentosas son reconocidas por su capacidad de producir metabolitos secundarios bioactivos. El objetivo de este trabajo fue aislar bacterias filamentosas con capacidad de inhibir el desarrollo de otros microorganismos y caracterizar su comportamiento bajo diferentes condiciones de cultivo.

Se aislaron 38 cepas, de las cuales 2, identificadas como *Streptomyces*, inhibieron el crecimiento de alguna de las cepas testigos. Uno de los aislamientos sólo produjo sustancias antimicrobianas en un medio formulado con fuentes complejas (almidón y caseína). El restante, fue activo tanto cuando se formuló el medio de cultivo con ambas o con cada una de las fuentes por separado. El fosfato fue un inhibidor de esta bioactividad.

En cultivos sumergidos, cada cepa aislada mostró un perfil diferente, tanto de crecimiento como de bioactividad. Además, fue posible relacionar el consumo de los nutrientes con el incremento de la biomasa y las fases de síntesis de sustancias bioactivas.

Palabras claves: bacterias filamentosas, metabolitos antimicrobianos, fermentación sumergida.

SUMMARY: Isolation and characterization of actinomycetes with antimicrobial activity. Faes, V.; Vaccari, M. C.; Beccaria A. J. Filamentous bacteria are recognized by their ability to produce bioactive secondary metabolites.

The aim of this work was the isolation of actinomycetes with antimicrobial activity and the characterization of their properties in culture.

Strains (38) were isolated, two of which, belonging to the *Streptomyces* genus were able to inhibit the growth of some test strain. One of these strains showed antimicrobial activity only when cultured in complex media (starch and casein). The other one, showed activity when the medium included one or both nutrients, together. Phosphate was an inhibitor of the antimicrobial substances production.

Finally, submerged fermentations were done. Both isolated strains showed a different pattern of growth and antimicrobial activity. However it was possible to relate the nutrient consumption with the biomass increase and bioactive metabolites production.

Key words: filamentous bacteria, antimicrobial metabolites, submerged fermentation.

*** Correspondencia:**

TE: +54 (0) 342 4575 206/209/215 int. 131

Fax: +54 (0) 342 4575 221

E-mail: abeccari@fbc.unl.edu.ar

Nota:

Este trabajo ha sido parcialmente presentado en el XVII Congreso Latinoamericano de Microbiología y X Congreso Argentino de Microbiología, Buenos Aires, octubre de 2004.

Introducción

Las bacterias filamentosas o actinomicetes (1) se caracterizan por presentar, bajo ciertas condiciones de cultivo, un metabolismo secundario o idiofase (2, 3). En esta condición se generan ciertos metabolitos, denominados metabolitos secundarios, muchos de los cuales poseen diferentes capacidades bioactivas (4).

Se reconocen dos etapas históricas con distinto énfasis en la búsqueda de compuestos naturales bioactivos. Entre 1940 y 1980, el objetivo se centró en el sondeo de diferentes cepas microbianas con capacidad de producir nuevos antibióticos para tratar distintas enfermedades infecciosas. Luego de 1980, el énfasis cambió desde las sustancias antibacterianas hacia otras áreas terapéuticas, que incluyeron drogas antiparasitarias, antivirales, antifúngicas y antineoplásicas. A éstas se agregaron, además, blancos más finos como sustancias antihipertensivas, inmunomoduladoras y compuestos que reducen los niveles séricos de colesterol (5). A estos programas de búsqueda de nuevos compuestos, prácticamente ligados a la búsqueda de nuevas cepas, se agregaron paulatinamente la búsqueda o el desarrollo artificial de cepas más productoras, o con mejor capacidad de crecimiento sobre sustratos alternativos. Al respecto, los clásicos métodos de conseguir mutantes al azar, se han ido cambiando por los certeros métodos que se apoyan en la ingeniería genética. Sin embargo, a pesar de los fuertes avances que se realizan en genómica y proteómica de microorganismos de interés industrial, no perdió vigencia la tradicional metodología de búsqueda de cepas naturales con nuevas propiedades (6, 7, 8, 9).

La tecnología de producción de estas sustancias, de masivo empleo en la salud humana y animal, se realiza mayoritariamente por métodos fermentativos (2).

La tierra es el hábitat por excelencia de las bacterias filamentosas (1). Los géneros *Streptomyces* y *Nocardia* son los más representativos de este grupo debido a la abundancia porcentual de los mismos en los aislamientos.

Los objetivos de este trabajo fueron aislar bacterias filamentosas a partir de muestras de suelo y determinar su capacidad de inhibir el desarrollo de

otros microorganismos usados como testigos. Además, se caracterizó el crecimiento y la actividad antimicrobiana de las cepas aisladas cuando se las cultivó en diferentes condiciones.

Materiales y Métodos

Aislamiento de bacterias filamentosas y determinación de la capacidad antimicrobiana

Se procesaron 17 muestras de tierra recolectadas en diferentes ciudades de las Provincias de Santa Fe y de Entre Ríos. Para su obtención se siguió la metodología propuesta por Pirouz *et al.* (10). Las mismas se secaron durante 24 horas a 37°C y se determinó el pH en cada una de ellas según la metodología sugerida por el PROMAR (1991). Para realizar el recuento y aislamiento de microorganismos presentes se utilizó la técnica de recuento en placa por vertido. Todos los recuentos se realizaron por duplicado efectuando diluciones decimales con agua de peptona 0,1%. El medio de cultivo empleado se formuló de la siguiente manera: almidón (10 g L⁻¹), caseína (1 g L⁻¹), K₂HPO₄ (0,5 g L⁻¹), agar-agar (15 g L⁻¹). Los cultivos se incubaron a 37°C durante un lapso de 4 a 6 días. Se seleccionaron las colonias que macroscópicamente presentaban un aspecto seco, pulverulento y una morfología filamentosas por observación microscópica. El aislamiento se realizó por transferencia del remanente de la colonia a caldo tripteína soja (Laboratorios Britania S.A., Argentina), procediendo a incubar a 37°C durante 24 a 48 horas. Luego de esta amplificación se procedió a realizar un aislamiento en placa con agar nutritivo (Microquin S.R.L., Argentina) o agar tripteína soja (Biokar Diagnostic, Francia), mediante la técnica de las 5 estrías. Las placas se incubaron a 37°C durante 5 a 7 días. Finalmente, se seleccionaron colonias aisladas y se transfirieron a tubos estrías realizadas con estos últimos medios. Los tubos se incubaron a 37°C hasta obtener un crecimiento adecuado y se conservaron a 4°C como cultivos madres para realizar los diferentes ensayos.

La determinación de la capacidad antimicrobiana se realizó a cada una de las cepas aisladas. Para esta determinación se realizó una única estría del microorganismo aislado en un borde de una placa de Petri, realizada con agar nutritivo. Los cultivos se incubaron a 30°C durante 5 días. Finaliza-

da la incubación se realizaron estrías perpendiculares a la anterior de cada uno de los siguiente microorganismos testigos: *Candida albicans* ATCC 10231, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Escherichia coli* ATCC 25992, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 y *Staphylococcus aureus* ATCC 6538. Los cultivos se reincubaron a 37°C durante 24 horas, momento en el cual se procedió a evaluar el crecimiento de los microorganismos testigos.

Caracterización de las cepas. Con las cepas aisladas que presentaron algún tipo de actividad antimicrobiana se realizaron cultivos en agar manitol-soja (inducción de la esporulación) y microcultivos en agar nutritivo para evaluaciones micromorfológicas. Además, se realizaron coloraciones de Gram y de Kinyoun. Por otra parte se determinó la actividad proteolítica (en medio agar-leche), la actividad lecitinasa (en medio agar-yema de huevo) y la actividad catalasa.

Estas cepas también fueron caracterizadas según la respuesta a la producción de sustancias antimicrobianas en diferentes diseños de medios de cultivo. Para la determinación de esta actividad antimicrobiana, se realizaron cultivos de cada cepa aislada en las condiciones precedentemente descritas. Como medio de cultivo se empleó agar nutritivo o variantes del medio de cultivo de aislamiento. La variante más completa se formuló de la siguiente manera: almidón (1 g L⁻¹), caseína (0,4 g L⁻¹), KNO₃ (0,5 g L⁻¹), CaCO₃ (0,1 g L⁻¹), MgSO₄ (0,1 g L⁻¹), KH₂PO₄ (0,22 g L⁻¹), agar-agar (15 g L⁻¹). Los diferentes diseños de este medio de cultivo se muestran más adelante (Tabla 1). Luego, se procedió a extraer bloques cilíndricos del medio de cultivo circundante a la colonia, empleando un sacabocados (11). Las distancias de extracción fueron de 6; 16; 25 y 35 mm. Los bloques se dispusieron sobre placas de agar Müller-Hinton (Microquin SRL, Argentina). Cada placa fue previamente inoculada en forma íntegra en su superficie, con una suspensión de la cepa descrita de *B. subtilis*. Posteriormente, se procedió a incubarlas a 37°C durante 24 horas, momento en el cual se determinó la presencia de halos de inhibición del crecimiento del bacilo en torno de los bloques extraídos.

La puesta a punto de esta técnica se realizó empleando una cepa de *Streptomyces coelicolor* que presentó buena capacidad de producción de metabolitos antimicrobianos.

Ensayos de fermentación: Con las cepas que presentaron actividad antimicrobiana, se realizaron cultivos sumergidos. El medio de cultivo se formuló de la siguiente manera: almidón (1 g L⁻¹), caseína (0,4 g L⁻¹), KNO₃ (0,5 g L⁻¹), CaCO₃ (0,1 g L⁻¹), MgSO₄ (0,1 g L⁻¹). Alícuotas de 50 mL fueron transferidas a frascos erlenmeyers de 250 mL de capacidad. Cada frasco se inoculó con 1×10^5 ufc mL⁻¹ de cada cepa y se incubaron en agitación orbital (200 RPM) a 30°C. Diariamente, se procedió a coleccionar muestras de los cultivos. En una alícuota de las mismas se determinó el diámetro de los *pellets* formados. Para esto se empleó un ocular micrométrico instalado en un microscopio previamente calibrado con una platina micrométrica. Otra fracción se empleó para separar la biomasa del sobrenadante, mediante filtración. La biomasa se empleó para determinar el residuo seco (a 80°C). En el sobrenadante se determinó la concentración de almidón y de proteínas, la actividad amilásica y la actividad antimicrobiana. Para la primera de las determinaciones, se empleó la técnica del lugol. Para la determinación de la concentración de proteínas se empleó la técnica de Bradford. Para la determinación de la actividad amilásica se empleó un *kit* comercial (*Amilasa 405*, Wiener, Argentina). La determinación de la actividad antimicrobiana se realizó dispensando 75 µL del sobrenadante de cada muestra en orificios realizados en placas de medio agar Müller-Hinton. Las placas fueron previamente inoculadas íntegramente en su superficie con una suspensión de la cepa descrita de *B. subtilis*. Los cultivos se incubaron a 37°C durante 24 horas, momento en el cual se procedió a determinar la presencia de halos de inhibición del crecimiento del bacilo en torno de las cavidades y el diámetro de los mismos.

Métodos de conservación. Se realizaron cultivos masivos de las cepas con actividad antimicrobiana en medio sólido. Se procedió a incubar a 30°C durante 11 días, momento en el cual se extrajeron de cada cultivo los esporos formados, suspendiéndolos en una solución de glicerol 20 % (V/V). Las suspensiones de cada cultivo se fraccionaron en tubos eppendorf. Éstos se distribuyeron en 4 lotes. Uno de ellos se liofilizó y el producto liofilizado se conservó a temperatura ambiente. Los 3 lotes restantes se conservaron a diferentes temperaturas: 4°C, -20°C y -80°C. Periódicamente, se procedió a determinar el

número de unidades formadoras de colonias en las distintas fracciones conservadas, mediante la técnica de dilución decimal y cultivo en placa, empleando agar triptea soja.

Resultados y Discusión

Los valores de microorganismos mesófilos totales obtenidos en las muestras procesadas estuvieron comprendidos entre 10^6 y 10^8 ufc g^{-1} . El rango de los valores de pH fue de 5,72 a 9,10. Cabe destacar que los menores valores de recuento de microorganismos mesófilos totales hallados, correspondieron a las muestras con pH más alcalinos.

Del procesamiento de las distintas muestras se aislaron 38 cepas de bacterias filamentosas. Ouhdouch *et al.* (12) citaron que el 87% de los actinomicetes se aíslan a temperaturas mesófilas (25-37°C), y que no existe relación entre la temperatura de aislamiento y la de producción de antimicrobianos.

De las 38 cepas aisladas y ensayadas, sólo dos (5,3%), denominadas como cepa 3 y cepa 5, fueron capaces de inhibir el crecimiento de alguna de las cepas testigos. De esta manera, la cepa 3 fue activa contra *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*, mientras que cepa 5 lo fue contra *B. subtilis*. Ambos aislamientos provienen de muestras de suelos alcalinos.

Este rendimiento fue menor que el obtenido por Ouhdouch *et al.* (12), quienes informaron de la recuperación de un 10% de cepas con actividad antimicrobiana, en muestras de suelo.

Las características culturales, micromorfológicas y bioquímicas obtenidas de cada una de las cepas se describen a continuación:

Cepa 3: a los cuatro días de incubación en medio manitol-soja las colonias presentaron un diámetro de 2 mm, de color rosa en su parte anversa, de aspecto aterciopelado, seca. El reverso de las colonias mostró un color blanco.

Cepa 5: a los cuatro días de incubación en medio manitol-soja las colonias presentaron un diámetro de 4,5-5 mm. El color anverso de las mismas fue blanco y de aspecto muy seco y pulverulento. El reverso de las colonias mostró un color levemente amarronado.

Ambas cepas resultaron positivas a la tinción de Gram, con filamentos ramificados de 0,6 μm de diámetro, con un micelio de sustrato sin fragmentar y un micelio aéreo con hifas ramificadas y cadenas de artrósporos. Además, fueron ácido resistentes negativos según la coloración de Kinyoun. El perfil bioquímico de las mismas fue diferente: sólo la cepa 3 manifestó actividad lecitinasas y proteolítica. Ambas cepas resultaron catalasa positiva.

Teniendo en cuenta el hábitat, las características nutricionales (considerando que el medio de aislamiento contiene caseína como única fuente de N), las características macroscópicas y microscópicas, las afinidades tintoriales y atendiendo a las características taxonómicas de bacterias filamentosas; las cepas aisladas corresponden al género *Streptomyces* (13).

En la Tabla 1 se muestran los resultados obtenidos de las pruebas de sensibilidad realizadas a ambas cepas, cuando se cultivaron en diferentes diseños de medios de cultivo.

Como se observa en la Tabla, la cepa 5 presentó actividad antimicrobiana en un mayor número de variantes de medio de cultivo. Además, en uno de los diseños, la actividad de esta cepa se detectó a mayor distancia del borde de la colonia (16 mm), mientras que en el cultivo de la cepa 3 sólo se detectó a una distancia inferior (6 mm).

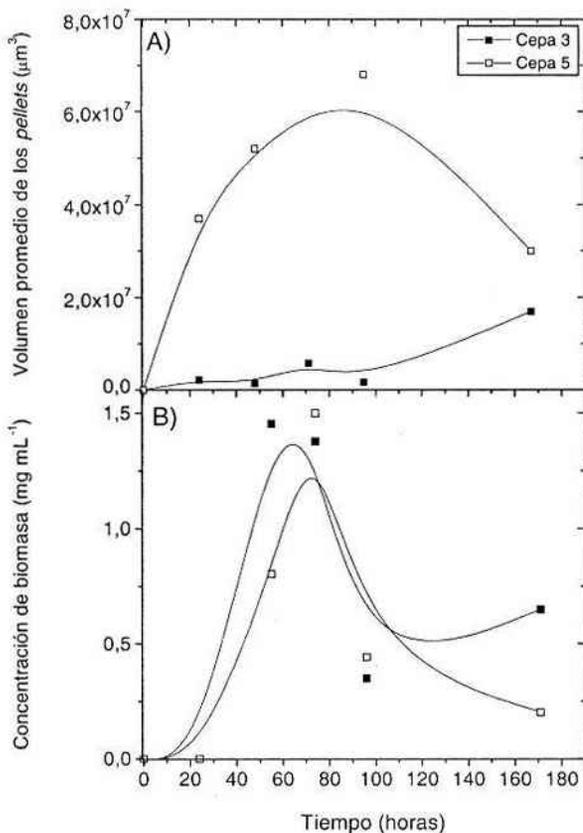
Por otra parte, la ausencia de fuentes complejas (almidón y caseína) y la incorporación de fosfato en el medio, inhibió la producción de sustancias antimicrobianas en los cultivos de ambas cepas. La incidencia negativa del fosfato en la producción de sustancias antibióticas por hongos y *Streptomyces*, es un hecho bien documentado (14, 15).

Por otra parte, diferencias entre ambos aislamientos también se presentaron cuando se realizaron los cultivos sumergidos, correspondientes a los ensayos de fermentación. En la Figura 1 se muestra la evolución de los cultivos de ambas cepas.

En la Figura 1A, se representa la evolución del tamaño de los *pellets*. Cada valor graficado representa el promedio del volumen calculado empleando los datos de entre 20 y 25 determinaciones del diámetro de los *pellets*. Para el cálculo, se empleó un único diámetro en el caso de aquellos *pellets* que presentaron una geometría esférica. Para aquellos que presentaron una geometría elipsoidal, se consi-

Tabla 1: Capacidad bioactiva de las cepas 3 y 5 cultivadas en superficie, en diferentes diseños de medio de cultivo.

Diseño del medio de cultivo	Actividad	
	Cepa 3	Cepa 5
Almidón, caseína, KNO_3 , CaCO_3 , MgSO_4 , agar-agar.	6 mm	6mm; 16 mm
Caseína, KNO_3 , CaCO_3 , MgSO_4 , agar-agar.	-	6 mm
Almidón, KNO_3 , CaCO_3 , MgSO_4 , agar-agar.	-	6mm
KNO_3 , CaCO_3 , MgSO_4 , agar-agar.	-	-
Almidón, caseína, KNO_3 , CaCO_3 , MgSO_4 , KH_2PO_4 , agar-agar.	-	-

Figura 1: Evolución de los cultivos sumergidos de las cepas con capacidades bioactivas. A) Volumen de los *pellets* formados. B) Biomasa específica.

deraron ambos diámetros en el cálculo del volumen. En la Figura 1B, se grafica la relación entre la biomasa obtenida por unidad volumen y el tiempo de cada cultivo.

A partir de las 74 horas, la biomasa comienza a disminuir, posiblemente debido a un fenómeno autolítico. De existir este fenómeno de autólisis, se produce de manera diferente en cada cepa. En la cepa 5, esta disminución de la biomasa se corresponde con una disminución del volumen de los *pellets*, indicando una desintegración parcial de los mismos. En cambio, en la cepa 3 no se observa una disminución de dicho volumen durante el lapso de evaluación del cultivo. En esta cepa, el mecanismo que soportaría una hipótesis de autólisis, correspondería a la pérdida íntegra de algunos *pellets*. Un fenómeno citolítico fue descrito para *pellets* fúngicos (16). En éstos, la desintegración de algunas células en los *pellets*, lleva a la desestabilización de los mismos, tornándolos más susceptibles a las fuerzas de corte originadas por la agitación del cultivo. De esta forma, se produciría la fragmentación de estos agregados miceliales.

Si bien los métodos gravimétricos empleados para determinar la biomasa no son los más precisos y específicos, son de elección debido a que insumen menos tiempo, siendo de amplio uso en este tipo de ensayos (17).

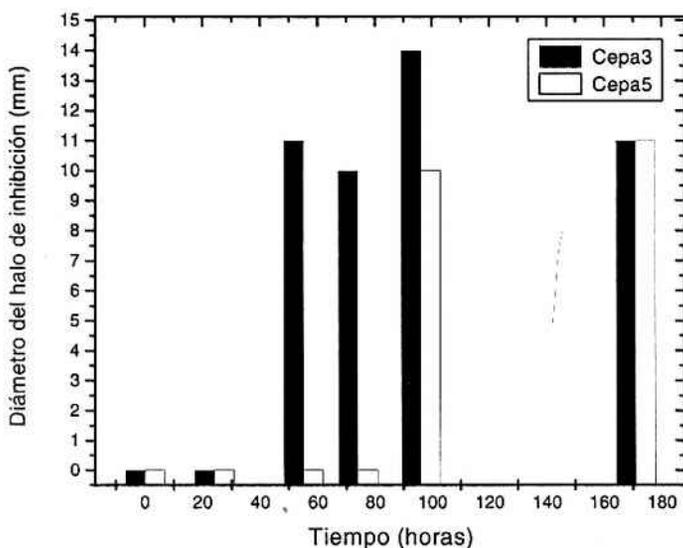
Con el objetivo de establecer el perfil de actividad antimicrobiana y su cinética, se realizó una prueba de sensibilidad contra *B. subtilis*. Los resultados se muestran en la Figura 2.

Como se observa en la figura, la actividad antimicrobiana de la cepa 3, fue detectada en los sobrenadantes obtenidos a partir de las 55 horas y hasta el final del experimento (171 horas). En cambio, la actividad antimicrobiana de la cepa 5 fue detectada a partir de tiempos posteriores (96 horas).

La máxima actividad antimicrobiana detectada correspondió a la cepa 3 y se verificó a las 96 horas de cultivo.

Si se comparan estos resultados con los mostrados en la Tabla 1, que corresponden al cultivo en medio sólido, puede notarse que el comportamiento de ambas cepas varía conforme a la estrategia de cultivo adoptada. De esta forma, cuando el cultivo se

Figura 2: Producción de sustancias antimicrobianas en cultivos sumergidos. Diámetro de los halos de inhibición frente a *B. subtilis* obtenidos para sobrenadantes colectados a diferentes tiempos de cultivo



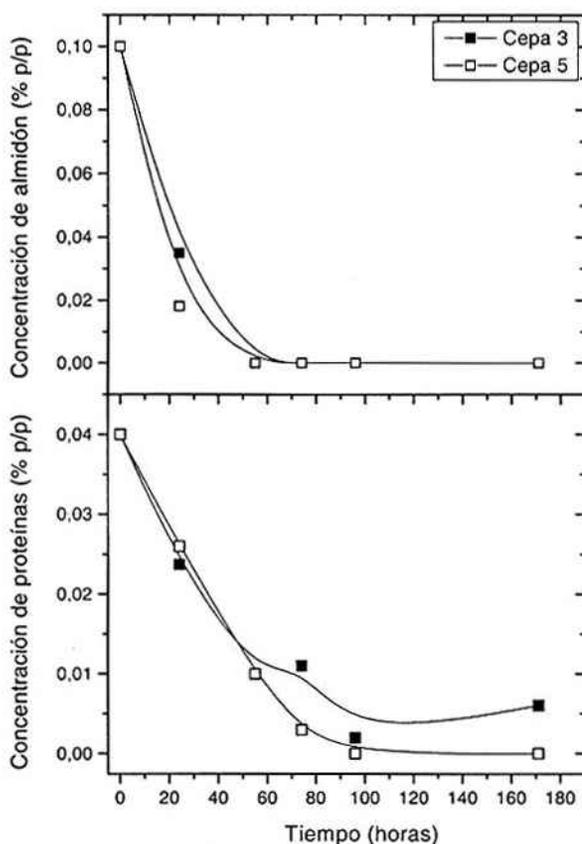
realizó en forma estática, la cepa 3 resultó menos promisoría que la cepa 5. Al respecto, sólo se detectó actividad antimicrobiana en el entorno más próximo de la colonia de la cepa 3 (6 mm) y en la composición del medio de cultivo más completa y sin fosfato. Esta situación se invirtió cuando las cepas fueron cultivadas en el mismo medio de cultivo pero en condiciones de agitación. Esto demuestra la interrelación que se establece entre las características de la cepa y el sistema de cultivo cuando el objetivo es la producción de metabolitos antimicrobianos.

Además, a semejanza de lo que ocurre con el cultivo sumergido de hongos filamentosos, la morfología de los *pellets* de los actinomicetes puede tener una relación con la producción de metabolitos

secundarios. Según los resultados obtenidos por Jonsbu *et al.* (18) empleando *Streptomyces noursei*, un *pellet* de pequeño tamaño fue más adecuado para producir antimicrobianos. El empleo de una metodología con un fluorocromo, permitió a estos autores relacionar la pérdida de actividad metabólica conforme se incrementa el diámetro de los *pellets*. Esta explicación podría extrapolarse a los resultados obtenidos en el cultivo sumergido de la cepa 3, en el que el tamaño de los *pellets*, respecto de la cepa 5, fue menor y la detección de actividad antimicrobiana fue previa y superior.

En la Figura 3 se muestra la evolución de la concentración de almidón (Fig. 3A) y de proteínas (Fig. 3B) en los cultivos sumergidos de ambas cepas.

Figura 3: Perfil nutricional de las cepas en cultivos sumergidos. A) Evolución de la concentración de almidón. B) Evolución de la concentración de proteínas.



Como puede observarse en las gráficas de la figura, tanto la cepa 3 como la cepa 5 hidrolizan estas macromoléculas, posiblemente con fines nutricionales. A partir de las 55 horas no se detecta la presencia de almidón en los cultivos. Comparando con la Figura 1, el aumento de la biomasa en el cultivo de ambas cepas progresa hasta el momento en que el almidón deja de detectarse en el sobrenadante de cultivo. De esta manera, se detendría el metabolismo primario de las bacterias y, concomitantemente, su crecimiento.

Además, la limitación en esta fuente de carbono que se produce en torno de este período, puede ser el estímulo para el inicio del metabolismo secundario y la aparición de actividad antimicrobiana (Figura 2) (19).

La cinética de hidrólisis del almidón en el cultivo de la cepa 3 fue de $27 \mu\text{g mL}^{-1} \text{h}^{-1}$, y en el de la cepa 5 de $34 \mu\text{g mL}^{-1} \text{h}^{-1}$. Esta velocidad fue calculada gráficamente, empleando las pendientes del tramo lineal de ambas curvas.

Por otra parte, la actividad amilásica, que sólo se determinó en el tiempo final de cada cultivo, se detectó únicamente en el sobrenadante del cultivo de la cepa 5. Su valor fue de $0,013 \text{ DO min}^{-1}$. Si bien el almidón fue hidrolizado por ambas cepas, la ausencia de esta actividad enzimática en el sobrenadante de la cepa 3 podría deberse a una menor estabilidad de la isoenzima producida por la cepa, o bien a que fue inactivada por las proteasas secretadas durante el cultivo.

Por otro lado, la velocidad de proteólisis en ambos cultivos fue menor que la correspondiente al almidón y su valor fue de $5 \mu\text{g mL}^{-1} \text{h}^{-1}$ para ambas cepas. Un remanente polipeptídico fue detectado al final del cultivo de la cepa 3, indicando que posiblemente el nitrato se emplee como fuente de nitrógeno.

Finalmente, de los diferentes ensayos de conservación aplicados, el más efectivo resultó ser la conservación a -20°C . Mediante la técnica de liofilización aplicada, no fue posible recuperar esporos viables. Los distintos lotes conservados se evaluaron periódicamente durante un lapso de 78 días.

Conclusiones

A partir de 17 muestras de suelo se aislaron 38 cepas de bacterias filamentosas, de las cuales 2

(5,3%) presentaron algún tipo de actividad antimicrobiana.

Una de las cepas aisladas (cepa 3) presentó un espectro de inhibición más amplio, siendo activa contra *B. subtilis*, *S. aureus* y *E. coli*. Una segunda cepa aislada (cepa 5) sólo fue capaz de inhibir el crecimiento de *B. subtilis*.

Ambos aislamientos provienen de una misma muestra de suelo, cuyos valores de pH se ubicaron entre los más alcalinos.

De acuerdo a las diferentes pruebas bioquímicas realizadas a cada aislamiento con actividad antimicrobiana y a la observación macro y microscópica, se concluye que se trata de cepas diferentes. Además, de acuerdo con estos resultados y con estudios de coloración específicos realizados, ambas cepas corresponden taxonómicamente al género *Streptomyces*.

Los ensayos de conservación realizados empleando suspensiones de esporos de las cepas bioactivas, pusieron en evidencia que el mejor método de conservación es el congelamiento a -20°C , durante un lapso de al menos 11 semanas.

Los cultivos sumergidos de ambas cepas con actividad antimicrobiana resultaron satisfactorios como modelos para un potencial escalamiento del proceso. En cada uno de los cultivos se pudo comprobar la existencia de sustancias antimicrobianas en el sobrenadante. Además, fue posible establecer una estrategia de monitoreo de los cultivos, pudiéndose relacionar el consumo de los nutrientes con el incremento de la biomasa y las fases de síntesis de sustancias bioactivas.

El empleo de sustancias antibióticas provoca la aparición de cepas resistentes a los mismos. De esta manera, el desarrollo de estrategias para producir nuevas sustancias es un concepto necesario para mantener o perfeccionar los estándares terapéuticos.

Los resultados de este trabajo permiten alentar el establecimiento de emprendimientos biotecnológicos en un área de vacancia regional. Además de estos resultados, las metodologías desarrolladas generan los datos iniciales para establecer modelos de producción de estas sustancias. Las técnicas descriptas son directamente extrapolables cuando se intenta una producción con fines analíticos. Esta es una escala satisfactoria para obtener cantidades

suficientes de las sustancias bioactivas a fin de establecer su identidad química y poner de manifiesto sus propiedades biológicas.

Bibliografía

1. Atlas, R. y Bartha, R. 2002. "Ecología microbiana y microbiología ambiental" Pearson Educación (Madrid), 329-380.
2. Lowe, D. A. 2002. Antibiotics. En: Rattedge, C. y Kristiansen, B. (eds) "Basic Biotechnology" Cambridge University Press (Cambridge), 349-375.
3. Stanbury, P. F., Whitaker, A. y Hall, S. J. 1995. "Principles of Fermentation Technology" Butterworth-Heinemann (Eastbourne), 1-11.
4. Donadio, S., Sosio, M. y Lancini, G. 2002. Impact of the first *Streptomyces* genome sequence on the discovery and production of bioactive substances. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **60**, 4: 377-380.
5. Huang, L., Stevens-Miles, S. y Lingham, R. B. 1999. Screening for Activities. En: Demain, A. L. y Davies, J. E. (eds.) "Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology" ASM Press (Washington), 21-28.
6. Hayakawa, M., Yoshida, Y. y Limura, Y. 2004. Selective isolation of bioactive soil actinomycetes belonging to the *Streptomyces violaceousniger* phenotypic cluster. *J. Appl. Microbiol.* **96**, 5: 973-981.
7. Hoster, F., Schmitz, J.E. y Daniel, R. 2005. Enrichment of chitinolytic microorganisms: isolation and characterization of a chitinase exhibiting antifungal activity against phytopathogenic fungi from a novel *Streptomyces* strain. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **66**, 4: 434-442.
8. Maskey, R. P., Helmke, E. y Laatsch, H. 2003. Himalomycin A and B: isolation and structure elucidation of new fridamycin type antibiotics from a marine *Streptomyces* isolate. *J. Antibiotic.* (Tokyo) **56**, 11: 942-949.
9. Xiong, L., Li, J. y Kong, F. 2004. *Streptomyces* sp. 173, an insecticidal micro-organism from marine. *Lett. Appl. Microbiol.* **38**, 1: 32-37.
10. Pirouz, T., Karbasian, M. y Goodfellow, M. 1999. Isolation of some aerobic actinomycetes species from the soil of Zahedan country, south-east of Iran. *Iran. J. Med. Sci.* **24**, 1-2: 65-67.
11. Raper, K., Thom, C. y Fennel, D. 1949. "A manual of the Penicillia" The Williams & Wilkins Co. (Baltimore), 89-104.
12. Ouhdouch, Y., Barakate, M. y Finance, C. 2001. Actinomycetes of Moroccan habitats: Isolation and screening for antifungal activities. *Eur. J. Soil. Biol.* **37**, 2: 69-74.
13. Holt, J. 1984. "Bergey's Manual of Systematic Bacteriology" Williams & Wilkins (Baltimore), IV: 2299-2648.
14. Bibb, M. 2005. Regulation of secondary metabolism in streptomycetes. *Curr. Opin. Microbiol.* **8**: 208-215.
15. Crueger, W. y Crueger, A. 1989. "Biotechnology: Manual de Microbiología Industrial" Acirbia S.A. (Madrid), 263-315.
16. Nielsen, J., Johansen, C. L., Jacobsen, M., Krabben, P. y Villadsen, J. 1995. Pellet formation and fragmentation in submerged cultures of *Penicillium chrysogenum* and its relation to penicillin production. *Biotechnol. Prog.* **11**, 1: 93-98.
17. Neves, A., Pereira, D., Viera, L. y Menezes, J. 2001. Real time monitoring biomass concentration in *Streptomyces clavuligerus* cultivation with industrial media using a capacitance probe. *J. Biotechnol.* **84**, 1: 45-52.
18. Jonsbu, E., McIntyre, M. y Nielsen, J. 2002. The influence of carbon sources and morphology on nystatin production by *Streptomyces noursei*. *J. Biotechnol.* **95**, 2: 133-144.
19. Hajjaj, H., Niederberger, P. y Duboc, P. 2001. Lovastatin biosynthesis by *Aspergillus terreus* in a chemically defined medium. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**, 6: 2596-2602.