

5. Aislamiento de actinomicetos productores de antibióticos

5.1 Fundamento

Los actinomicetos constituyen un amplio grupo de bacterias Gram-positivas filamentosas cuyo hábitat natural es el suelo, y muchos de sus representantes producen sustancias de naturaleza antibiótica. Los filamentos, a menudo ramificados, se denominan hifas, y el conjunto de las hifas, micelio.

Los antibióticos son sustancias normalmente de bajo peso molecular producidas por seres vivos o modificadas artificialmente a partir de ellas, que a pequeñas concentraciones tienen efectos antimicrobianos, y pueden ser administrados por vía adecuada a un organismo receptor. La gran mayoría de los antibióticos proceden del metabolismo secundario de microorganismos procariontes (actinomicetos, *Bacillus*) o eucariotas (*Penicillium*, *Cephalosporium*, entre otros).

5.2 Material

- Tierra de jardín tamizada
- Tubos con 10 ml de solución salina estéril
- Placas de Petri con medio para Actinomicetos
- Pipetas estériles de 1 ml para hacer diluciones
- Espátulas
- Tubos con 6ml de agar blando
- Cultivo del microorganismo indicador

Composición del medio de cultivo para Actinomicetos:	
NaNO ₃	1.0
K ₂ HPO ₄	1.0
KCl	0.5
MgSO ₄	0.5
Extracto de levadura	0.5
Glucosa	5.0
Agar	17.0
Agua destilada	1.000 ml
pH	7.0

5.3 Procedimiento

- Preparar una suspensión de 1 g de tierra tamizada en 10 ml de solución salina estéril.
- Agitar vigorosamente y dejar en reposo.
- Diluir hasta 10⁻⁸, teniendo en cuenta que la suspensión de tierra en solución salina se considera la dilución 1/10.
- Inocular 0.1 ml de cada dilución en las placas de Petri con el medio apropiado.

- Extender con espátula
- Incubar a 28°C durante varios días.
- Una vez crecidas las colonias, se añaden a las placas 6 ml de agar blando fundido y mantenido a 45°C en un baño, previamente inoculado con 0.1 ml de la bacteria que se desee ensayar (cepa indicadora), extendiéndola rápidamente para evitar que solidifique, agitando la placa con un movimiento circular sobre la mesa.
- Una vez solidificadas las placas, se llevan a incubar a 37°C durante 24 horas.

5.4 Resultados

Si alguna colonia de Actinomicetos produce antibiótico con actividad frente a la bacteria ensayada, se observará un halo de inhibición del crecimiento alrededor de la colonia productora, en contraste con el aspecto opaco del resto de la capa donde ha crecido la cepa indicadora

6. Determinación del espectro antibacteriano de un antibiótico

Esta técnica se utiliza para conocer el espectro de acción de un antibiótico, es decir los microorganismos frente a los que es activo dicho antagonista.

6.1 Material

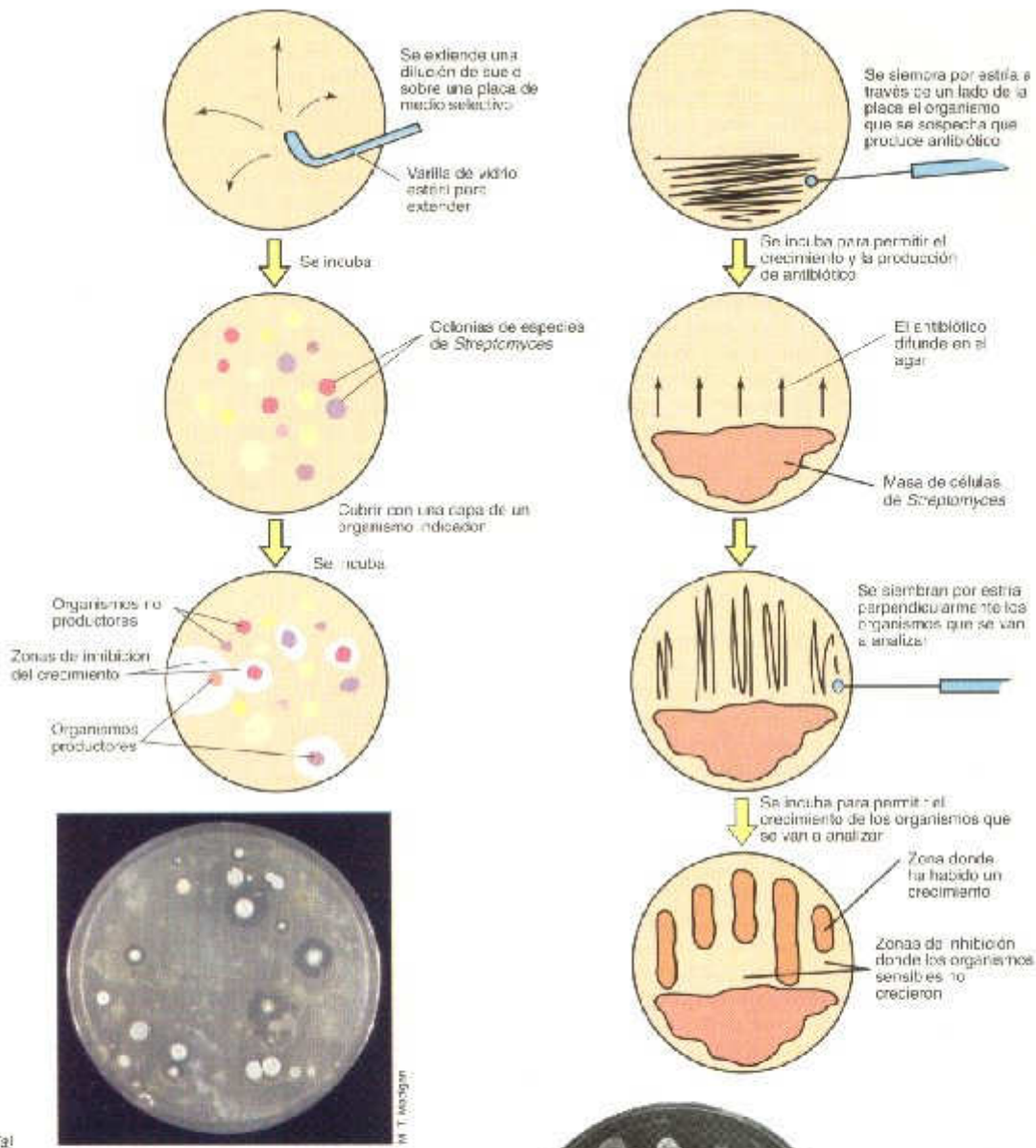
- Placas de Petri con medio adecuado.
- Colonias de Actinomicetos procedentes del suelo, que sean productores de antibióticos : las aisladas en la práctica anterior.
- Cultivo de los posibles microorganismos sensibles a ensayar (cepas indicadoras)
- Placas con medio de cultivo para Actinomicetos (el mismo que se empleó para su aislamiento)

6.2 Procedimiento

- Se siembra una estría del Actinomiceto productor, en un extremo de la placa.
- Se incuban las placas a la temperatura adecuada durante el tiempo necesario para permitir el crecimiento.
- Se inoculan los microorganismos indicadores que se vayan a ensayar, en estrías perpendiculares a la del microorganismo productor.
- Se incuban las placas durante 24 horas a la temperatura adecuada.

6.3 Resultados

El crecimiento en las estrias de los microorganismos de prueba, resultará inhibido a mayor o menor distancia de la estría del microorganismo productor, dependiendo de su mayor o menor sensibilidad al antibiótico. Por supuesto, aquellos microorganismos que no se afecten, crecerán en toda la longitud de la estría.



8. Aislamiento y selección de productores de antibióticos. (a) Se utiliza un medio selectivo para *Streptomyces* e identifica productores de antibiótico usando un organismo indicador. En la mayoría de las colonias son de especies de *Streptomyces* y al producir antibióticos, como indican las zonas de inhibición del organismo indicador (*Staphylococcus aureus*) en torno a ellas. (b) Método para probar el espectro de actividad antibiótica. El productor (una especie de *Streptomyces*) se sembró por estría de un tercio de la placa y se incubó la placa. Después de obtener crecimiento, las bacterias de prueba se sembraron por estría perpendicularmente al *Streptomyces* y se incubó nuevamente la placa. La falta de varios organismos para crecer cerca de la masa de crecimiento *Streptomyces* indica que el *Streptomyces* ha producido un antibiótico contra estas bacterias. Los organismos de prueba (de izquierda a derecha) son: *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Neomorpha*, *Mycobacterium smegmatis*.