

Universidad de Granada

Facultad de Ciencias



Departamento de Microbiología

ESTUDIOS SOBRE PRODUCCION DE ANTIBIOTICO

Por *Myxococcus coralloides* D

M.^a Esther Fárez Vidal

Memoria de Licenciatura

1986

R. 32.559

4/146

FACULTAD DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA

BIBLIOTECA UNIVERSITARIA
GRANADA
Nº Documento <u>613528129</u>
Nº Copia <u>15503860</u>

ESTUDIOS SOBRE PRODUCCION DE ANTIBIOTICO POR
Myxococcus coralloides D

M^a Esther Fárez Vidal

UNIVERSIDAD DE GRANADA

29 OCT. 1986

4338

UNIVERSIDAD DE GRANADA

1986

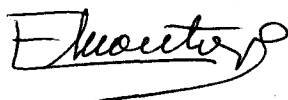
"ESTUDIOS SOBRE PRODUCCION DE ANTIBIOTICO POR
Myxococcus coralloides D"

Memoria presentada para aspirar al grado de
LICENCIADA EN CIENCIAS

Fdo: M^a Esther Fárez Vidal



Los Directores



Enrique Montoya Gómez
Catedrático del Departa-
mento de Microbiología de
la Facultad de Ciencias,
Universidad de Granada,



José M^a Arias Peñaalver
Catedrático del Departa-
mento de Microbiología de
la Facultad de Ciencias,
Universidad de Granada,

Granada, Octubre de 1986

Mi mayor gratitud especialmente a D. José M^a Arias Peñalver y D. Enrique Montoya Gómez Catedráticos del Departamento de Microbiología de la Facultad de Ciencias y directores de esta Memoria de Licenciatura, por su orientación interés y ayuda en la realización de este trabajo.

Igualmente a Juan Díaz, Antonio Luis y a Jose por su paciencia y ayuda prestada durante la escritura de este trabajo así como a todos mis compañeros del laboratorio por sus consejos, su confianza y su colaboración,

A mis padres

INDICE

	<u>Pag</u>
INTRODUCCION.....	9
OBJETO DEL TRABAJO.....	28
MATERIAL Y METODOS.....	31
1. Microorganismos.....	32
1.1. <i>Myxococcus coralloides</i> D.....	32
1.2. Otras bacterias.....	32
2. Medios de cultivo.....	33
2.1 Medios de conservación y mantenimiento.....	33
Agar levadura.....	33
2.2 Medios de crecimiento.....	34
Medio CT.....	34
Medio CTA.....	34
Agar común.....	35
2.3 Medios para la medida cuali y cuantitativa de la activi- dad antibiótica.....	35
Medio "antibiotic medium-1".....	35
Medio "antibiotic medium-2".....	36
2.4 Medios para la producción de antibiótico.....	36
Medio CTG.....	36
Medio TG.....	36
Medio LPG.....	36
Medio ELG.....	37
Medio PG.....	37
Medio MG.....	37
Medio PFG.....	37
Medio PLG.....	38
Medio SPG.....	38

	<u>Pag</u>
Medio LG.....	38
Medio AG.....	38
3. Técnicas de cultivo.....	39
3.1 Mantenimiento y conservación de <i>Myxococcus coralloides</i> D.....	39
3.2 Mantenimiento de otras bacterias.....	39
3.3 Condiciones de cultivo.....	40
4. Medidas del crecimiento bacteriano.....	40
4.1 Medidas turbidométricas.....	40
4.2 Medidas de pH.....	40
4.3 Medidas del número de células por recuento directo.....	41
5. Ensayo de actividad antibiótica.....	42
5.1 Método de los discos.....	42
5.2 Preparación del microorganismo de prueba.....	43
5.3 Preparación de las placas.....	43
6. Determinación de la concentración de antibiótico en los medios de cultivo.....	44
7. Inmovilización de células de <i>Myxococcus</i> <i>coralloides</i> D.....	44
8. Cultivos sumergidos de <i>Myxococcus cora-</i> <i>lloides</i> D en membrana de diálisis.....	46
RESULTADOS.....	48
1. Estudios sobre sustratos y condiciones óptimas para la producción de antibiótico.....	49
Extracto de levadura.....	49
Peptona.....	52
Tryptona.....	54
Extracto de maíz.....	56
Levadura prensada de panadería.....	58

	<u>Pag</u>
Almidón.....	61
Lactosuero.....	62
Probión F.....	64
Probión L.....	66
Spirulina Polvo.....	69
Spirulina Pastilla.....	71
Resumen de las experiencias.....	73
2. Inmovilización de células del <i>M. cora-</i> <i>lloides</i> D.....	79
3. Alargamiento de la fase de producción del antibiótico.....	80
3.1 Modificaciones en el medio de cul- tivo a fin de prevenir la autólisis.....	80
3.2 Empleo de mutantes no autolíticos.....	82
4. Obtención de mutantes superproductores.....	83
DISCUSION.....	85
CONCLUSIONES.....	97
BIBLIOGRAFIA.....	99

INTRODUCCION

Las mixobacterias son bacilos Gram-negativos típicos, con los extremos afilados o redondeados. Presentan tres características sobresalientes que las diferencian del resto de las bacterias Gram-negativas: se mueven por deslizamiento, tienen un espectacular potencial morfogénico, y muestran un comportamiento social. Estas propiedades pueden tener su explicación en la ecología de las mixobacterias (Reichenbach, 1984).

La estructura de las células vegetativas es similar a la de otras bacterias Gram-negativas. Están rodeadas por una capa mucosa, debajo de la cual se encuentra la envuelta celular, la cual consta de tres capas: la membrana externa, el peptidoglicano y la membrana plasmática. El bajo contenido en peptidoglicano y su discontinuidad pueden estar relacionadas con la flexibilidad de las células y su capacidad para convertirse en mixósporas (Kaiser *et al.* 1979).

El genomio de las mixobacterias tiene dos características relevantes: 1) su gran tamaño, quizá sea necesario un exceso de ADN para la fructificación; para la esporulación parece ser que no se necesita un tamaño especial, 2) alto contenido en G+C el cual oscila entre 67-71 moles por ciento (Mandel and Leadbetter, 1965; McCurdy y Wolf, 1967).

Las mixobacterias se mueven por deslizamiento sobre superficies sólidas o en la interfase aire-agua. Aunque este tipo de

movimiento ha sido objeto de numerosos estudios, aún no se ha conseguido dilucidar el mecanismo del mismo.

Además del movimiento de cada célula individual, las mixobacterias poseen capacidad para moverse como grupos coordinados, que reciben el nombre de enjambres. La velocidad de expansión del enjambre es proporcional a la densidad celular, debido a que es necesaria la interacción entre las células para que se de este movimiento coordinado (Kaiser, 1979).

La característica mas sobresaliente de las mixobacterias es su alto potencial morfogenético, el cual tiene lugar a dos niveles: una morfogénesis celular, mediante la cual las células vegetativas sufren una serie de cambios que conducen a la aparición de células de reposo, denominadas mixósporas que se localizan en el interior de los cuerpos fructificantes.

El proceso de fructificación está íntimamente relacionado con los factores nutricionales del medio, disparándose cuando se agotan o están en cantidad limitante algunos de los aminoácidos u otros compuestos del medio de cultivo (Manoil y Kaiser, 1980). Por el contrario en medio ricos no ocurre fructificación sino que se sigue un ciclo de vida vegetativo, este ciclo tiene lugar tanto en medio sólido como en medio líquido.

En el ciclo de vida de las mixobacterias (Fig. 1) ocurren dos procesos: agregación y esporulación. En relación al proceso de agregación, se inicia cuando algún componente nutritivo del medio se encuentra en una concentración limitante. Este factor limitante puede ser algún aminoácido esencial, algún aminoácido no esencial o incluso la fuente de carbono y energía o el fosfato inorgánico, aún no está claro cuál es el mecanismo por el que se inicia la fructificación. Algunos autores han implicado en este proceso a los

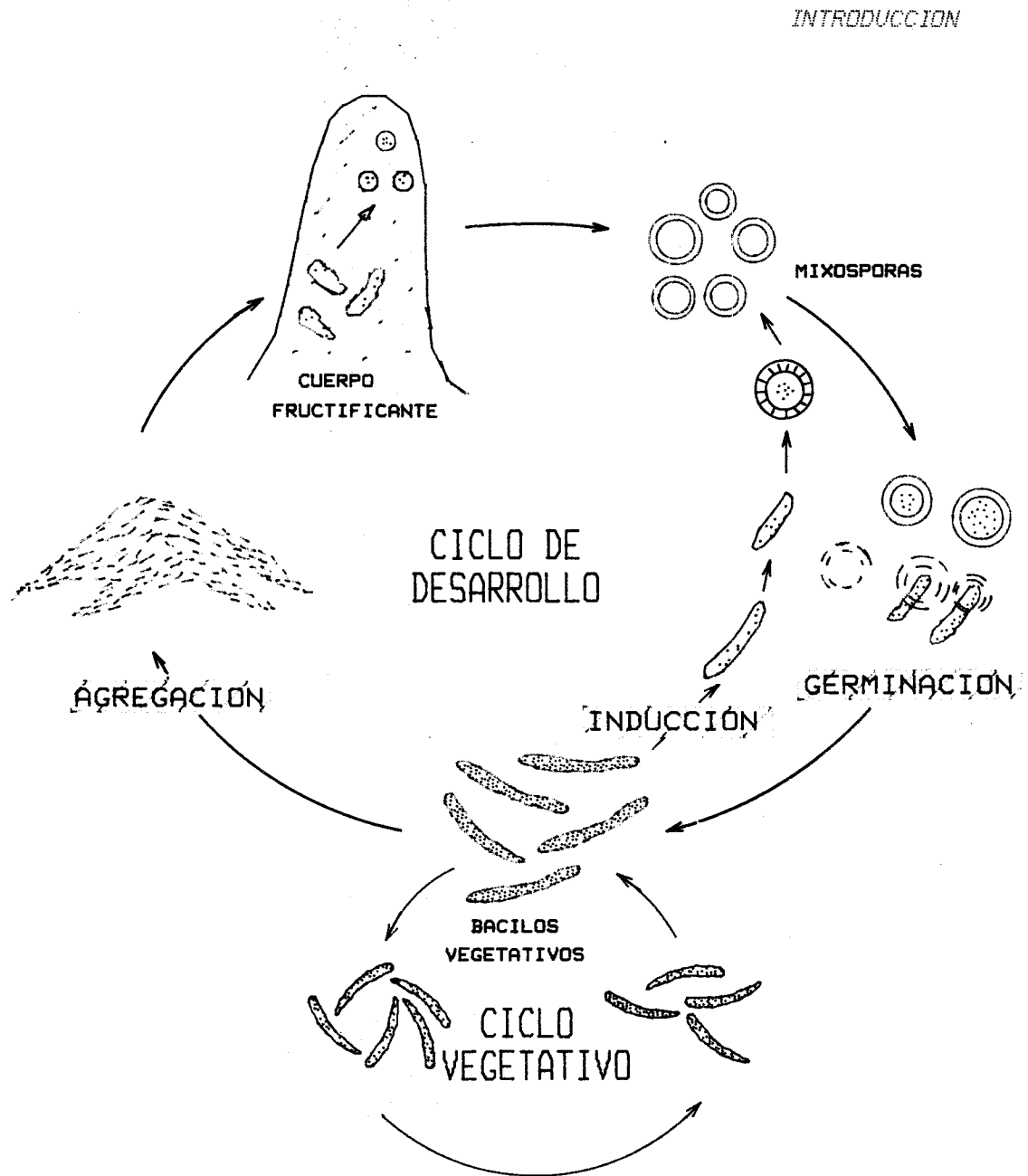


Figura 1. Esquema de los ciclos vegetativos y de desarrollo en mixobacterias.

INTRODUCCION

nucleótidos hiperfosforilados, (Mancil y Kaiser, 1980), sin embargo no está del todo claro el papel que juegan los mismos.

Para la agregación además de la inanición son requeridos otros dos factores; la presencia de una superficie sólida y una densidad celular alta. En relación con esta última, Wireman y Dworkin (1975) encontraron que la fructificación era mucho más rápida cuanto mayor era la densidad celular. La explicación de este fenómeno parece ser que está en la necesidad de una distancia crítica entre célula y célula.

Una vez cumplidos estos requisitos, las células empiezan a deslizarse hacia puntos concretos, normalmente formando oleadas. En estos puntos de atracción se originan unos agregados, los cuales van creciendo de tamaño hasta constituir el cuerpo fructificante maduro, siendo de suma importancia en todo el proceso la comunicación intercelular. La morfología de los cuerpos fructificantes varía según los géneros.

En el interior del cuerpo fructificante, las células empiezan a sufrir una serie de cambios morfológicos, estructurales y bioquímicos que conducen a la formación de mixósporas. El proceso de esporulación ocurre normalmente después de la agregación; sin embargo, puede producirse sin que se haya producido agregación anteriormente.

En relación con la esporulación se produce la lisis del 80% aproximadamente de las células que se han agregado, de manera que solo el 20% llegan a formar mixósporas (Wireman y Dworkin, 1975 y 1977). Esta autólisis masiva parece ser que está íntimamente unida al desarrollo.

INTRODUCCION

Durante la esporulación, las células vegetativas se van recubriendo de una cubierta gruesa y van cambiando de forma. Sin embargo el cambio de forma no ocurre en todos los grupos de mixobacterias.

Aparte de la morfológicas, existen otras diferencias entre células vegetativas y mixósporas. Por ejemplo, estas últimas poseen una cubierta gruesa, constituida por tres capas. Además las mixósporas, presentan una tasa respiratoria nula, aparecen refringentes al microscopio de contraste de fase y son más resistentes que las células vegetativas al calor, sonicación y desecación.

Dworkin y Gibson (1964), observaron que la adición de glicerol 0,5 M a cultivos de *Myxococcus xanthus* en fase exponencial producía mixósporas. Las mixósporas obtenidas tras la inducción con glicerol son similares a las que se encuentran en los cuerpos fructificantes en lo que respecta a forma, refringencia y resistencia; sin embargo son diferentes en otros aspectos.

En cuanto a la germinación, ésta ocurre cuando las mixósporas son colocadas en un medio rico, por lo que se cree que algunos nutrientes del medio deben actuar como señal que desencadene todo el proceso.

Cuando esto ocurre acontecen una serie de cambios en la esporas. En primer lugar las mixobacterias pierden la refringencia y, a continuación, la cubierta de la spora se rompe, saliendo la nueva célula vegetativa bacilar y dejando detrás la cubierta vacía (Voelz y Dworkin, 1962).

Para que ocurra la germinación parece ser que se requiere una densidad celular alta. No se da la germinación de una célula

INTRODUCCION

aislada, sino la de toda la comunidad. La población de células siguen el ciclo de vida vegetativo hasta que se agoten los nutrientes. En este momento se originarán varios puntos de atracción dentro del enjambre, adonde migrarán las células, se agregarán, se diferenciarán y aparecerán varios cuerpos fructificantes nuevos.

El significado biológico de este ciclo de vida parece ser que es asegurar que se inicie un nuevo ciclo a partir de una comunidad y no de una célula aislada.

Pero la autólisis en mixobacterias no sólo se da durante el ciclo de desarrollo, sino también, con bastante frecuencia, durante el ciclo vegetativo, en cultivos creciendo de manera dispersa en medio líquido. En estos casos los cultivos presentan una corta fase estacionaria, después de la cual, entran en una fase de declive más o menos rápida que termina cuando todas las células sean autolisadas.

En relación a *Myxococcus coralloides* D, los resultados apuntan a que los factores nutricionales, y especialmente el fosfato inorgánico, están relacionados de alguna manera con el fenómeno autolítico, no se ha podido encontrar ninguna relación entre la acumulación de nucleótidos hiperfosforilados y la autólisis.

Por otro lado, las mixobacterias producen una amplia variedad de sustancias tales como antibióticos, bacteriocinas, enzimas líticos, lipasas, nucleasas, proteasas, etc., que van a jugar un importante papel en la muerte y lisis de un espectro amplio de microorganismos. Además, algunos de estos agentes pueden tomar parte en el proceso autolítico que tiene lugar durante la formación de cuerpos fructificantes que ya ha sido comentado.

INTRODUCCION

Siguiendo el descubrimiento inicial de Pinoy en 1913, de que *Chondromyces crocatus* puede lisar otra bacteria, muchos investigadores han informado que una gran variedad de mixobacterias son bacteriolíticas. El espectro de microorganismos susceptibles de ser lisados por la mixobacteria o por sus productos extracelulares es amplio, e incluye muchas eubacterias, actinomicetos, cianobacterias, levaduras, y otros hongos. Incluso la lisis de nematodos por *Sorangium* sp. ha sido descrita (Katznelson et al 1964).

Las primeras descripciones de la capacidad de producción de antibióticos por mixobacterias datan de 1947 (Oxford) y posteriores del 53 (Norén) y 62 (Norén y Raper). Sin embargo, los resultados eran confusos y contradictorios, debido de una parte, a la falta de reproductibilidad y de otra a la gran inestabilidad de los mismos. AÚN cuando estos trabajos iban orientados a establecer una relación de los productos activos con la lisis, sin embargo, no fue posible una evaluación exacta sobre ello.

La primera demostración clara y directa de la producción de antibióticos por una bacteria originariamente conocida como *Sorangium* sp. (después clasificada como *Lysobacter*), fue el aislamiento de la mixina (Peterson et al 1966). La estructura química de la mixina, es 1-hidroxi-5,10 dióxido-6,metoxifenazina, fue establecida por Edwards y Gillespie (1966), Weigele y Leimgruber (1967) y Sigg y Toth (1967).

La mixina tiene un espectro de actividad antimicrobiana extremadamente amplio (Peterson et al 1966; Grunberg et al 1967), y mostró ser activa frente a todas las bacterias y levaduras examinadas y sobre la mayoría de los hongos examinados. Los estudios sobre el modo de acción de la mixina, sobre *E.coli*, (Lesley y Bechki 1967, 1971; Bechki y Lesley 1972) indicaron que la acción

INTRODUCCION

primaria del antibiótico es la inhibición de la síntesis del ADN, ARN, de la síntesis de proteínas y la posterior muerte de las células. Los datos sugieren que la mixina interacciona directamente con el ADN, tanto de eucariotas como de procariotas. La mixina resultó ser demasiado tóxica para su uso general (LD₅₀ intraperitoneal en ratones es de 40 mg/Kg)

En 1973, Rosenberg y colaboradores dieron a conocer el aislamiento del antibiótico TA, del *Mixococcus xanthus* TA. El compuesto ha sido cristalizado y sus propiedades químicas conocidas (Rosenberg *et al.* 1982); el antibiótico TA (C₂₄H₃₇O₉N, P.M. 633,8) tiene una estructura macrocíclica que contiene los siguientes grupos funcionales, cetonas, lactonas, amidas secundarias, dieno metoxi sustituido (λ_{max} 239nm.), alcohol primario, y tres alcoholes secundarios, dos de los cuales son cis-vecinal. La actividad antibiótica es sensible a una hidrólisis moderadamente alcalina y a la oxidación por periodato.

El antibiótico TA es bactericida para las bacterias Gram-positivas y Gram-negativas (Rosenberg *et al.* 1973; Vaks *et al.* 1974) e inactiva contra levaduras, hongos y protozoos.

El antibiótico TA interfiere con la síntesis del peptidoglicano por inhibición de la polimerización de los lípidos-disacáridos-pentapéptidos (Zafiri *et al.*, 1981). La producción de este antibiótico es inhibida por una vigorosa aireación o por alta concentración de peptona (Mizrahi *et al.*, 1976). Glicina, alanina y serina son precursores del antibiótico y estimulan su síntesis (Fytlovitch *et al.* 1983). Los dos átomos de carbono de la glicina entran a formar parte del antibiótico; sin embargo la alanina y la serina son convertidos en acetato antes de ser incorporados al antibiótico TA.

INTRODUCCION

La estirpe Mxv48 de *Mixococcus virescens* ha sido conocida por producir una familia, de al menos doce antibióticos estrechamente relacionados, referidos como mixovirescinas (Gerth et al 1982). Mixovirescina A, el principal antibiótico de la mezcla, parece ser muy similar al antibiótico TA. La estructura de este antibiótico fué puesta de manifiesto por Trowitzsch et al.(1982).

Mixovirescina A, es un eficiente inhibidor de enterobacterias, así como de otras bacterias Gram-negativas. En altas concentraciones, el antibiótico es activo también frente a ciertas bacterias Gram-positivas. Los iones de calcio, suero bovino y lecitina interfieren con la actividad bactericida de mixovirescina A sobre *E.coli*. Los eucariotas se ha visto que son completamente resistentes. El antibiótico parece bloquear la síntesis de la pared celular.

Polyangium cellulorum ssp. *fulvus* mostró producir un nuevo antibiótico antifúngico, la ambruticina (Ringel et al. 1977). La ambruticina es un ácido ciclopropil-polieneo pirano, y parece representar una nueva clase de antibiótico. Este antibiótico es activo contra una variedad de hongos, incluyendo importantes patógenos, tales como *Coccidioides immitis*, *Histoplasma capsulatum*, y *Elastomyces dermatitis*, así como hongos dermatofíticos filamentosos. La ambruticina tiene una baja actividad contra bacterias Gram-positivas y Gram-negativas. (L₅₀ medida para sal y sodio de ambruticina en ratones fué 315 mg/Kg).

Reichenbach y sus colaboradores aislaron de células de *M.fulvus* estirpe Mx f16 un nuevo antibiótico antifúngico, el mixothiazol (Gerth et al.1980; Trowitzsch et al.1980). La estructura química del mixothiazol ha sido también establecida. La cisteína, treonina, leucina e isoleucina parecen ser los precursores biosintéticos de la molécula.

INTRODUCCION

La acción del mixothiazol es esencialmente restrictiva para células eucariotas. En concentraciones de 0,01-3,0 $\mu\text{g/ml}$ inhibe el crecimiento de muchas levaduras y hongos por interferir con la respiración (Thierbach y Reichenbach 1981 a,b). Entre las bacterias probadas sólo *Myxococcus luteus*, *Mixobacterium* sp., *Nocardia corallina* y *Paracoccus denitrificans* mostraron alguna sensibilidad. El efecto del mixothiazol sobre las preparaciones de membranas provenientes de *Paracoccus denitrificans* fue similar a su acción sobre células eucariotas (Thierbach y Reichenbach 1983). El mixothiazol es altamente tóxico en ratones (LD_{50} : 2mg/Kg) y para los embriones fibroblastos de pollo.

La altiomicina puede ser aislada de los fluidos de los cultivos de *Cystobacter fuscus*, *Myxococcus virescens* y *Myxococcus xanthus* (Kunze et al. 1982). Este es un ejemplo de un antibiótico producido por mixobacteria que previamente ha sido descubierto en un organismo diferente, *Streptomyces* sp. Muchos otros ejemplos de antibióticos que son producidos por microorganismos totalmente diferentes han sido descritos (Lechevalier 1975). La altiomicina (Sakakibara et al. 1974) es activa contra bacterias Gram-positivas y Gram-negativas, pero es inactivo frente a eucariotas. El antibiótico bloquea la síntesis de proteínas por interferir con la transpeptidación sobre las subunidades 50 s del ribosoma procariótico (Pestka y Brot, 1971).

Recientemente, Reichenbach y sus colaboradores (Gerth et al. 1982) han mostrado que *Myxococcus fulvus* estirpe Mx f147, produce el antibiótico antifúngico pirrolnitrina. El mismo antibiótico mostró ser previamente producido por muchas *Pseudomonas* (Elander et al. 1968). Las propiedades fungistáticas de la pirrolnitrina han sido descritas (Nishida et al. 1965). La pirrolnitrina es también producida por otras mixobacterias, incluida *Corallocooccus exiguus* y *Cystobacter ferrugineus*.

INTRODUCCION

Myxococcus fulvus estirpe Mx f65 produce una familia de antibióticos peptídicos conocidos como mixovalarginas (Irschik et al. 1983). El análisis de aminoácidos reveló valina, alanina y arginina en proporciones moleculares de 5:2:1. Además, muchos aminoácidos inusuales fueron dados a conocer, incluyendo la agmatina en el carboxilo terminal del péptido lineal. Las mixovalarginas eran más activas contra las bacterias Gram-positivas que contra las Gram-negativas. Levaduras y hongos no fueron sensibles. Las mixovalarginas parecen ser inhibidoras de la síntesis de proteínas.

Irschik y col, en su programa de screening de antibióticos de mixobacteria han descubierto una actividad producida por *Sorangium cellulosum* raza So cel 2. Los compuestos responsables han sido aislados y su estructura dilucidada. El componente principal Sorangicina A, es de nuevo tipo y no puede ser clasificado dentro de ningún grupo de antibiótico conocido. Muestra una MIC entre 0,01 y 0,1 µg/ml para bacterias Gram-positivas y entre 3 y 25 µg/ml para bacterias Gram-negativas. Hongos y levaduras no son sensibles.

La sorangicina inhibe la ARN polimerasa bacteriana, pero no a la de eucariotas como se ha observado en ensayos con polimerasa de *E.coli* y semilla de hongo.

Los estudios de biosíntesis revelan que el anillo polieter de la molécula es sintetizado exclusivamente a partir de unidades de acetato con excepción del carbono uno. Los experimentos llevados a cabo para estudiar la producción de sorangicina han mostrado que la raza sintetiza más antibiótico en un medio sintético que un medio con peptona. Hay una fuerte represión por fosfato. El rendimiento puede ser incrementado de tasas iniciales de 1 µg/ml hasta 30µg/ml.

INTRODUCCION

Los estudios farmacológicos de la sorangicina han demostrado que no es tóxica, que tiene un buen efecto como fármaco, y se ha observado una buena actividad frente a bacterias intracelulares.

En cuanto al antibiótico de *Myxococcus coralloides* D fue descrito por Arias (1977), el cual se acumula en el medio, siempre que las condiciones de cultivo permiten su desarrollo. La cantidad de antibiótico producido, está afectado decisivamente por la composición del medio de cultivo, en especial por la presencia de glucosa, y en menor escala por las restantes condiciones culturales; pH, temperatura, etc., habiéndose fijado las condiciones óptimas que permiten su máxima producción.

La biosíntesis del antibiótico sólo tiene lugar durante el crecimiento vegetativo del *Myxococcus coralloides*, coincidiendo la máxima actividad de los sobrenadantes de cultivos con el final de la fase de crecimiento logarítmico, y no detectándose producción alguna durante el proceso de diferenciación de las células vegetativas a mixósporas. El antibiótico producido muestra una marcada resistencia al calor, condiciones extremas de acidez y alcalinidad, así como al tratamiento con enzimas proteolíticas, (Arias et al 1979).

El antibiótico es activo contra todas las bacterias Gram-positivas ensayadas a excepción de Actinomycetales y algunas Gram-negativas (*Weisseria* sp.), no mostrando resistencia cruzada con una gran cantidad de antibióticos. El antibiótico ejerce una acción bactericida y lítica sobre las bacterias sensibles a su acción, pero exclusivamente cuando éstas se encuentran en fase de crecimiento, siendo totalmente inactivo sobre células en reposo, o cuyo crecimiento ha sido detenido por acción de otro antibiótico bacteriostático. Igualmente es inactivo sobre células en crecimiento en medios de una tonicidad elevada, (Arias et al 1979).

INTRODUCCION

Es posible que el antibiótico interfiera con algunas de las etapas de la biosíntesis del mucopéptido de la pared celular de las células sensibles, es atóxico y activo "in vivo". Este antibiótico fué purificado por preparación en cromatografía de capa fina, con una absorción máxima de 300 nm.

Las investigaciones llevadas a cabo durante los últimos diez años han demostrado que las mixobacterias son, de hecho, una fuente rica de antibióticos.

De acuerdo con Reichenbach, (1986) y resumiendo los resultados de los últimos diez años de investigación acerca de los antibióticos de mixobacterias se pueden establecer las siguientes conclusiones: 1) Entre un 40 y un 60% y en algunos grupos cerca de un 100% de todas las razas de mixobacterias producen algún tipo de actividad. 2) Químicamente, los compuestos pertenecen a grupos muy diferentes (aromáticos, heterociclos, poliénicos, macrocíclicos y peptídicos), y sus estructuras son complejas, generalmente. 3) La mayor parte de las estructuras son nuevas; de las 18 estructuras básicas (con unas 80 variantes) sólo dos han sido descritas antes en otros microorganismos y dos más son variantes de otros antibióticos conocidos. 4) Los mecanismos de acción de los distintos compuestos son también diversos; actúan sobre síntesis de ARN, sobre síntesis de proteínas, sobre transporte electrónico, sobre transporte de hierro y sobre membranas celulares. 5) La capacidad de producir un cierto antibiótico es una propiedad de una raza individual y no de la especie, una raza produce a menudo, diversas estructuras variantes de un compuesto, y a menudo incluso dos o tres compuestos completamente distintos. Los miembros de las subordenes *Cistobacterineae* y *Soranginae* parecen sintetizar diferentes conjuntos de antibióticos. 6) El número de compuestos distintos provenientes de mixobacteria puede ser limitado y no muy elevado. 7) En la mayoría de los casos el rendimiento inicial de la sustancia

INTRODUCCION

activa es bajo o muy bajo (0,2 a 20 mg/l). 8) La mayoría de las mixobacterias pueden crecer sin dificultades sobre medios industriales (corn steep, gluten de maíz) algunas bacterias también sobre medios sintéticos y sin excepción pueden crecer a gran escala en fermentadores (5000 l.). 9) Algunos compuestos tienen buenas posibilidades de aplicación.

En cuanto a las enzimas líticas, siguiendo los estudios pioneros de Norén (1953) y otros, un número de diferentes enzimas líticas de mixobacterias han sido purificadas y caracterizadas, entre ellas se incluyen enzimas líticas, proteasas y peptidasas, nucleasas y lipasas. De entre las primeras, se han descrito muramididasas, glucosaminidasas, amidasas y peptidasas y aún cuando las dos primeras son altamente específicas, la última no lo es necesariamente.

La mayoría de las mixobacterias (excepto las especies celulolíticas), usan proteínas como fuente de Carbono y Energía y son incapaces de usar azúcares. Por esto, tanto si crece saprofiticamente o sobre otra bacteria, dependen de enzimas proteolíticos para su nutrición.

En cuanto al papel de las enzimas líticas y de los antibióticos en la nutrición, la sustancia orgánica insoluble en agua, constituye la mayor fuente de nutrientes en el suelo. De particular interés para la mixobacteria cuando va a alimentarse son otros microorganismos bien muertos o vivos, fragmentos de células o proteínas desnaturalizadas. Para que las bacterias usen estos sustratos insolubles pueden: 1) establecer contacto directo con ellos ó 2) producir material difusible extracelular que difunde fuera de la célula y que solubilice el sustrato. En el caso de las mixobacterias, las evidencias avalan ambos mecanismos.

INTRODUCCION

Muchos autores han enfatizado la necesidad de contacto directo entre la mixobacteria y su presa, (Burnham *et al.*, 1981; Shilo, 1970; Kletter and Henis, 1963; Margalith, 1962; Roper and Marshall, 1978). La lisis de la cianobacteria *Phormidium luridum* por *Myxococcus xanthus* ocurre dentro de las asociaciones formadas por la mixobacteria, pero no ocurre cuando los microorganismos están separados por membranas de tamaño de poro de 0,2 μm (Burnham *et al.*, 1981).

Hasta ahora, el conocimiento sobre los mecanismos de adherencia de las mixobacterias es pequeño. La observación frecuente de que mixobacterias aisladas se adhieren fuertemente a superficies de cristal y plástico, sugiere que las interacciones hidrofóbicas deben jugar un papel.

Uno de los rasgos distintivos del mecanismo de contacto de las células es que una vez que la mixobacteria ha atacado a un sustrato insoluble, ésta puede comenzar el crecimiento independientemente de la densidad celular.

El íntimo contacto de la mixobacteria y su sustrato asegura altas concentraciones de factores líticos. En ausencia de contacto directo, se requieren altas densidades de células a causa de la dilución de los factores líticos en el medio. En este caso, Kletter y Henis (1963) dieron a conocer que el contacto directo de mixobacterias con bacterias Gram-negativas muertas por el calor permitía la lisis de la bacteria y el crecimiento de las mixobacterias mucho antes de que la actividad litica fuese demostrada en el fluido de cultivo.

El mecanismo de solubilización es cuantitativamente importante cuando las bacterias están presentes en una alta densidad celular, por ejemplo los enjambres de mixobacterias. Aún cuando

INTRODUCCION

células individuales no pueden producir suficientes productos extracelulares para solubilizar el sustrato, el producto acumulado de muchas células en un pequeño espacio, podrían conseguir una concentración lo suficientemente alta como para hidrolizar y/o solubilizar el sustrato y así proveer de nutrientes. Así, se sugiere, que la conducta comunitaria de las mixobacterias da como resultado una alimentación mas eficiente, (Rosenberg *et al.* 1977).

Cuando la mixobacteria se alimenta de sustratos complejos, como bacterias intactas, en las que múltiples "blancos" serían necesarios para solubilizar el sustrato, sería de esperar que la dependencia de la densidad celular fuese más pronunciada. En este sentido, recientemente se ha observado que *Myxococcus xanthus* no crece sobre *E.coli* cuando hay menos de 10 mixobacterias por milímetro (Gendelman y Rosenberg, no publicado). Sin embargo, cuando un mutante de *Myxococcus xanthus* incapaz de producir el antibiótico TA era usado en el último experimento, el crecimiento de *Myxococcus xanthus* no ocurría incluso a altas densidades celulares. Así, junto con las enzimas liticas y las proteasas, los antibióticos tales como el TA, pueden jugar un papel en el crecimiento de las mixobacterias sobre microorganismos.

En relación con el desarrollo, como se discutió previamente, hay una fuerte correlación entre la esporulación de *Myxococcus xanthus* y la autólisis en crecimiento en placas. Para entender la relación entre estos dos fenómenos, podría ser útil saber: 1) factor(es) bioquímico(s) responsable(s) de la autólisis, 2) condiciones fisiológicas para la inducción de factor(es) autolítico(s) y 3) el papel del (los) producto(s) lítico(s) en el desarrollo.

El término "autólisis" comprende dos mecanismos diferentes: cis-autólisis, en el cual los factores asociados a la

INTRODUCCION

célula son los responsables, y trans-autólisis en la que los factores responsables son producidos por otras células de la población. Evidencias aportadas por Wireman y Dworkin (1977) parecen sugerir que el desarrollo de la lisis es un cis evento.

Aún cuando el proceso lítico parece ser un proceso-cis, la inducción de la lisis es dependiente de la densidad celular, sugiriendo un mecanismo de señales célula a célula. La información sobre la naturaleza de esta hipotética señal ha sido estudiada sobre mutantes no esporulantes. Mutantes Spo C no sufren lisis en el desarrollo, sin embargo, estos mutantes pueden ser inducidos a la lisis y a formar esporas por la adición de componentes del peptidoglicano (Simkets y Kaiser 1982 a), o sustratos que contienen carbohidratos extraídos de células de *Myxococcus xanthus* muertas por inanición, (Janssen y Dworkin 1980).

El ácido diaminopimélico induce la formación de cuerpos fructificantes (y presumiblemente la autólisis), (Campos y Zussman, 1975) Ya que los componentes peptidoglicanos pueden inducir la lisis y la formación de cuerpos fructificantes. Puede que la lisis del desarrollo tenga lugar de una manera autocatalítica.

Recientemente, ha sido dada a conocer una autocida en *M. xanthus*. La autocida AMI de este microorganismo fue purificada, y, mostró ser una mezcla de ácidos grasos: 45,4 % saturados, 49,3 % monosaturados, y un 4,3 % disaturados. Algunos tipos de ácidos grasos mimetizan en alguna medida la actividad de AMI, aunque ninguno de los ácidos grasos probados fueron tan activos como la AMI purificada. Mutantes espontáneos e inducidos de *M. xanthus* fueron seleccionados por la resistencia hacia AMI y hacia ácidos grasos. Todos los mutantes AMI y ácido grasos resistentes examinados tenían bloqueada la formación de cuerpos fructificantes. Algunos de estos mutantes formaron cuerpos fructificantes normales

INTRODUCCION

cuando fueron mezclados con fluido extracelular de la estirpe parental. Los datos sugieren, que AMI juega un papel en la lisis del desarrollo de *M. xanthus*.

OBJETO DEL TRABAJO

Como ya ha sido comentado, las mixobacterias son un grupo bacteriano con una característica peculiar, que es su capacidad para producir una amplia variedad de sustancias, tales como antibióticos, bacteriocinas, enzimas líticas, lipasas, nucleasas, proteasas, etc., que van a jugar un importante papel en la muerte y lisis de un espectro amplio de microorganismos.

Así, han sido descritos una amplia variedad de antibióticos producidos por distintas estirpes de mixobacterias, cada uno con unas características químicas y, espectro antimicrobiano diferentes. En nuestro laboratorio fue aislada una raza de *Myxococcus coralloides*, que, siempre que las condiciones de cultivo permitan su desarrollo, producía de manera constante un antibiótico que se acumulaba en el medio.

Desde este punto de vista, se ha planteado como objetivo en esta memoria, en primer lugar, la búsqueda de sustratos baratos para el cultivo en gran escala de esta mixobacteria, así como la inmovilización de las células de *Myxococcus coralloides* sobre geles de alginatos, carragininas, etc., a fin de conseguir una mayor acumulación de dicho antibiótico en los caldos de cultivo.

Por otro lado, se han realizado diversas experiencias encaminadas a un alargamiento de la fase de producción de antibiótico, mediante modificaciones en el medio de cultivo que prevengan la autólisis o el empleo de mutantes no autolíticos, así

OBJETO DEL TRABAJO

como la obtención de mutantes superproductores de esta actividad antibiótica,

MATERIAL Y METODOS

1. MICROORGANISMOS

1.1 *Myxococcus coralloides* D

Esta raza, fué obtenida a partir de *Myxococcus coralloides* por transferencias sucesivas en medio adecuado (Arias y Montoya, 1978), pudiendo crecer de forma dispersa en medio líquido.

Esta raza ha sido utilizada en todas las experiencias realizadas en este trabajo.

1.2 Otras bacterias

Se ha utilizado además *Staphylococcus aureus* ATTC-8, perteneciente a la colección del Departamento, ha sido utilizada como bacteria indicadora en los ensayos de actividad antibiótica.

2. MEDIOS DE CULTIVO

2.1 Medios de conservación y mantenimiento

Agar levadura

Este medio se ha utilizado para el mantenimiento y conservación de *M. coralloides* D. En este medio dicha mixobacteria produce cuerpos fructificantes viables durante varios meses. La composición de este medio es la siguiente:

Levadura prensada de panadería	10,0 g
Agar	20,0 g
Agua	1,0 l
pH	7,2

La levadura se añade después de filtrar el agar fundido, ajustando el pH con una solución de NaOH al 10 %. Se esteriliza a 117 °C, 20 minutos.

2.2 Medios de crecimiento

Medio CT

Se ha utilizado para el crecimiento de *M. coralloides* D.
Su composición es la siguiente:

Casitone-Difco	0,5 %
SO ₄ Mg	0,1 %
PO ₄ H ₂ K-PO ₄ HK ₂ O.	0,1 M
pH	6,5

Medio CTA

Se ha utilizado para el crecimiento de *M. coralloides* D.
Su composición es la siguiente:

Casitone-Difco	1,0 %
SO ₄ Mg	0,1 %
PO ₄ H ₂ K-PO ₄ HK ₂	0,01 M
Agar	1,8 %
pH	7,2

Agar común

Utilizado para el crecimiento de *S. aureus* con la siguiente composición:

Peptona	10,0 g
CINa	5,0 g
Extracto de carne Bovril	3,0 g
Agar	20,0 g
Agua	1,0 l

2.3 Medios para la medida cuali y cuantitativa de la actividad antibiótica

Medio "antibiotic medium-1"

Es un agar blando (BBL) con la siguiente composición:

Gelytase TM peptona	6,0 g
Tripticase TM peptona	4,0 g
Extracto de levadura	3,0 g
Extracto de carne	1,5 g
Glucosa	1,0 g
Agar	15,0 g
pH	6,5

MATERIAL Y METODOS

Medio "antibiotic medium-2"

Es un agar blando (BBL), con la siguiente composición:

Gelytase TM peptona	6.0 g
Extracto de levadura	3.0 g
Extracto de carne	1.5 g
Agar	15.0 g
pH	6.6

2.4 Medios para la producción de antibiótico

Medio CTG

Su composición es la siguiente:

Casitone-Difco	0,5 %
SO ₄ Mg	0,1 %
Glucosa	1,0 %
PO ₄ H ₂ K-PO ₄ HK ₂	0,01 M
pH	6,5

Medio TG

La misma composición que CTG, pero con triptona en sustitución del casitone.

Medio LPG

La misma composición que CTG, pero con levadura prensada de panadería al 1,0 %, en sustitución del casitone.

Medio ELG

La misma composición que CTG, pero con extracto de levadura al 1,0 %, en sustitución del casitone.

Medio PG

La misma composición que CTG, pero con peptona al 1,0 %, en sustitución del casitone.

Medio MG

La misma composición que CTG, pero con Extracto de Maíz al 1,0 %, en sustitución del casitone.

Medio PFG

La misma composición que CTG, pero con probión F-Hoechst al 1,0 %. Este sustrato corresponde a proteínas unicelulares de *Methylomonas clarae*, como producto crudo, en sustitución del casitone.

Medio PLG

La misma composición que CTG, pero con probión L-Hoechst al 1,0 %, en sustitución del casitone. Este sustrato está compuesto por proteínas unicelulares después de la extracción de lípidos y ácidos nucleicos seguido por hidrólisis enzimática.

Medio SPG

La misma composición que CTG, pero con Spirulina en polvo al 1,0 %, también se ha empleado Spirulina en pastilla, en este caso el contenido de una pastilla se disolvió en 700 ml, de medio base, ambas en sustitución del casitone.

Medio LG

La misma composición que CTG, pero con lactosuero al 1,0 %, en sustitución del casitone.

Medio AG

La misma composición que CTG, pero con almidón al 1,0 % en sustitución del casitone.

3. TECNICAS DE CULTIVO

3.1 Mantenimiento y conservación de *Myxococcus coralloides* D

El mantenimiento y crecimiento vegetativo se realizó por transferencias diarias en medio líquido CT, dada la capacidad de crecer en medio líquido de forma dispersa de esta mixobacteria.

Teniendo en cuenta la rápida autólisis que muestran los cultivos dispersos, para asegurar su conservación se ha procedido de la siguiente manera: células de un cultivo en fase exponencial de crecimiento eran recogidas por centrifugación y resuspendidas en medio CT adicionado de glicerol 0,5 M, el cual induce la formación de mixósporas.

3.2 Mantenimiento de otras bacterias

El mantenimiento de *Staphylococcus aureus*, se ha llevado a cabo por resiembras periódicas en tubos inclinados de agar. Tras la inoculación e incubación a 37 °C, posteriormente se conservaron en oscuridad y a 4 °C.

3.3 Condiciones de cultivo

Las condiciones de cultivo para mantener el crecimiento disperso de las células, en todas las experiencias realizadas fueron: agitación a 200 rpm, mantenida por todo el tiempo de incubación en un agitador Gallempak, y temperatura de 28 °C.

En los cultivos líquidos en agitación, para la determinación de la actividad antibiótica, se usaron matraces conteniendo 100 ml, del medio correspondiente, inoculados con 5 ml de un cultivo en medio CT, en fase exponencial de crecimiento de esta mixobacteria.

4. MEDIDAS DEL CRECIMIENTO BACTERIANO

4.1 Medidas turbidométricas

Estas medidas eran llevadas a cabo a intervalos regulares de tiempo determinando valores de absorbancia en un Spectronic 20.

4.2 Medidas de pH

Las mismas muestras empleadas en la medida anterior eran centrifugadas y a los sobrenadantes se les determinaba el pH por medidas en un pH-metro marca Radiometer Copenhagen pHM26.

4.3 Medidas del número de células por recuento directo

El número de células por mililitro fue determinado mediante una cámara de recuento de Petroff-Hausser.

Esta cámara presenta una depresión central dividida en 25 grupos de 16 celdillas. Cada una de las 400 celdillas tiene un área de $1/20 \times 1/20 \text{ mm}^2$ y su profundidad es $1/50 \text{ mm}$; por tanto, las células contadas en cada cuadro o celdilla corresponden a un volumen de:

$$1/20 \times 1/20 \times 1/50 \times 1/1000 \text{ cc} = 1/20 \times 10^6 \text{ cc}$$

Las muestras fueron colocadas en la cámara mediante pipetas Pasteur estériles, después de que el cubre objetos había sido depositado sobre el porta, para evitar la formación de burbujas de aire, y variaciones en la profundidad de la cámara.

Cuando la densidad celular era superior a 10^8 células/ml, se hizo necesario diluir la muestra y esta dilución se tuvo en cuenta posteriormente a la hora de hacer los cálculos.

Después de un periodo de tiempo, necesario para que las células dejaran de moverse, se hizo el recuento de los microorganismos en un microscopio de contraste de fase Zeiss KplW $10 \times 20/40$

Cada muestra fué contada al menos dos veces, dando un total de, al menos aproximadamente, 300 cuadros contados.

MATERIAL Y METODOS

El número de células por mililitro se obtuvo dividiendo el total de células entre el volumen de cada celdilla, y entre el número de celdillas contadas.

$$\text{células/ml} = \frac{\text{número de células contadas} \times 20 \times 10}{\text{número de celdillas contadas}}$$

En caso de dilución, esta se incluye en la expresión anterior como factor multiplicador.

5. ENSAYO DE ACTIVIDAD ANTIBIOTICA

5.1 Método de los discos

Los discos son de papel de cierta consistencia y de 6 mm de diámetro. El disco debe absorber una cantidad adecuada, aproximadamente de 0,002 ml; se procede a la impregnación por inmersión hasta que se absorba totalmente y de modo uniforme. Es imprescindible que a la hora del manejo, el disco esté totalmente seco, por lo que los discos deben estar envasados en recipientes herméticos y no es aconsejable sacar los discos del refrigerador y utilizarlos seguidamente, ya que a temperatura ambiente, pueden tomar algo de humedad y dificultar la difusión, por lo que hay que tener la precaución de que antes de abrir el vial, donde están los discos, este haya tomado la temperatura del laboratorio, evitándose de este modo condensaciones de agua en el interior.

5.2 Preparación del microorganismo de prueba

Se ha utilizado, como organismo de prueba en el ensayo de la actividad antibiótica, *Staphylococcus aureus*. Se preparan suspensiones de dicho microorganismo de la manera usual, en solución salina estéril, de forma que dichas suspensiones dan una absorbancia de 0,5 (equivalente a $2,7 \times 10^8$ células/ml) a 650 nm de densidad óptica, medida en un Spectronic 20.

5.3 Preparación de las placas

Se ha seguido el método de la doble capa. En el caso de placas de Petri de 20 x 10 mm se adicionan primero 10 ml de medio "antibiotic medium-2" como capa base. Una vez solidificado, se añaden 5 ml de "antibiotic medium-1" previamente inoculado con 0,2 ml de una suspensión de *S. aureus*, preparada como se ha reseñado anteriormente, mantenida a 45 °C.

Las placas han de estar en posición totalmente horizontal en el momento de ser preparadas, para evitar variaciones en el espesor del agar que puede afectar a la sensibilidad y reproductibilidad de las zonas de inhibición.

Antes de ser incubadas, las placas se dejan un tiempo de predifusión a temperatura ambiente (una hora), conservando su posición horizontal y evitando cualquier tipo de movimiento. Tras este tiempo, las placas se incuban a 37 °C. La lectura de los resultados, transcurridas 24 horas, se hace midiendo el diámetro del halo de inhibición del crecimiento de *S. aureus*, que destaca muy bien

MATERIAL Y METODOS

del resto del medio en el que, no habiendo llegado la difusión, persiste el crecimiento.

Se eligió el sistema del uso de los discos de papel impregnados de cultivo, aprovechando el hecho de que a la temperatura óptima de crecimiento del microorganismo prueba, 37 °C, apenas si crece la raza de *M. coralloides* D utilizada, no habiendo interferencia en la lectura de los halos de inhibición que aparecen alrededor de los correspondientes discos.

6. DETERMINACION DE LA CONCENTRACION DE ANTIBIOTICO EN LOS MEDIOS DE CULTIVO

La actividad antibiótica se expresa en unidades/ml entendiéndose por una unidad de actividad, a la correspondiente a un sobrenadante o extracto purificado del antibiótico que, cuando ensayado por la técnica de los discos, origina un halo de 9 mm de inhibición.

La relación existente entre las unidades de antibiótico y el halo de inhibición en mm, se expresan en la figura 2.

7. INMOVILIZACION DE CELULAS DE *MYXOCOCCUS CORALLOIDES* D

Para las experiencias de inmovilización de células de *M. coralloides* D, se ha utilizado la técnica del entrapamiento empleando polímeros naturales tales como: carragininas y alginatos. El procedimiento seguido es el siguiente: 1 ml de cultivo en fase logarítmica de *M. coralloides* D en medio CT era mezclado con 9 ml de

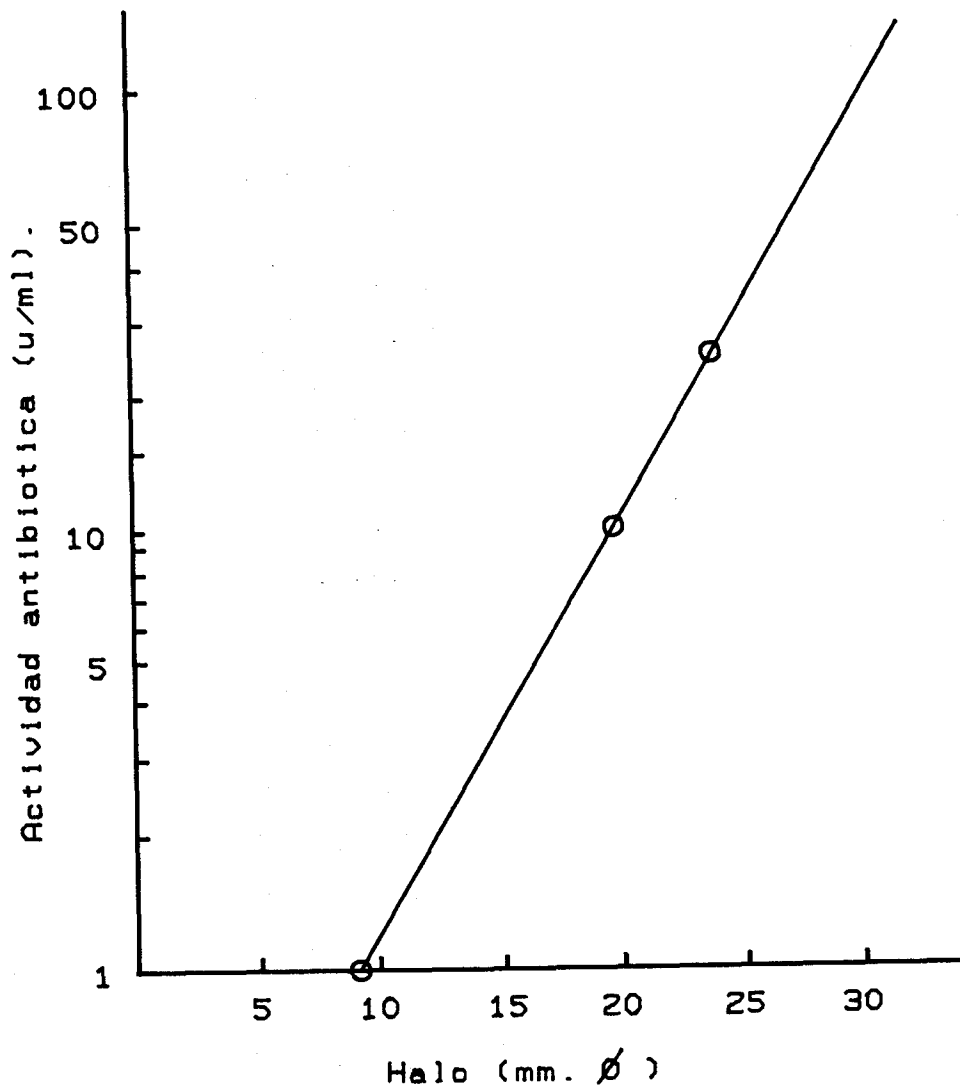


Figura 2. Relación existente entre las unidades de antibiótico y el halo de inhibición en mm.

MATERIAL Y METODOS

solución de carragininas al 2 %, mantenida a 43 °C, tras la agitación suave, el contenido de esta muestra era tomado con una jeringa e inmediatamente su contenido goteado en 50 ml de medio CT en frío conteniendo ClK 0,1 M. De esta forma se conseguía la formación de bolitas de geles conteniendo las células de *M. coralloides* D. Posteriormente las bolitas eran recogidas y repartidas en el medio de cultivo para la producción de antibiótico.

El mismo procedimiento seguido para la carragininina, se ha empleado para el alginato, pero empleado a una concentración del 1 %, ya que a concentraciones mayores impedía la formación de bolitas por dificultad a la hora de gotear con la jeringa. Además, en este caso, se ha empleado ClCa 0,1 M para la formación de las bolitas favoreciendo así la gelación y la estabilidad de las mismas.

8. CULTIVOS SUMERGIDOS DE *M. CORALLOIDES* D EN MEMBRANA DE DIALISIS

Estas experiencias eran llevadas a cabo en un matraz Kitasato de 2 litros, conteniendo 1,5 litros de medio de cultivo en donde estaba sumergida una membrana de diálisis conteniendo la suspensión de células.

Antes de describir el sistema diseñado, se comenta el procedimiento para la preparación de las membranas. Para ello se cortaban trozos adecuados de longitud apropiada de la membrana, se hervían durante diez minutos en una solución de bicarbonato sódico (2 %) y EDTA (1 mM), y, posteriormente se enjuagaba con agua destilada. A continuación, se hervía de nuevo durante diez minutos en agua destilada, enfriándose posteriormente a unos 4 °C, en los tratamientos de hervido hay que asegurar que la membrana permanezca siempre sumergida. Antes de usar las membranas es necesario un

MATERIAL Y METODOS

lavado por dentro y fuera de las mismas. Todo este procedimiento esta encaminado a conferir estabilidad a las membranas de diálisis.

Las membranas preparadas, como se ha descrito, eran ligadas a un tubo con tapón de goma con capilar para la aireación del cultivo dentro de la membrana de diálisis, este tubo está sujeto a la boca del matraz por un tapón de goma. Por la abertura lateral del Kitasato se introducía un tubo de teflón a fin de permitir la toma de muestras de los caldos de cultivo para las medidas de actividad de los mismos.

El matraz conteniendo el medio de cultivo y el sistema descrito, era esterilizado en el autoclave a 120 °C durante 20 minutos. Tras la inoculación con muestras de *M. coralloides* D en fase logarítmica, el sistema era puesto en funcionamiento, y la agitación de los caldos asegurada con un agitador magnético a 150 revol/min.

RESULTADOS

1.-ESTUDIOS SOBRE SUSTRATOS Y CONDICIONES OPTIMAS PARA LA PRODUCCION DE ANTIBIOTICO POR *Myxococcus coralloides* D.-

En este apartado, se incluyen una serie de experiencias encaminadas a estudiar diversos sustratos para la producción de antibiótico por esta mixobacteria, los cuales una vez probados y establecido el mas idóneo, fue determinada la concentración óptima para dicha producción.

Los sustratos ensayados han sido; extracto de levadura, peptona, triptona, extracto de maíz, levadura prensada de panadería, almidón, lactosuero, probión F, probión L, así como espirulina tanto en polvo como en pastilla.

A continuación se hace una exposición detallada de los resultados obtenidos para cada uno de ellos.

1.1.- EXTRACTO DE LEVADURA

El extracto de levadura, es uno de los sustratos usualmente utilizado para el crecimiento de microorganismos. Sin embargo para el *Myxococcus coralloides* D, no ha dado buen resultado.

RESULTADOS

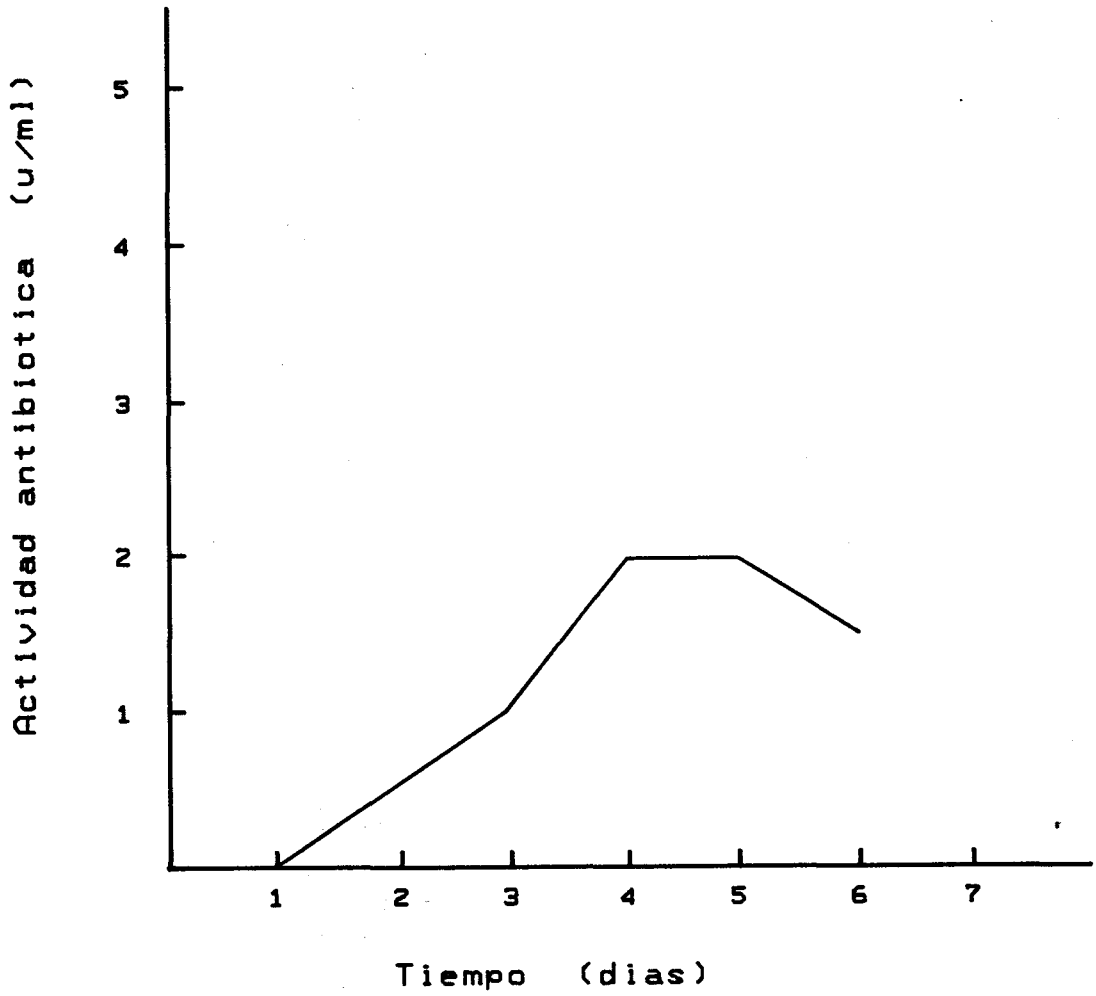


Figura 3. Producción de antibiótico por *Myxococcus coralloides* D en medio conteniendo extracto de levadura (1 %).

RESULTADOS

Los datos obtenidos cuando se utiliza este sustrato, en relación a masa celular y producción de antibiótico, se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1.- Producción de antibiótico por *Myxococcus coralloides* D en medio conteniendo extracto de levadura (1%).

a)	b)			c)
Tiempo Incubación	Densidad Optica	Nº cel/ml	pH	Actividad Antibiótica
1	0,01	4,6x10 ⁶	6,6	--
2	0,114	9,0x10 ⁷	6,7	--
3	0,15	3,7x10 ⁸	6,8	1
4	0,21	2,4x10 ⁸	7,0	2
5	0,20	2,3x10 ⁸	7,1	2
6	0,14	1,3x10 ⁸	7,3	1,5
7	0,043	3,0x10 ⁷	7,8	--

a) Días

b) Medida en absorbancia a 650nm

c) Expresada en unidades/ml.

Como puede observarse, el máximo de crecimiento se obtiene al cuarto día de incubación coincidiendo con la aparición de actividad antibiótica en los caldos de cultivo. Los valores de esta actividad frente al microorganismo de prueba, *Staphylococcus aureus*, están representados en la Figura 3. Como se puede observar dicha actividad antibiótica aparece tardíamente y con unos valores bastante bajos. El pH del cultivo se incrementa conforme avanza la

RESULTADOS

edad del cultivo, alcanzándose los máximos valores coincidiendo con la fase de lisis de los mismos.

1.2.- PEPTONA

La peptona ha sido otro de los sustratos ensayados para estudiar la producción de antibiótico por *M. coralloides* D. Los resultados se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2.- Producción de antibiótico por *Myxococcus coralloides* D en medio conteniendo peptona (1%).

a)	b)			c)
Tiempo Incubación	Densidad Optica	Nº cel/ml	pH	Actividad Antibiótica
1	0,215	$2,4 \times 10^6$	6,6	--
2	0,658	$7,1 \times 10^6$	6,6	2
3	0,959	$9,2 \times 10^6$	6,8	2,5
4	0,322	$3,7 \times 10^6$	7,0	2
5	0,251	$2,9 \times 10^6$	7,1	1,25
6	0,205	$2,0 \times 10^6$	7,1	--
7	0,193	$1,7 \times 10^6$	7,2	--

a) Días

b) Medida en absorbancia a 650nm

c) Expresada en unidades/ml.

Como se observa, el máximo crecimiento aparece al tercer día de incubación, coincidiendo con la aparición de los máximos de actividad antibiótica. Los valores correspondientes a dicha actividad

RESULTADOS

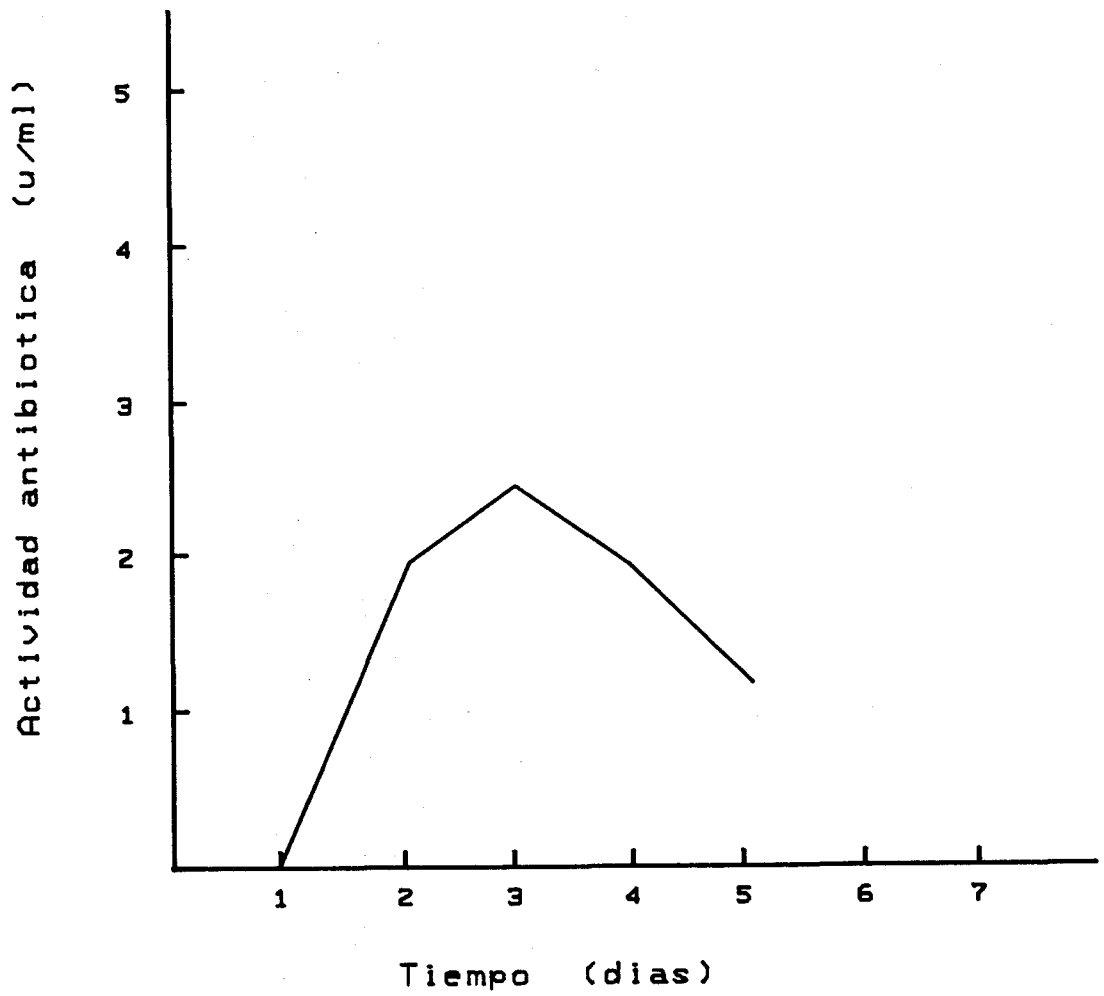


Figura 4. Producción de antibiótico por *Myxococcus coralloides* D en medio conteniendo peptona (1 %).

RESULTADOS

antibiótica se representan en la Figura 4. Como puede observarse dicha actividad aparece ya el segundo día de incubación, y alcanza el máximo al tercer día con un valor de 2,5 unidades/ml. El pH de cultivo se va incrementando paulatinamente en los sucesivos días de incubación, alcanzándose el máximo en la fase de lisis de dichos cultivos.

1.3.- TRIPTONA

La triptona ha sido un sustrato repetidamente ensayado en nuestro laboratorio, pues ha resultado ser uno de los sustratos más favorables para el crecimiento del *Myxococcus coralloides* D, sin embargo no existían datos sobre la producción de antibiótico.

Los resultados correspondientes a estas experiencias se encuentran en la Tabla 3.

Tabla 3.- Producción de antibiótico por *Myxococcus coralloides* D en medio conteniendo triptona.

a)	b)			c)
Tiempo Incubación	Densidad Optica	Nº cel/ml	pH	Actividad Antibiótica
1	0,578	$6,3 \times 10^6$	6,3	2
2	0,909	$9,0 \times 10^6$	6,5	5
3	1,046	$1,2 \times 10^7$	6,5	9
4	0,387	$4,0 \times 10^6$	6,8	9
5	0,310	$3,0 \times 10^6$	7,3	8
6	0,187	$1,9 \times 10^6$	7,5	8
7	0,119	$9,2 \times 10^7$	7,5	7

RESULTADOS

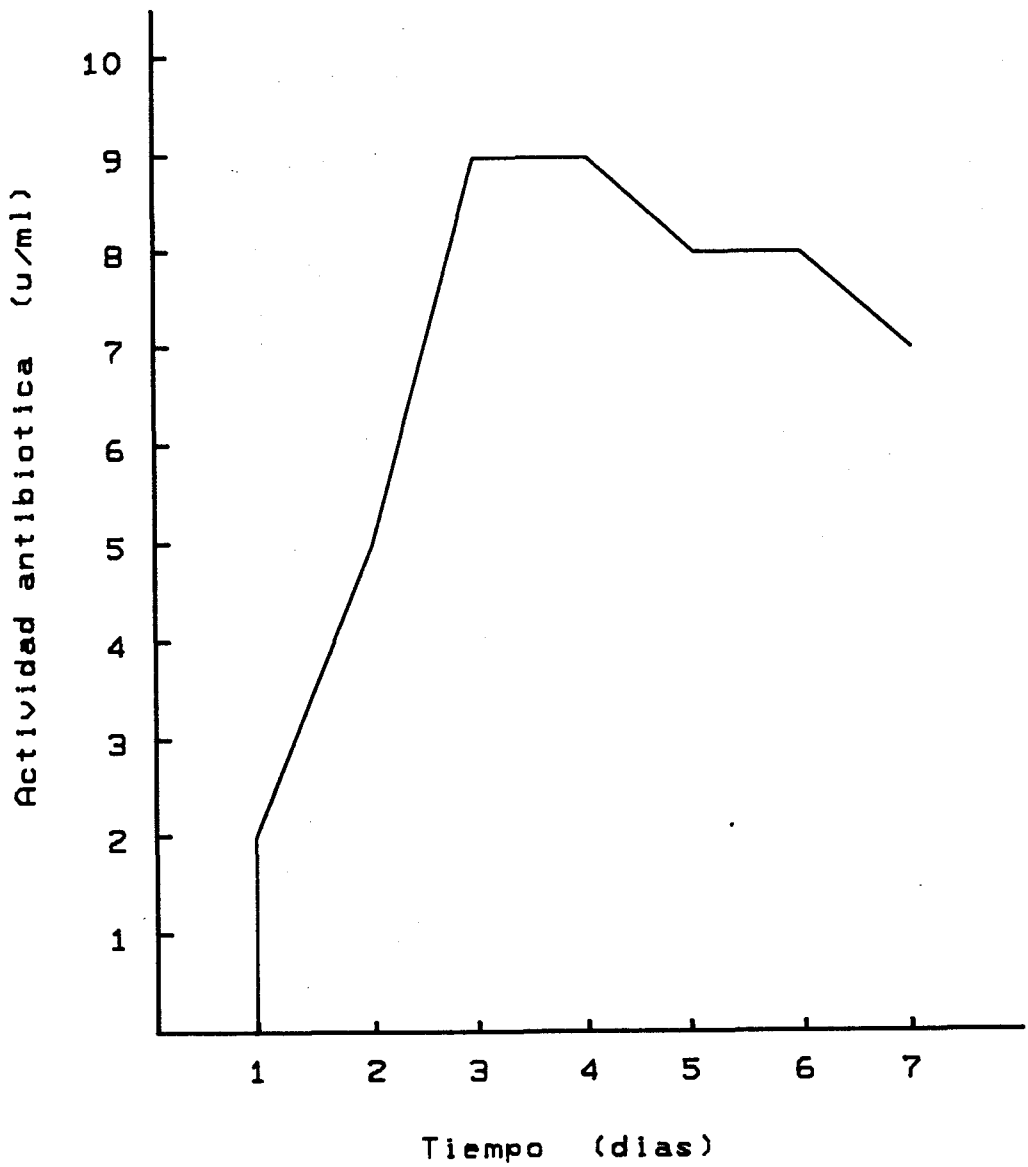


Figura 5. Producción de antibiótico por *Myxococcus coralloides* D en medio conteniendo triptona (1 %).

RESULTADOS

- a) Días
- b) Medida en absorbancia a 650nm
- c) Expresada en unidades/ml

Como se puede observar, los máximos de crecimiento, tanto densidad óptica y número de células, se alcanzan al tercer día de incubación. En este sustrato el *M. coralloides* D crece tempranamente. Los valores de actividad antibiótica se hallan representados en la Figura 5. Como se observa, dicha actividad antibiótica aparece más prontamente en los caldos de cultivo, alcanzándose el máximo de dicha actividad al tercer día con un valor de 9 unidades/ml. La actividad, además de ser bastante más elevada que en los casos anteriores, se mantiene prácticamente a lo largo de los días de incubación. En lo referente a los valores de pH este va ascendiendo a medida que va aumentando la edad del cultivo.

1.4.- EXTRACTO DE MAIZ

Otro de los sustratos ensayados ha sido el extracto de maíz. Los resultados correspondientes se encuentran en la Tabla 4. Como puede observarse, el crecimiento de *M. coralloides* D, ha sido poco importante para este sustrato; el máximo de crecimiento se alcanza al cuarto día de incubación, pero dando unos valores muy bajos. Los datos correspondientes a la actividad antibiótica están representados en la Figura 6. Como puede apreciarse, la actividad antibiótica aparece tardíamente y con unos valores bastante menores que los obtenidos en el caso anterior. Respecto a la evolución del pH, éste se va incrementando conforme va aumentando la edad del cultivo, alcanzándose el máximo en la fase de lisis de los cultivos, al igual que viene ocurriendo en todos los casos.

RESULTADOS

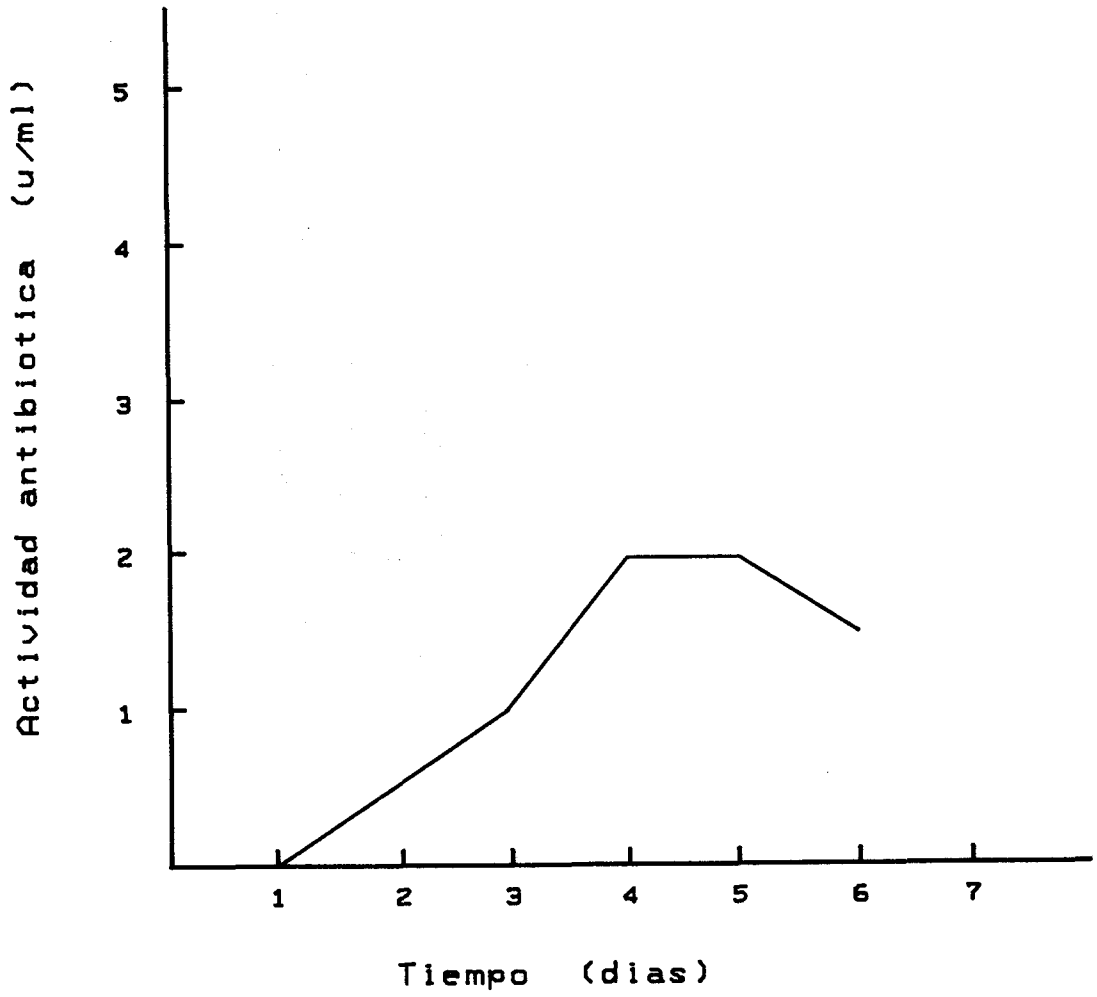


Figura 6. Producción de antibiótico por *Myxococcus coralloides* D en medio conteniendo extracto de maíz (1 %).

Tabla 4.-Producción de antibiótico por *Myxococcus coralloides* D en medio conteniendo extracto de maíz (1%).

a)	b)			c)
Tiempo Incubación	Densidad Óptica	Nº cel/ml	pH	Actividad Antibiótica
1	0,01	$4,6 \times 10^6$	6,5	--
2	0,093	$6,0 \times 10^7$	6,7	--
3	0,172	$1,5 \times 10^8$	6,8	1,25
4	0,231	$2,3 \times 10^8$	6,8	2,5
5	0,22	$2,1 \times 10^8$	7,1	2,5
6	0,134	$1,1 \times 10^8$	7,2	1,5
7	0,05	$2,0 \times 10^7$	7,8	--

a) Días

b) Medida en absorbancia a 550nm

c) Expresada en unidades/ml,

1.5.- LEVADURA PRENSADA DE PANADERIA

Este sustrato es normalmente empleado para la conservación de mixobacterias y como medio óptimo para la obtención de cuerpos fructificantes de estas bacterias,

Los resultados correspondientes para este sustrato se expresan en la Tabla 5. Como puede verse, el máximo de crecimiento referido tanto a densidad óptica como al número de células aparece al cuarto día de incubación, coincidiendo con la aparición de actividad en los caldos de cultivo.

RESULTADOS

Tabla 5.- Producción de antibiótico por *Myxococcus coralloides* D en medio conteniendo levadura prensada de panadería (1%).

a)	b)			c)
Tiempo Incubación	Densidad Optica	Nº cel/ml	pH	Actividad Antibiótica
1	0,019	$4,9 \times 10^6$	6,5	--
2	0,054	$2,2 \times 10^7$	6,7	--
3	0,195	$1,9 \times 10^8$	6,8	--
4	0,254	$3,0 \times 10^8$	7,0	1,25
5	0,233	$2,5 \times 10^8$	7,2	1
6	0,127	$9,5 \times 10^7$	7,3	1
7	0,032	$1,3 \times 10^7$	7,5	--

a) Días

b) Medida en absorbancia a 650nm

c) Expresada en unidades/ml

Los valores correspondientes a la actividad antibiótica se encuentran representados en la Figura 7. Como se puede apreciar la producción de antibiótico por *Myxococcus coralloides* D cuando se emplea levadura prensada como fuente nitrogenada, es insignificante; así es al cuarto día cuando aparece un máximo de actividad de 1,25 unidades/ml.

RESULTADOS

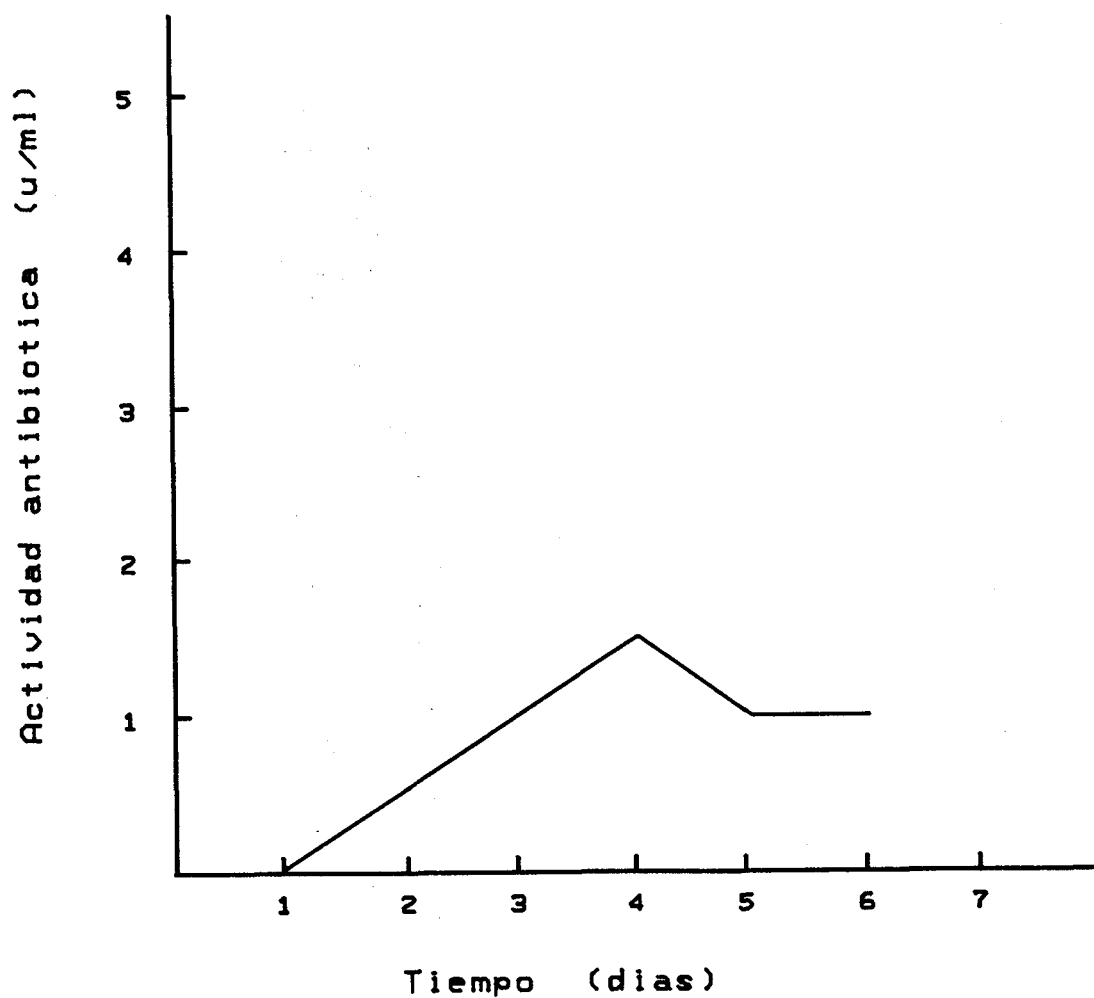


Figura 7. Producción de antibiótico por *Myxococcus coralloides* D en medio conteniendo levadura prensada de panadería (1 %).

1.6.- ALMIDON

Los resultados correspondientes a las experiencias en las que se ha utilizado almidón en sustitución del casitone se muestran en la Tabla 6.

Tabla 6.- Producción de antibiótico por *Myxococcus coralloides* D en medio conteniendo almidón (1%).

a)	b)	c)		
Tiempo Incubación	Densidad Optica	Nº cel/ml	pH	Actividad Antibiótica
1	0,014	$4,9 \times 10^6$	6,5	--
2	0,071	$3,0 \times 10^7$	6,5	--
3	0,155	$1,2 \times 10^8$	6,8	--
4	0,298	$3,0 \times 10^8$	6,9	--
5	0,257	$2,9 \times 10^8$	7,0	--
6	0,178	$1,5 \times 10^8$	7,1	--
7	0,033	$2,7 \times 10^7$	7,4	--

a) Días

b) Medida en absorbancia a 650nm

c) Expresada en unidades/ml

Como puede observarse el máximo de crecimiento se detecta al cuarto día de incubación con unos valores muy bajos. En cuanto a la actividad antibiótica, cuando *Myxococcus coralloides* D utiliza almidón como sustrato en los medios de cultivo, no produce antibiótico, los resultados expresados corresponden a la media de cuatro experiencias. Respecto al pH, éste va ascendiendo paulatinamente a lo largo de los sucesivos días de incubación hasta

RESULTADOS

alcanzar el máximo de su valor coincidiendo con la fase de lisis característica de esta mixobacteria,

1.7.- LACTOSUERO.

Este fue otro de los sustratos ensayados y los resultados se encuentran expresados en la tabla 7.

Tabla 7.- Producción de antibiótico por *Myxococcus coralloides* D en medio conteniendo lactosuero (1%),

a)	b)			c)
Tiempo Incubación	Densidad Óptica	Nº cel/ml	pH	Actividad Antibiótica
1	0,012	$4,7 \times 10^6$	6,6	—
2	0,058	$2,1 \times 10^7$	6,7	—
3	0,095	$6,1 \times 10^7$	6,7	1
4	0,198	$1,7 \times 10^8$	6,8	1,5
5	0,175	$1,5 \times 10^8$	6,9	1
6	0,132	$9,6 \times 10^7$	6,9	1
7	0,024	$1,2 \times 10^7$	7,0	—

a) Días

b) Medida en absorbancia a 650nm

c) Expresada en unidades/ml

Como puede observarse, los máximos valores, tanto para densidad óptica como número de células, se alcanzan al cuarto día de

RESULTADOS

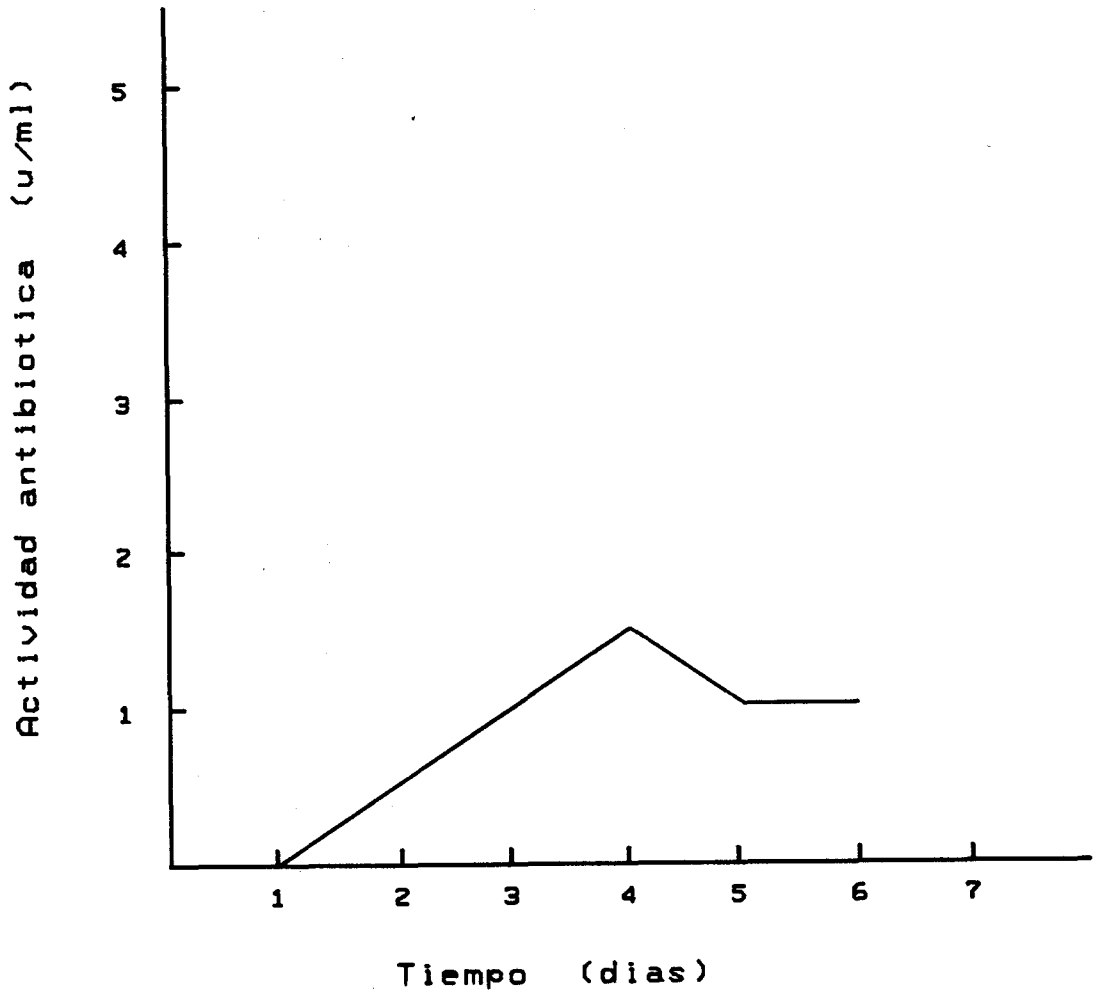


Figura 8. Producción de antibiótico por *Myxococcus coralloides* D en medio conteniendo lactosuero (1 %).

RESULTADOS

incubación, coincidiendo con el máximo de actividad antibiótica medida en los caldos de cultivo. Los valores correspondientes a dicha actividad antibiótica se representan en la Figura 8; como puede observarse, la actividad aparece tardíamente y con valores bastante bajos.

1.8.- PROBION F.

Como queda indicado, el Probión F corresponde a proteínas unicelulares (single cell protein) de *Methylomonas clarae*, (Schlingmann *et al.*, 1982)

Los resultados correspondientes a este sustrato, aparecen en la Tabla 8.

Tabla 8.- Producción de antibiótico por *Myxococcus coralloides* D en medio conteniendo Probión F (1%).

a)	b)			c)
Tiempo Incubación	Densidad Optica	Nº cel/ml	pH	Actividad Antibiótica
1	0,092	5,9x10 ⁷	6,4	—
2	0,146	1,5x10 ⁸	6,6	2
3	0,155	1,7x10 ⁸	6,6	2
4	0,184	2,0x10 ⁸	6,7	3,5
5	0,181	1,9x10 ⁸	6,8	2
6	0,137	1,1x10 ⁸	6,8	1,5
7	0,053	3,5x10 ⁷	6,9	—

RESULTADOS

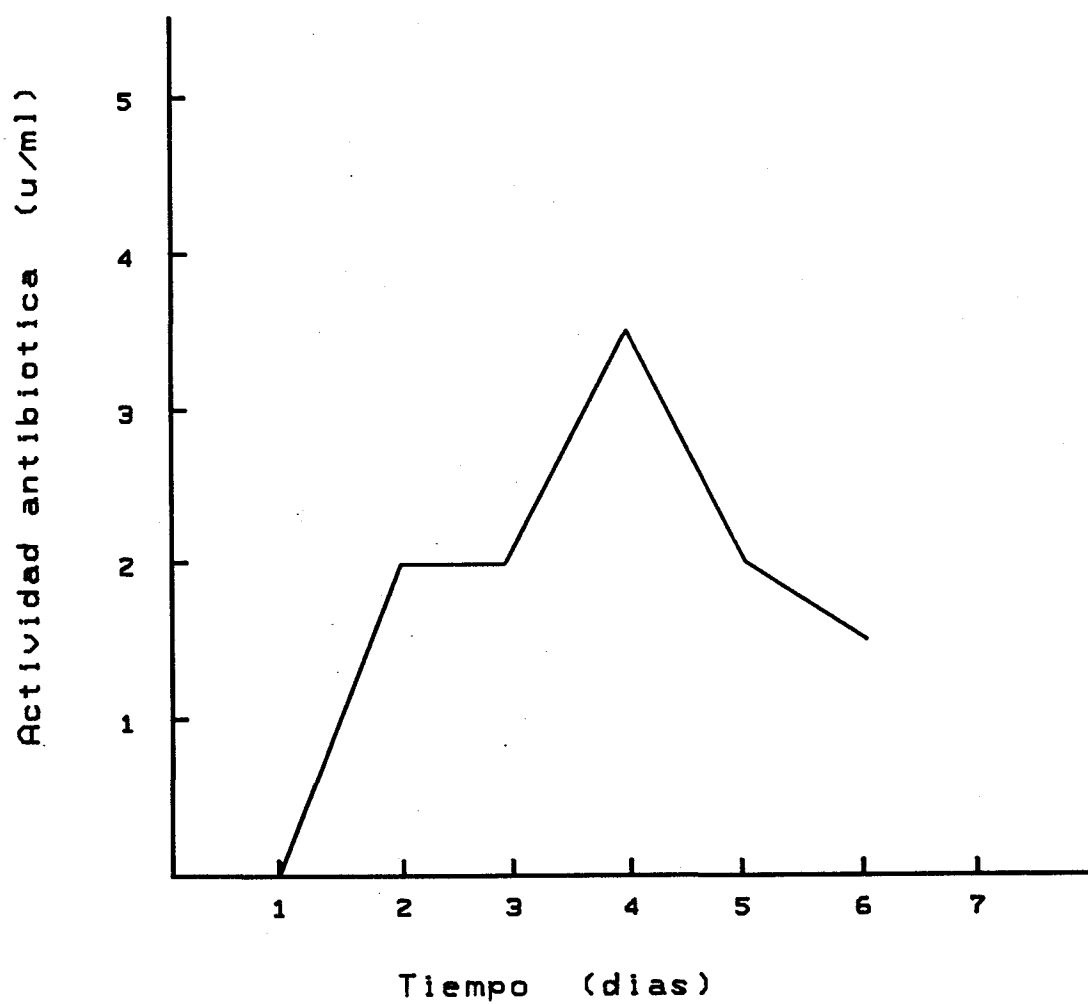


Figura 9. Producción de antibiótico por *Myxococcus coralloides* D en medio conteniendo Probión F (1 %).

RESULTADOS

- a) Días
- b) Medida en absorbancia a 650nm
- c) Expresada en unidades/ml

Los máximos valores relativos al crecimiento del *M. coralloides*, aparecen al cuarto día de incubación, coincidiendo dicho crecimiento con el valor máximo de actividad antibiótica, presente en los caldos de cultivo. Estos valores de actividad antibiótica están representados en la Figura 9.

1.9. PROBION L.

Este sustrato se obtiene a partir del *Methylomonas clarae* tras la extracción de lípidos y ácidos nucleicos seguidos por hidrólisis enzimática.

Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 9.

Tabla 9.- Producción de antibiótico por *Myxococcus coralloides* D en medio conteniendo Probión L, (1%).

a)	b)			c)
Tiempo Incubación	Densidad Optica	Nº cel/ml	pH	Actividad Antibiótica
1	0,160	$1,8 \times 10^6$	6,4	--
2	0,382	$3,8 \times 10^6$	6,4	2
3	0,391	$4,2 \times 10^6$	6,6	2
4	0,409	$5,0 \times 10^6$	6,6	4
5	0,347	$3,3 \times 10^6$	6,7	3,5
6	0,301	$3,0 \times 10^6$	6,8	2
7	0,120	$9,4 \times 10^7$	6,8	--

a) Días

b) Medida en absorbancia a 650nm

c) Expresada en unidades/ml

Como puede observarse el máximo de crecimiento se obtuvo al cuarto día de incubación. Los valores correspondientes a la actividad antibiótica se encuentran representados en la Figura 10. Como se puede observar, dicha actividad comienza a detectarse en los caldos de cultivo al segundo día de incubación alcanzándose el máximo de actividad al cuarto día de incubación con un valor de 4 unidades/ml. Respecto al pH, este sigue la misma evolución indicada para otros sustratos.

RESULTADOS

Figura 10. Producción de antibiótico por *Myxococcus coralloides* D en medio conteniendo Probién L (1 %).

1.10.- SPIRULINA POLVO

Otro de los sustratos ensayados ha sido un preparado de Spirulina, cianobacteria de agua dulce, utilizado también en alimentación, en el cual no se consiguen valores demasiado altos de crecimiento bacteriano del *M. coralloides* D. Los resultados correspondientes a este sustrato se encuentran en la tabla 10.

Tabla 10.- Producción de antibiótico por *Myxococcus coralloides* D medio conteniendo Spirulina Polvo (1%).

a)	b)			c)
Tiempo Incubación	Densidad Optica	Nº cel/ml	pH	Actividad Antibiótica
1	0,019	5,0×10 ⁶	6,5	--
2	0,082	3,3×10 ⁷	6,5	--
3	0,165	1,2×10 ⁸	6,6	1,5
4	0,273	2,5×10 ⁸	6,7	2,5
5	0,247	2,2×10 ⁸	6,7	2
6	0,152	1,1×10 ⁸	6,8	--
7	0,041	1,2×10 ⁷	6,8	--

a) Días

b) Medida en absorbancia a 650nm

c) Expresada en unidades/ml

Como puede observarse el crecimiento máximo se obtuvo el cuarto día de incubación. Los valores de actividad antibiótica, se encuentran representados en la Figura 11. Como se puede ver, la

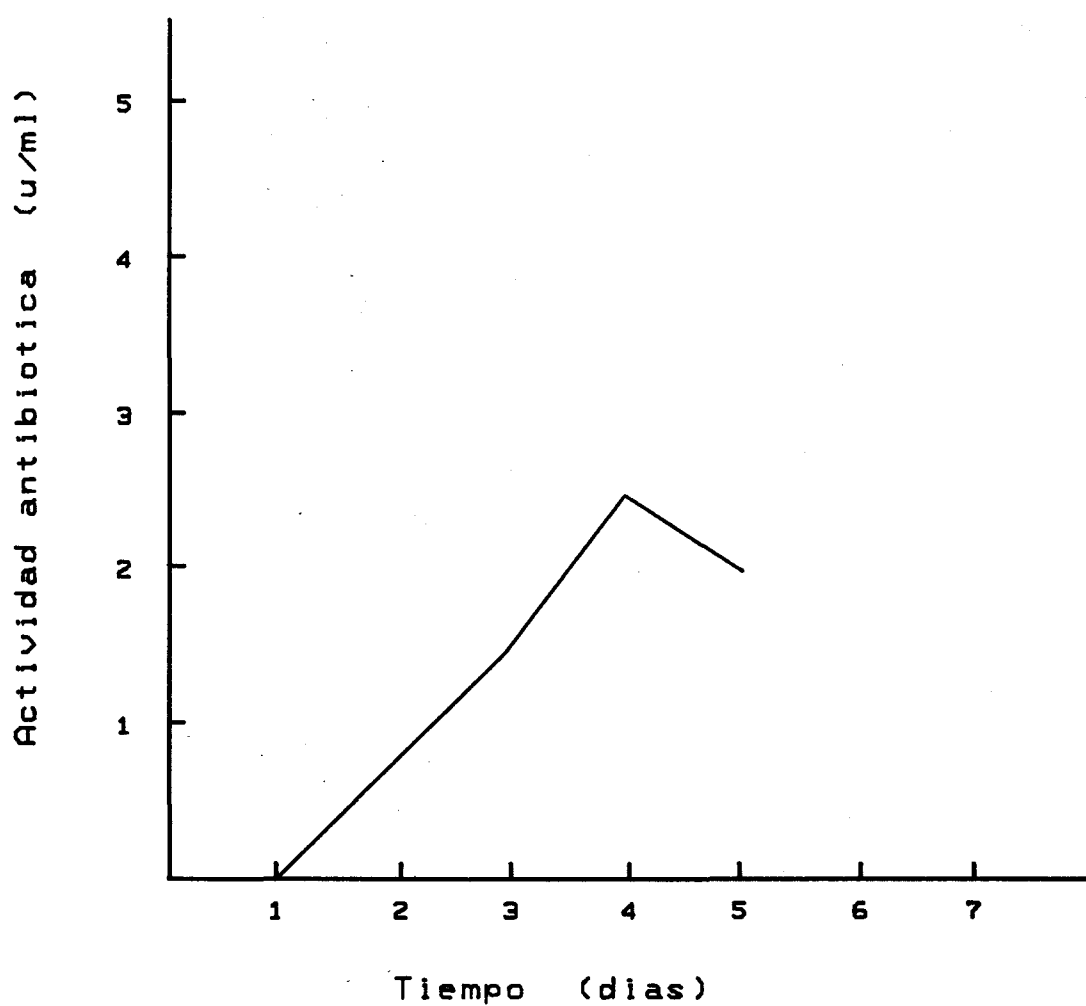


Figura 11. Producción de antibiótico por *Myxococcus coralloides* O en medio conteniendo Spirulina Polvo (1 %).

RESULTADOS

actividad aparece en los caldos de cultivo el tercer día de incubación alcanzando el máximo, como ya ha sido indicado, el cuarto día, coincidiendo los máximos valores de crecimiento bacteriano, con un valor de 2,5 unidades/ml.

1,11,-SPIRULINA PASTILLA

Este sustrato es similar al anterior, diferenciándose en su preparación.

Los resultados correspondientes a este sustrato se muestran en la Tabla 11.

Tabla 11.- Producción de antibiótico por *Myxococcus coralloides* D en medio conteniendo Spirulina Pastilla (1%).

a)	b)			c)
Tiempo Incubación	Densidad Optica	Nº cel/ml	pH	Actividad Antibiótica
1	0,015	$4,8 \times 10^6$	6,5	--
2	0,095	$3,9 \times 10^7$	6,5	--
3	0,185	$2,0 \times 10^8$	6,6	2
4	0,285	$2,9 \times 10^8$	6,6	3
5	0,272	$2,5 \times 10^8$	6,7	1,5
6	0,174	$1,7 \times 10^8$	6,8	1,5
7	0,083	$3,3 \times 10^7$	6,8	--

RESULTADOS

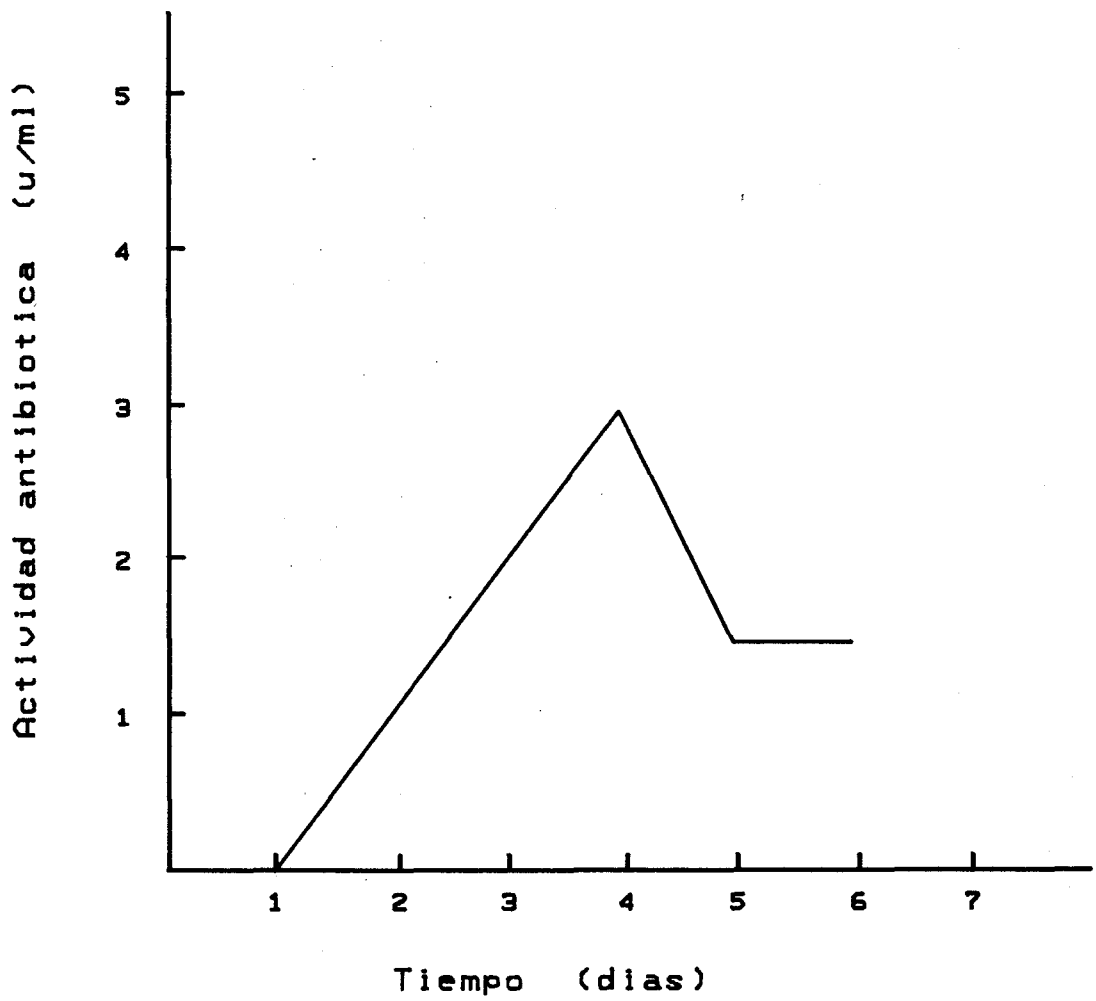


Figura 12. Producción de antibiótico por *Myxococcus coraloides* D en medio conteniendo Spirulina Pastilla (1 %).

RESULTADOS

- a) Días
- b) Medida en absorbancia a 650nm
- c) Expresada en unidades/ml

Como puede observarse, el máximo de crecimiento de esta mixobacteria, se encuentra al cuarto día de incubación. Los valores de la actividad antibiótica se encuentran representados en la Figura 12, en la cual se observa que el máximo de actividad antibiótica se detecta al cuarto día de incubación, con un valor de 2 unidades/ml, actividad baja y un poco tardía. El pH del cultivo se incrementa conforme avanza la edad del cultivo.

1.12.- RESUMEN DE LAS EXPERIENCIAS

De todas las experiencias realizadas utilizando los sustratos descritos anteriormente, podemos concluir que los mejores resultados se obtuvieron cuando se utilizó la triptona, y es por ello por lo que se estimó conveniente, determinar la concentración óptima del mismo para la producción de antibiótico por *M. coralloides D.*

Para ello se eligieron concentraciones comprendidas entre 0,1% y 2%. Los resultados se expresan en las tablas 12, 13, 14 y 15 y en la gráfica 13.

Tabla 12.- Producción de antibiótico por *Myxococcus coralloides* D
en medio conteniendo triptona (0,1%).

a)	b)			c)
Tiempo Incubación	Densidad Optica	Nº cel/m	pH	Actividad Antibiótica
1	0,018	$4,8 \times 10^6$	6,5	--
2	0,104	$8,7 \times 10^7$	6,6	--
3	0,193	$1,8 \times 10^8$	6,6	1,5
4	0,274	$2,9 \times 10^8$	6,7	2,5
5	0,223	$2,6 \times 10^8$	6,7	2
6	0,152	$1,5 \times 10^8$	6,8	1
7	0,110	$8,9 \times 10^7$	6,8	-

a) Días

b) Medida en absorbancia a 650nm

c) Expresada en unidades/ml.

RESULTADOS

Tabla 13.- Producción de antibiótico por *Myxococcus coralloides* D en medio conteniendo triptona (2%).

a)	b)			c)
Tiempo Incubación	Densidad Óptica	Nº cel/ml	pH	Actividad Antibiótica
1	0,122	$9,6 \times 10^7$	6,6	--
2	0,198	$1,8 \times 10^8$	6,7	2
3	0,277	$3,0 \times 10^8$	6,7	2,5
4	0,328	$3,7 \times 10^8$	6,8	3,5
5	0,255	$2,9 \times 10^8$	6,8	2
6	0,170	$1,9 \times 10^8$	6,9	2
7	0,132	$1,6 \times 10^8$	7,0	-

a) Días

b) Medida en absorbancia a 650nm

c) Expresada en unidades/ml

RESULTADOS

Tabla 14.- Producción de antibiótico por *Myxococcus coralloides* D en medio conteniendo triptona (0,5%).

a)	b)			c)
Tiempo Incubación	Densidad Óptica	Nº cel/ml	pH	Actividad Antibiótica
1	0,115	$9,1 \times 10^7$	6,6	--
2	0,223	$2,2 \times 10^8$	6,6	2
3	0,395	$4,2 \times 10^8$	6,7	3
4	0,520	$6,0 \times 10^8$	6,8	3,5
5	0,428	$5,1 \times 10^8$	6,8	2,5
6	0,330	$3,5 \times 10^8$	6,9	2
7	0,214	$2,0 \times 10^8$	7,0	--

a) Días

b) Medida en absorbancia a 650nm

c) Expresada en unidades/ml

Tabla 15.- Producción de antibiótico por *Myxococcus coralloides* D en medio conteniendo triptona (1%).

	a)	b)		c)
Tiempo Incubación	Densidad Óptica	Nº cel/ml	pH	Actividad Antibiótica
1	0,563	$6,2 \times 10^8$	6,6	3,5
2	0,948	$9,2 \times 10^8$	6,7	7,5
3	1,122	$1,5 \times 10^9$	6,7	9
4	0,455	$5,3 \times 10^8$	6,8	5,25
5	0,387	$4,0 \times 10^8$	6,9	4,5
6	0,195	$1,8 \times 10^8$	7,0	3
7	0,118	$9,5 \times 10^7$	7,1	2

a) Días

b) Medida en absorbancia a 650nm

c) Expresada en unidades/ml

Como se puede observar cuando se emplea una concentración de 0,1%, el crecimiento es poco importante, alcanzándose el máximo en dicho crecimiento al cuarto día de incubación. En lo referente a la actividad antibiótica medida en los caldos de cultivo, se encuentra al cuarto día de incubación alcanzando un valor de 2,5 unidades/ml. Cuando la concentración utilizada fue del 0,5%, se puede observar igualmente un bajo crecimiento bacteriano, lo cual se corresponde con la baja actividad antibiótica en los caldos de cultivo, con un máximo de 3,5 unidades/ml. Sin embargo, cuando la concentración utilizada fue del 1%, el crecimiento bacteriano fue muy superior, encontrándose el máximo de crecimiento bacteriano al tercer día de incubación, lo cual coincide con el máximo de actividad

RESULTADOS

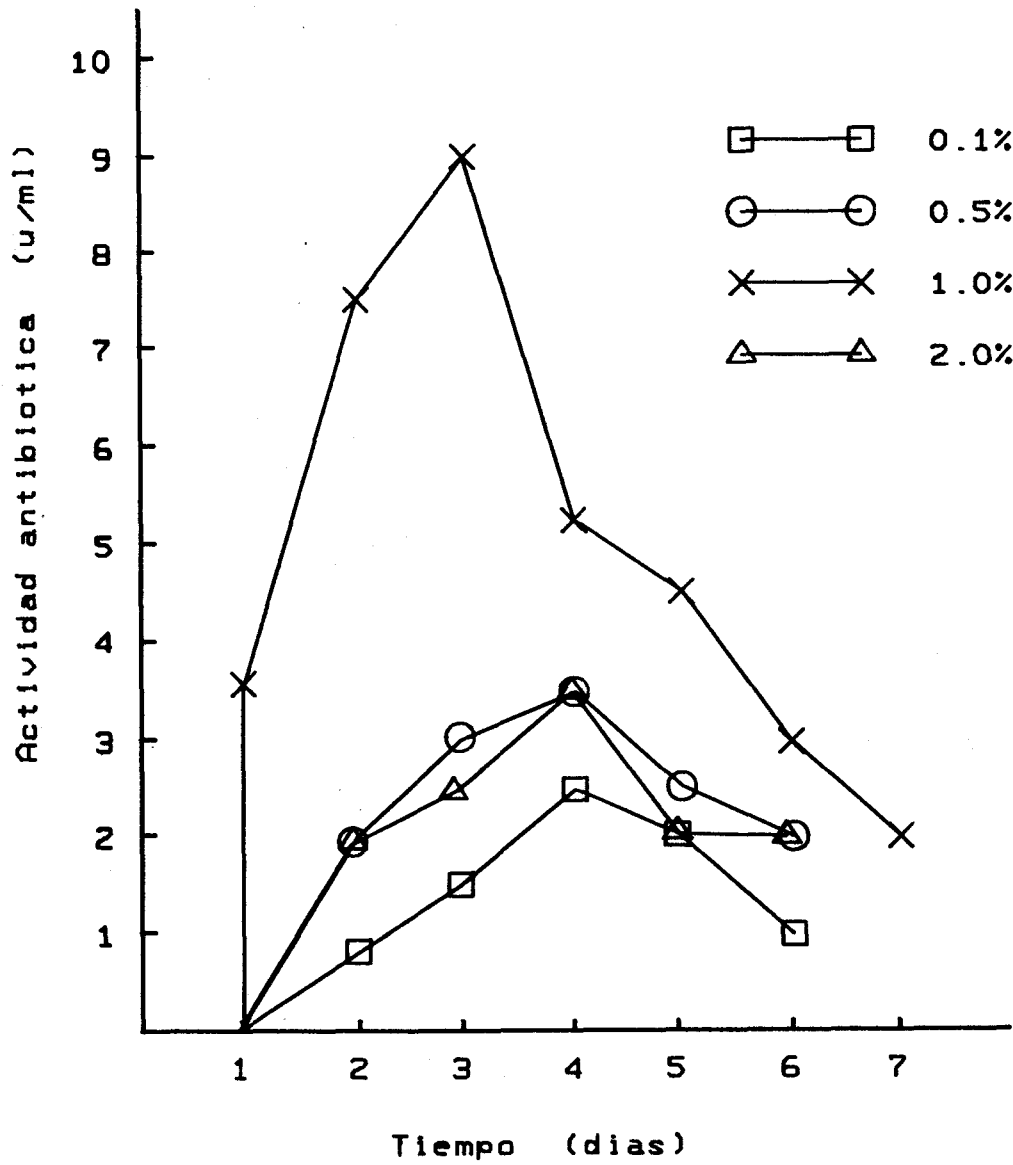


Figura 13. Producción de antibiótico por *Myxococcus coralloides* D en medio conteniendo triptona a concentraciones comprendidas entre un 0,1 % y 2 %.

RESULTADOS

antibiótica encontrada en los caldos de cultivo, 9 unidades/ml. Cuando la concentración utilizada fué del 2%, el máximo de crecimiento bacteriano se alcanzó al cuarto día de incubación, coincidiendo con el máximo de actividad antibiótica. Por tanto, como se puede deducir de estas experiencias, la triptona al 1% resultó ser la concentración óptima para la producción de este antibiótico por la mixobacteria.

2.- INMOVILIZACION DE CELULAS DEL *M. coralloides* D.

El método utilizado, como ya quedó indicado en el capítulo correspondiente de Material y Métodos fue el de entrapamiento sobre geles, utilizándose para ello polímeros naturales como alginato cálcico y carraginata.

Tanto para uno como para otro, la actividad de los caldos de cultivo fue negativa. No obstante fue necesario comprobar si las células dentro de las bolitas de geles permanecían viables. Para ello fue necesario disolver las bolitas de alginato y de carraginata utilizándose una solución de citrato sódico al 1%. A fin de comprobar si las células de *M. coralloides* D se habían lisado o si por el contrario permanecían viables, una vez disueltas se tomaban muestras y se sembraban tanto en medios sólidos como en medios líquidos. En ambos casos se observó crecimiento de la mixobacteria.

Por otro lado la incubación prolongada de estos cultivos llevaba a la lisis de los geles.

3.- ALARGAMIENTO DE LA FASE DE PRODUCCION DE ANTIBIOTICO.

Con estas experiencias se pretendía prolongar la fase de producción de antibiótico, bien mediante modificaciones en el medio de cultivo a fin de prevenir la lisis de la mixobacteria, o bien por el empleo de mutantes no autolíticos. A continuación se detallan los resultados correspondientes a cada caso.

3.1.- MODIFICACIONES EN EL MEDIO DE CULTIVO A FIN DE PREVENIR LA AUTOLISIS.

El fosfato tiene un efecto considerable en la prevención de la autólisis del *M. coralloides* (Fernandez-Vivas, 1983). Es por ello que se consideró interesante comprobar la influencia del fosfato sobre la producción de antibiótico.

Se utilizaron concentraciones comprendidas entre 1 y 50mM, y los resultados se muestran en la Tabla 16.

Tabla 15.- Actividad antibiótica en sobrenadante de cultivo de *Myxococcus coralloides* D en función de la concentración de fosfato del medio de cultivo (1).

a)	Concentración de fosfato						
	1mM	5mM	10mM	20mM	30mM	40mM	50mM
Tiempo							
Incubación							
1	-	-	1,5	2,0	-	-	-
2	-	1,0	4,0	5,0	-	-	-
3	-	1,0	7,0	7,5	2,0	-	-
4	1,0	1,0	8,5	8,0	2,0	-	-
5	-	-	8,5	8,5	-	-	-
6	-	-	7,0	7,5	-	-	-
7	-	-	7,0	7,0	-	-	-

a)Días

(1) Actividad antibiótica en unidades/ml

Como puede observarse, la producción es máxima a una concentración de 10mM del citado ión, por encima de una concentración de 20mM esta producción disminuye de una forma acusada. El rango de concentraciones de este ión que permite la síntesis del antibiótico, oscila entre 1 y 30mM.

3.2.- EMPLEO DE MUTANTES NO AUTOLITICOS

Para ello se han utilizado los agentes clásicos, nitrosoguanidina y luz ultravioleta.

Para los tratamientos con nitrosoguanidina se ha procedido de la manera usual, utilizando una concentración de 100 µg/ml durante 30 minutos a 30°C. Posteriormente, las células eran lavadas y resuspendidas en medio de cultivo y con esta suspensión se inoculaban matraces nefelómetros que permiten el seguimiento de la lisis.

Para la luz ultravioleta, se tomaban cultivos en fase exponencial de crecimiento y, previamente a la irradiación, eran centrifugados dos veces y resuspendidos en sulfato magnésico 0,1 mM, con objeto de eliminar las sustancias orgánicas del medio, las cuales absorben la luz ultravioleta. Se tomaban muestras de 5ml de las muestras lavadas y se colocaban en una caja de Petri de 5 cm de diámetro. La irradiación se llevaba a cabo con una lámpara Sylvania de 16 W, y una dosis de 90 J/m²; (Muñoz, J. 1985). Posteriormente las células eran traspasadas a matraces nefelómetros, conteniendo 40 ml de medio CT.

Los resultados obtenidos han sido negativos para ambos agentes, no pudiéndose obtener ningún mutante no autolítico. A pesar de ello, se insistió, por el gran interés que podía ofrecer la búsqueda de ellos, por recogida de las células que quedasen viables en los matraces nefelómetros y resuspensión en medios líquidos frescos e incluso en medios sólidos.

A pesar de los distintos intentos con modificaciones para cada uno de los casos, no se ha llegado a conseguir un cultivo del *M. coralloides* D que no se lise o que lo hiciera mas lentamente.

4.- OBTENCION DE MUTANTES SUPERPRODUCTORES

Paralelamente a los tratamientos con agentes mutagénicos descritos en el apartado anterior, se intentó la búsqueda de mutantes superproductores.

Los resultados fueron positivos cuando se utilizó la nitrosoguanidina, obteniéndose una serie de mutantes que resultaron ser superproductores de antibióticos. De entre ellos los más significativos designados como McLm7₁, McLm8₂ y McLm8₇₁, daban lugar a unos halos de actividad entre 40 y 60 mm de diámetro, cuando se ensayaba la producción de antibiótico en medio sólido. Estos exagerados halos de inhibición, llegaron incluso a enmascarar y dificultar su aislamiento. Sin embargo, cuando estos mutantes fueron probados para la producción de antibiótico en medios líquidos, sorprendentemente se encontró que se lisaban antes que la estirpe de la cual procedían utilizada como control comparativo. La actividad de los correspondientes caldos de cultivo fueron similares e incluso mas bajos que para la estirpe de partida.

A la vista de estos resultados se pensó que quizás el antibiótico pudiera ejercer una actividad tipo autocida, que en medio sólido se produjera un drenaje en profundidad de la sustancia activa y en medio líquido se alcanzara una concentración crítica y actuara sobre la raza productora. Es por ello que se consideró interesante cultivar a estos mutantes superproductores en un sistema de cultivo en membrana de diálisis sumergida, que permitiera el drenaje de

RESULTADOS

metabolitos producidos por esta mixobacteria, como se describe en el apartado correspondiente de Material y Métodos.

En relación con ello, en el interior de la membrana de diálisis se alcanzaban unas densidades celulares de 10 ó 12 veces mayores que en cultivos abiertos o convencionales, no obstante la actividad de los caldos de cultivo resultó ser prácticamente nula en comparación con la raza silvestre de *M. coralloides* D.

La incubación prolongada de la mixobacteria en este sistema termina con la rotura de la membrana de diálisis, esto resultaba sorprendente dado que previamente a su empleo se procedía a conferirle mayor estabilidad, como quedó indicado en el apartado correspondiente de Material y Métodos.

DISCUSSION

En este apartado, y basándonos en los resultados obtenidos en la realización de esta memoria y que han sido expuestos en el capítulo correspondiente, se pretende dar una visión general acerca de la producción de antibiótico por *M. coralloides* D, tanto en lo referente al empleo de diferentes sustratos, inmovilización de células, y alargamiento de la fase de producción, como en el empleo de mutantes, a fin de determinar las condiciones óptimas para dicha producción.

Recientemente, el interés de las mixobacterias en el área de biotecnología ha aumentado considerablemente como productoras de lectinas (Cumsky y Zusman 1979) y enzimas líticas (Hart y Zahler 1966; Hüttermann 1969), de bacteriocinas (Mc Curdy y Mac Rae 1974; Hirsch 1977) y de metabolitos secundarios como antibióticos (Rosenberg et al 1973; Gerth et al 1980, 1982 a, b, 1983; Irschik et al 1983; Kunze et al 1982). Aparentemente, todas estas actividades pueden jugar un importante papel en las actividades predatorias de estas bacterias. Además, algunos de ellos pueden tomar parte en el desarrollo autolítico que precede a la formación de cuerpos fructificantes y esporulación.

Ahora bien, la aplicación práctica en el campo biotecnológico, implica la fermentación a gran escala y, esto es factible sólo si pueden ser usados medios baratos para la producción. Las mixobacterias utilizan pobremente los azúcares sencillos y los polisacáridos, pero tienen eficientes enzimas proteolíticas, y pueden crecer muy bien sobre medios conteniendo

DISCUSION

Dichas actividades bacteriolíticas comentadas anteriormente, pueden ponerse así mismo de manifiesto, en el crecimiento que experimenta *M. coralloides* D sobre levadura prensada de panadería. El cultivo de mixobacterias sobre placas de agar con levadura de panadería es un método standard para conservar cultivos (Reichenbach y Dworkin, 1981), y los enzimas de mixobacteria que intervienen en la lisis de las células levadura han sido estudiados (Bender 1963; Borchers 1982), si bien no perfectamente caracterizados. El cultivo en medio líquido utilizando células de levadura fue descrito por primera vez por Nolte (1957); sin embargo, las levaduras no han sido aún usadas como un sustrato barato en fermentación. En nuestro caso tanto cuando se utilizó levadura prensada de panadería como sustrato, como cuando se usó extracto de levadura, la producción antibiótica no fue muy elevada.

Un excelente sustrato para la generalidad de las mixobacterias (a excepción de las celulolíticas) es el Probión (Gerth *et al.*, 1984). Este fue el sustrato elegido para la producción del antibiótico producido por *M. fulvus*, obteniéndose resultados comparables a los obtenidos con peptona; sin embargo, los niveles de actividad antibiótica fueron superiores sobre el Probión y especialmente Probión L. En el caso del Probión, el *M. coralloides* crece bien, tanto en el producto crudo (Probión F) como en el producto de hidrólisis enzimática (Probión L), si bien, los mejores resultados tanto en crecimiento como en actividad antibiótica se obtuvieron para el Probión L.

No obstante la producción de antibiótico está muy disminuida respecto a otros sustratos, por ejemplo la triptona (que se comenta mas adelante), y en relación a otras mixobacterias. Así la producción de antibiótico (myxothiazol) por *Myxococcus fulvus*, se ve incrementada cuando se utiliza Probión, obteniéndose incluso un rendimiento mayor que para las células de levadura (Gerth *et al.*

DISCUSION

1990). Similares resultados se obtienen para la producción de myxalamida, antibiótico producido por *M. xanthus* (Gerth, 1983), en este caso cuando la mixobacteria crece sobre Probión o extracto de maíz, la producción de antibiótico es cinco veces mayor que cuando se emplea peptona.

Otro sustrato también utilizado fue el lactosuero. Cuando esta mixobacteria fue cultivada en dicho sustrato, se pudo observar un ligero crecimiento. Este medio responde a una composición muy equilibrada, la cual en g/l es la siguiente: lactosa 45-50 %, proteínas: 7-9 %, materias solubles 1,5 %, lípidos 1-2 %, sales minerales 6-8 %, materias secas 63-70 %, (Rivière, 1975). Sin embargo, la producción de antibiótico en este medio fue una de las más bajas.

El almidón, es el único sustrato en el que no se ha podido detectar actividad antibiótica de *M. coralloides* D, aunque dicha mixobacteria crecía en este sustrato. Evidentemente, parece indicar la presencia en *M. coralloides* D de las amilasas correspondientes, las cuales también se ponen de manifiesto en el crecimiento que experimenta dicha mixobacteria sobre el extracto de maíz, el cual también posee almidón en una considerable cantidad. No obstante el medio conteniendo almidón no parece ser el adecuado para la producción de antibiótico, y quizás, fuese necesario modificar ciertas variables en dicho medio de cultivo.

De todos los sustratos utilizados, los mejores resultados para la producción de antibiótico por *M. coralloides* D se obtuvieron cuando se empleó la triptona. Pero no solamente para la producción de antibiótico, sino también en lo referente al crecimiento bacteriano, alcanzándose altos niveles de densidad celular. Es por ello, por lo que se probaron diferentes concentraciones de este sustrato a fin de conocer la concentración

DISCUSION

óptima del mismo, habiéndose obtenido que, es la concentración del 1% la más óptima para la producción de antibiótico por *M. coralloides*. Además, para la triptona en general y especialmente cuando se emplea a una concentración de 1 % no solamente se alcanzan valores muy superiores en dicha actividad antibiótica con respecto a los restantes sustratos y concentraciones de este mismo sustrato, sino que, además, dicha actividad empieza ya a detectarse en los caldos de cultivo al primer día de incubación, manteniéndose hasta el último día, si bien, el máximo de 9 unidades/ml es obtenido al tercer día de incubación.

Como ha sido reflejado, las mixobacterias tienen una amplia variabilidad con respecto a su capacidad de utilizar nutrientes, pero a menudo combinaciones de distintos sustratos parecen dar mejores resultados para la producción de distintos metabolitos, entre ellos los antibióticos, que un sustrato simple. Así, las mixovirescinas, una familia de antibióticos producidos por *M. virescens Mx v48*, se producen cuando la bacteria crece sobre un medio que contenga: un 0,4 % de *corn steep*, un 0,1 % de harina de soja y un 0,1 % de peptona y sales (Gerth, 1982b). Consecuentemente al menos, los costes de los sustratos no deben impedir el uso de las mixobacterias para procesos de biotecnología en el futuro.

Como se comentó anteriormente y dada la importancia que los aminoácidos tienen para la nutrición de las mixobacterias y para la producción de antibiótico en particular, podría también pensarse que estos aminoácidos entrarán a formar parte del compuesto o compuestos que poseen actividad antibiótica. Sin embargo, se ha demostrado que el antibiótico producido por *M. coralloides D*, es bastante resistente al tratamiento con enzimas proteolíticas (Arias *et al.* 1979), lo cual parece descartar una composición peptídica, si bien los datos correspondientes a su composición no son conocidos.

DISCUSION

Otro de los resultados incluidos en el apartado anterior son los correspondientes a inmovilización de células. La inmovilización de células microbianas es llevada a cabo bajo condiciones adecuadas para el mantenimiento de la actividad de las células. Los métodos de inmovilización pueden ser clasificados dentro de tres categorías: unidas a un transportador, entrecruzamiento y métodos de entrapamiento. El método elegido para la inmovilización de células de *M. coralloides* D fue por entrapamiento de las células dentro de matrices de polímeros naturales, y concretamente, el alginato cálcico y la carragininina fueron los utilizados.

La carragininina es un preparado aislado de algas marinas, no resulta tóxico, y es uno de los más utilizados, su composición es: β -D galactosa sulfato y 3,6 anhidro α -D galactosa. Su preparación es fácil y similar al agar, funde al calentar y la gelación ocurre al enfriar y añadiendo ciertos iones tales como K^+ , NH_4^+ , Ca^{2+} , etc. Además entre las ventajas de este polímero cabe destacar, la obtención de unos mejores rendimientos, así como que las células son más estables.

En cuanto al gel de alginato cálcico ha sido utilizado desde 1975 para la inmovilización de células y enzimas. En 1977, Kierstan y Bucke encontraron que este gel proveía una matriz apropiada para la inmovilización por entrapamiento de todas las células microbianas, orgánulos subcelulares y enzimas aislados. La ventaja de este método de inmovilización es que se puede hacer bajo condiciones adecuadas sin el uso de inactivadores químicos de la actividad enzimática. Otra ventaja de este método es la existencia de varias formas de inmovilización de células microbianas tales como en bolitas, que fue el elegido por nosotros, en cubos y membranas.

DISCUSION

Tanto alginato como carragininina pueden ser rápidamente disueltos y obtenida una suspensión celular.

Sin embargo, si bien este método de inmovilización de células ha dado muy buenos resultados en el caso de producción de metabolitos secundarios y en concreto de antibióticos, en nuestro caso los resultados fueron negativos y no se pudo detectar actividad antibiótica en los caldos de cultivo. No obstante, si hubo crecimiento bacteriano dentro de dichos geles, pues al disolver las bolitas de alginato cálcico y de carragininina y posterior resiembra, tanto en medios sólidos como en medios líquidos, se observó crecimiento de esta mixobacteria, lo cual indica, por supuesto, que las células siguen siendo viables.

Un dato a destacar en relación con estas experiencias ha sido la lisis de estos geles como consecuencia de una incubación prolongada, lo cual podría ser debido a la producción de ciertas sustancias e iones durante el crecimiento de dicha mixobacteria, así como la elevada capacidad de producción de enzimas, lo cual produjera una alteración de dichos geles.

Otro aspecto interesante en relación a la producción de antibiótico por parte de *M. coralloides* D, era el estudio de la influencia del fosfato en relación con dicha actividad antibiótica. Ya que el fosfato previene la autólisis de *M. coralloides* D (Fernandez-Vivas, 1983), se podría pensar que este ión permitiera, al alargar durante más tiempo el período de crecimiento de esta mixobacteria, un alargamiento de la fase de producción del antibiótico, y por tanto, una mayor acumulación de dicho antibiótico en los caldos de cultivo, sin embargo, la actividad antibiótica detectada en los caldos de cultivo es elevada cuando la concentración del citado ión es de 10 mM siendo, no obstante, también elevada dicha actividad a una concentración de 20 mM del

citado ión, desapareciendo drásticamente a partir de dicha concentración. Sin embargo, estas concentraciones de 10 y 20 mM no son las requeridas para prevenir la lisis de *M. coralloides* D, para lo cual se utilizan concentraciones de 40 mM.

Esta producción de antibiótico se realizó dentro de un rango de concentraciones de este ión similares al de otros microorganismos productores de antibióticos (Martin, 1977). Esta disminución drástica en la actividad antibiótica podría ser debida a una inhibición de la ruta de síntesis por concentraciones demasiado elevadas de dicho ión fosfato. En este sentido, también cabría pensar que dicho antibiótico se produjera, en forma de un intermediario fosforilado, de forma que necesitara la existencia de fosfatasa que hidrolizaran dicho enlace con el fosfato para dar lugar a la molécula activa. Dado que, dichas fosfatasa se encuentran inhibidas a elevadas concentraciones de fosfato en el medio, podría ésta ser la causa de que a concentraciones de este ión de 30 y 40 mM no se detecte actividad antibiótica en los caldos de cultivo.

Es probable, que el fosfato sea capaz de modificar, a un nivel no bien determinado, los sistemas autolíticos que intervienen en el ciclo vegetativo y en la formación de mixósporas durante la fructificación; así mismo, en la producción de antibiótico por *M. coralloides*, comentada anteriormente. Es sabido, que el antibiótico no es producido durante el proceso de diferenciación de bacilos a mixósporas (Arias *et al.* 1979). Aún así, los mecanismos de regulación por los que el fosfato controla las vías biosintéticas de los metabolitos secundarios y, en concreto del antibiótico, están lejos de ser comprendidas (Martin y Demain, 1980).

Dentro de este intento de alargamiento de la fase de producción del antibiótico, teníamos gran interés en conseguir mutantes no autolíticos que por lo tanto permitieran una mayor

DISCUSION

acumulación de dicho antibiótico en los caldos de cultivo, sin embargo, los resultados obtenidos en este sentido fueron negativos, no consiguiéndose obtener dichos mutantes. Esto hubiese sido de gran interés, ya que nos hubiera permitido, poder interrelacionar la producción de antibiótico y el proceso de lisis, característico de ésta mixobacteria.

En relación con la obtención de mutantes superproductores, el hallazgo en un primer momento de halos de lisis frente al correspondiente microorganismo de prueba *S. aureus*, de 40-60 mm de diámetro, hizo albergar esperanzas en relación a dichos mutantes. Sin embargo, al pasarlos a medio líquido no ha sido posible encontrar en los sobrenadantes de cultivo actividades antibióticas elevadas dada la lisis temprana de los mismos. Esto quizás pueda ser debido a una modificación genética de los genes relacionados con la autólisis de estos microorganismos como consecuencia del tratamiento mutagénico. Así si esta lisis temprana de esta mixobacteria fuera debida a una acumulación excesiva del antibiótico en los caldos de cultivo, haría pensar en la existencia de una sustancia de tipo autocida más que de tipo antibiótico; es decir una sustancia capaz de lisar a la propia estirpe productora.

Como ha sido comentado en el capítulo correspondiente a la introducción, en *M. xanthus* se ha encontrado una sustancia tipo autocida, llamada AMI (Mazal *et al.* 1985). Los datos son indicativos de que AMI puede ser uno de los principales agentes líticos implicados en el desarrollo. El mutante AMI-resistente SB₂₅ puede no lisarse bajo condiciones en las cuales la estirpe parental muestra lisis de desarrollo. El efecto lítico de este tipo de compuestos, y en concreto del complejo AMI en el caso de *M. xanthus* puede ser debida a la interacción directa con la membrana celular. White *et al.* 1968, encontraron que la capa de peptidoglicano de las células vegetativas de *Mixococcus* difiere del de otras bacterias y sugiere

DISCUSION

que está constituido por parches de peptidoglicano unidos por material sensible a la tripsina. Esta es una estructura que podría permitir a los ácidos grasos un relativo fácil acceso a su "blanco", de este modo, éstas células mostrarían mayor sensibilidad que otras bacterias a este tipo de sustancias. Otro tipo de bacterias (*Neisseria gonorrhoeae*), es capaz de producir ácidos grasos libres y ser inhibida por ellos (Walstad *et al.* 1974). Estos autores muestran también la existencia de una inusual estructura de envuelta celular. Es posible que esta autocida AMI, pueda no actuar directamente sobre la membrana de *M. xanthus*, sino que active enzimas autolíticos, como puede ser mostrado para ácidos grasos en otros sistemas biológicos (Carson *et al.* 1980; Fay *et al.* 1977; Tuschido *et al.* 1985).

Concretamente en el caso de *M. coralloides* D, ha sido encontrada la existencia de un factor no lipídico que activa enzimas autolíticos (Fernandez-Vivas, 1983). Por tanto, hasta que la genética de estos microorganismos no sea dada a conocer es imposible concluir que es la mutación sufrida durante el tratamiento mutagénico la que afecta al desarrollo de la lisis.

En cuanto a la utilización de membranas de diálisis, esto fue probado para permitir una posible diálisis de metabolitos con caracter lítico producidos por ésta mixobacteria durante su crecimiento. Sin embargo, tal y como ha sido indicado en el capítulo anterior, no se han obtenido resultados positivos. Quizás pudiera ser debido a una posible diálisis simultáneamente, de ciertos metabolitos necesarios para la síntesis de dicho antibiótico, ya que, como quedó indicado, han sido encontradas densidades muy elevadas en dichas membranas de diálisis, lo cual indica que en su interior las células de *M. coralloides* D han crecido satisfactoriamente.

La rotura de la membrana, como consecuencia de una incubación prolongada de esta mixobacteria en este sistema ha sido

DISCUSION

sorprendente, y quizás, pudiera ser debido a su elevada capacidad de producción de enzimas, ya comentada anteriormente, iones u otros metabolitos que alteren la estabilidad de dicha membrana, a pesar del tratamiento previo de la misma.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

1. De todos los sustratos ensayados para la producción de antibiótico por *Myxococcus coralloides* D el más adecuado resultó ser la triptona a una concentración del 1 %.
2. La inmovilización de células de *Myxococcus coralloides* D en polímeros naturales no da resultados positivos respecto a la actividad antibiótica de los caldos de cultivo.
3. La producción máxima de antibiótico se consigue a una concentración de 10 mM del ión fosfato. Siendo el rango de concentraciones de este ión que permite la síntesis del antibiótico de 10 a 20 mM.
4. Los intentos de alargar la fase de producción antibiótica mediante la obtención de mutantes no autolíticos obtenidos a partir de luz ultravioleta y nitrosoguanidina no han dado resultados positivos.
5. Se han obtenido mutantes superproductores con un gran incremento en la actividad antibiótica en medios sólidos, si bien en medio líquido la actividad antibiótica de los caldos de cultivo no fueron superiores a la de la estirpe de partida lisándose antes que ésta. El cultivo de estos mutantes superproductores en cultivos sumergidos en membranas de diálisis no han dado actividad en los caldos de cultivo a pesar de alcanzarse en su interior densidades celulares muy elevadas en relación a cultivos abiertos o convencionales.

BIBLIOGRAFIA

- Arias, J. M. 1977. Estudios sobre un antibiótico producido por *Myxococcus coralloides* D. Tesis Doctoral, Dpto. Microbiología, Fac. Ciencias, Universidad de Granada.
- Arias, J. M., Fernandez-Vivas, A. & Montoya, E. 1983. Evidence for an activating substance related to autolysis in *Myxococcus coralloides*. Arch. Microbiol. 134: 164-166.
- Arias, J. M. & Montoya, E. 1978. Dispersed growth and cell lysis in *Myxococcus coralloides* D. Microbios Letters, 5: 81-84.
- Arias, J. M., Rodriguez, C. & Montoya, E. 1979. Purification and partial characterization of an antibiotic produced by *Myxococcus coralloides*. J. Antibiot. (Tokyo), 32: 205-211.
- Behki, R. M. & Lesley, S. M. 1972. Deoxyribonucleic acid degradation and the lethal effect by myxin in *E. coli*. J. Bact. 109: 250-261.
- Bender, H. 1963. Untersuchungen an *Myxococcus xanthus* Partielle Kyse von *Pullularia pullulans* und einigen echten Hefen durch ein extrazelluläres Enzymsystem. Arch. Microbiol. 45: 407-422.
- Borchers, M. 1982. Isolierung und Charakterisierung hefelytischer Enzyme aus dem gleitende Bakterium *Myxococcus fulvus* Mx f80 (*Myxobacterales*). Dissertation Technische Universität Carolo-Wilhelmina, Braunschweig.

BIBLIOGRAFIA

- Burham, C. J., Collart, S. A. & Highison, B. W. 1981. Entrapment and lysis of the *Cyanobacterium Phormidium luridum* by aqueous colonies of *Myxococcus xanthus* PC02. Arch. Microbiol. 129: 285-294.
- Campos, J. M. & Zusman, D. R. 1975. Regulation of development in *Myxococcus xanthus*; Effect of 3':5' cyclic AMP, ADP and nutrition. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 72: 518-522.
- Carson, D. D. & Daneo-Moore, L. 1980. Effects of fatty acids on lysis of *Streptococcus faecalis*. J. Bacteriol. 141: 1122-1126.
- Cumsky, M. & Zusman, D. R. 1979. Myxobacterial hemagglutinin: A development-specific lectin of *Myxococcus xanthus* Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76: 5505-5509.
- Chibata, I., Tosa, T. & Fujimura, M. 1983. Immobilized living microbial cells in Annual Reports on fermentation process, vol 6. Edited by George. T. Tsao. Academic Press.
- Dworkin, M. & Gibson, S. M. 1964. A system for studying microbial morphogenesis; Rapid formation of microcystis in *Myxococcus xanthus*. Science, 146: 243-244.
- Edwards, O. E. & Gillespie, D. C. 1966. N-dioxides, a new class of amine oxides. Tetrahedron Lett. 4867-4870.
- Elander, R. P., Mabe, J. A., Hamill, R. H. & Gorman, M. 1968. Metabolism of tryptophans by *Pseudomonas aureofaciens*. Appl. Microbiol. 16: 753-758.

- Fay, J. P. & Farias, R. N. 1977. Inhibitory action of a non-metabolizable fatty acid on the growth of *E. coli*; role of metabolism and outer membrane integrity. *J. Bacteriol.* **132**: 790-795.
- Fernandez-Vivas, A., Arias, J. M. & Montoya, E. 1983. Autolysis in *Myxococcus coralloides* D. *FEMS Microbiol. Letters.* **20**: 97-101.
- Fytlovitch, S., Nathan, P. D., Zafiri, D. & Rosenberg, E. 1983. Amino acid precursors of *Myxococcus xanthus* antibiotic TA. *J. Antibiot.* **36**: 1525-1530.
- Gerth, K., Irschik, H., Reichenbach, H. & Trowitzsch, W. 1980. Myxothiazol, an antibiotic from *Myxococcus fulvus* (*Myxobacterales*). I. Cultivation, isolation, physico-chemical and biological properties. *J. Antibiot. (Tokyo)* **33**: 1474-1479.
- Gerth, K., Irschik, H., Reichenbach, H. & Trowitzsch, W. 1982. The myxovirescins, a family of antibiotics from *Myxococcus virescens* (*Myxobacterales*). *J. Antibiot. (Tokyo)*, **35**: 1454-1459.
- Gerth, K., Trowitzsch, W., Piehl, G., Schultze, R. & Lehmann, J. 1984. Inexpensive media for mass cultivation of mixobacteria. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **19**: 23-28.
- Gerth, K., Trowitzsch, W., Wray, V., Höfle, G., Irschik, H. & Reichenbach, H. 1982. Pyrrolnitrin from *Myxococcus fulvus* (*Myxobacterales*). *J. Antibiot. (Tokyo)*, **35**: 1101-1103.

BIBLIOGRAFIA

- Gerth, K., Jansen, R., Reifenstahl G., Höfle, G., Irschik, H., Kunze, B., Reichenbach, H. & Thierbach, G. 1983. The myxalamids, new antibiotics from *Myxococcus xanthus* (Myxobacterales), *J. Antibiotics* 36: 1150-1156.
- Grunberg, E., Berger, J., Beskid, G., Cleeland, R., Prince, H. H. & Titswort, E. 1967. Studies on in vitro and in vivo chemotherapeutic properties of antibiotic myxin, *Chemotherapy* 12: 272.
- Hart, B. A. & Zahler, S. A. 1966. Lytic enzymes produced by *Myxococcus xanthus*, *J. Bacteriol.* 92: 1632-1637.
- Hirsch, H. J. 1977. Bacteriocins from *Myxococcus fulvus* (Myxobacterales), *Arch. Microbiol.* 115: 45-49.
- Hüttermann, A. 1969. Studies on a bacteriolytic enzyme of *Archangium violaceum* (Myxobacterales), *Arch. Microbiol.* 67: 306-317.
- Irschik, H., Gerth, K., Kemmer, T., Steinmetz, H. & Reichenbach, H. 1983. The myxovalargins, new peptide antibiotics from *Myxococcus fulvus* (Myxobacterales), *J. Antibiot. (Tokyo)* 36: 6-12.
- Janssen, G. E. & Dworkin, M. 1980 *Abstract Annual Meeting of ASM* 1: 19.
- Kaiser, D. 1979. Social gliding is correlated with the presence of pili in *Myxococcus xanthus*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 76: 5952-5956.

- Kaiser, D., Manoil, C. & Dworkin, M. 1979. Myxobacteria: cell interactions, genetics and development. *Ann. Rev. Microbiol.* **33**: 595-639.
- Katznelson, H. K., Gillespie, D. C. & Cook, F. D. 1964. Studies on the relationships between nematodes and other soil microorganisms. III. Lytic action of soil myxobacters on certain species of nematodes. *Can. J. Microbiol.* **10**: 699-704.
- Kierstan, M. & Bucke, C. 1977. *Biotechnol. Bioeng.* **19**: 387.
- Kletter, B. & Henis, Y. 1963. Comparative studies on the growth of myxobacteria on bacterial suspensions. *Can. J. Microbiol.* **9**: 577-584.
- Kunze, B., Reichenbach, H., Agustiniak, H. & Höfle, G. 1982. Isolation and identification of althiomycin from *Cystobacter fuscus* (*Myxobacteriales*). *J. Antibiot. (Tokyo)* **35**: 635-636.
- Lechevalier, H. A. 1975. Production of the same antibiotics by members of different genera of microorganisms. *Adv. Appl. Microbiol.* **19**: 25- 45.
- Lesley, S. M. & Behki, R. M. 1967. Mode of action of myxin on *E. coli*. *J. Bacteriol.* **94**: 1837-1845.
- Lesley, S. M. & Behki, R. M. 1971. Recovery of metabolic activity in *E. coli* following limited exposure to myxin. *Can. J. Microbiol.* **17**: 1327-1333.
- Mandel, M. & Leadbetter, E. R. 1965. Deoxyribonucleic acid base composition of myxobacteria. *J. Bacteriol.* **90**: 1795-1796.

BIBLIOGRAFIA

- Manoil, C. & Kaiser, D. 1980. Accumulation of guanosine tetraphosphate and guanosine pentaphosphate during starvation and myxospore formation. *J. Bacteriol.* **141**: 297-304.
- Margalith, P. 1962. Bacteriolytic principles *M. fulvus*. *Nature* **196**: 1335-1336.
- Martin, J. F. 1977. Control of antibiotic synthesis by phosphate. *Adv. Biochem. Eng.* **6**: 105-127.
- Martin, M. & Demain, A. L. 1980. Control of antibiotic biosynthesis. *Microbiol. Rev.* **44**: 230-251.
- Mazal, V., Tietz, A., & Rosenberg, E. 1986. *Myxococcus xanthus* Autocide AMI. *J. Bacteriol.* **167**: 356-361.
- McCurdy, H. D. & Wolf, S. 1967. Deoxyribonucleic acid base composition of fruiting myxobacterales. *Can. J. Microbiol.* **13**: 1707-1708.
- McCurdy, H. D. & MacRae, T. H. 1974. Xanthacin, a bacteriocin of *Myxococcus xanthus* fb. *Can. J. Microbiol.* **20**: 131-135.
- Mizrahi, A., Arnan, J., Miller, G., Liron, Z., Mana, M., Batus, Y. & Rosenberg, E. 1976. Scaling-up of process for production of antibiotic of *Myxococcus xanthus* TA. *J. Appl. Chem. Biotechnol.* **26**: 160-166.
- Muñoz, J. 1985. Estudios sobre fagos y partículas similares a colas de fagos de *Myxococcus coralloides* D. Tesis Doctoral. Universidad de Granada.

BIBLIOGRAFIA

- Nishida, M., Matsubara, T. & Watanabe, 1965, Pyrrolnitrin, a new antifungal antibiotic, *J. Antibiot (Tokyo)* **18**: 211-219.
- Nolte, E. M., 1957, Untersuchungen über Ernährung und Fruchtkörperbildung von Myxobakterien, *Arch Microbiol.* **28**: 191-218.
- Norén, B., 1953, On the production of antibiotics by myxobacteria, *Sv. Bot. Tidskr.* **47**: 402-410.
- Norén, E. M. & Raper, K. B., 1952, Antibiotic activity of Myxobacteria in relation to their bacteriolytic capacity, *J. Bacteriol.* **84**: 157-162.
- Oxford, A. E., 1947, Observations concerning the growth and metabolic activities of myxococci in a simple protein-free medium, *J. Bacteriol.* **53**: 129-138.
- Pestka, S. & Brot, N., 1971, Studies on the formation of transfer ribonucleic acid-ribosome complexes, IV, Effect of antibiotics on steps of bacterial protein synthesis; some new ribosomal inhibitors of translocation, *J. Biol. Chem.* **246**: 7715-7122.
- Peterson, E. A., Gillespie, D. C. & Cook, F. D., 1966, A wide-spectrum antibiotic produced by a species of *Sorangium*, *Can. J. Microbiol.* **12**: 221-230.
- Reichenbach, H., 1986, Antibiotics from myxobacteria, a progress report, 13th Int. Conf. Biol. Myxobacteria, Granada.



- Reichenbach, H. & Dworkin, M. 1981. The order Myxobacterales. In: Starr, M. P., Stolp, H., Trüper, H. G., Balow, A., Schlegel, H. G. (eds) *The prokaryotes*. Springer, Berlin, Heidelberg New York, pp 328-355.
- Ringel, S. M., Greenough, R. C., Roemer, S., Connor, D. & von Strandtmann, M. 1977. Ambruticin (W 7783), a new antifungal antibiotic. *J. Antibiot. (Tokyo)* 30: 371-375.
- Rivière, J. 1975. *Les applications industrielles de la Microbiologie*. Masson et cie, Paris.
- Roper, M. M. & Marshall, K. C. 1978. Biological control agents of sewage bacteria in marine habitats. *Aust. J. Mar. Freshwater Res.* 29: 335-343.
- Rosenberg, E. 1984. *Myxobacteria. Development and Cell Interactions*. Springer-Verlag, New York, Berlin, Heidelberg, Tokyo.
- Rosenberg, E., Keller, K. H. & Dworkin, M. 1977. Cell density-dependent growth of *Myxococcus xanthus* on casein. *J. Bacteriol.* 129: 770-777.
- Rosenberg, E., Filer, D., Zafriri, D. & Kindler, S. H. 1973. Aspartokinase activity and the developmental cycle of *Myxococcus xanthus* J. *Bacteriol.* 115: 29-34.
- Rosenberg, E., Fytlovitch, S., Carmeli, S. & Kashman, Y. 1982. Chemical properties of *Myxococcus xanthus* antibiotic TA. *J. Antibiot. (Tokyo)* 35: 788-793.

BIBLIOGRAFIA

- Rosenberg, E., Vaks, B. & Zuckerberg, A. 1973. Bactericidal action of an antibiotic produced by *Mixococcus xanthus*, Antimicrob. Agents Chemother. **4**: 507-513.
- Sakakibara, H., Naganawa, H., Ohno, M., Maeda, K. & Umezawa, H. 1974. The structure of althiomycin, J. Antibiot. (Tokyo) **27**: 897-899.
- Schlingmann, M., Faust, U. & Präve, P. 1982. Aufarbeitung und Isolierung funktioneller Bioproteine. In: Präve, P., Schügerl, K., Zucker, H. (Hrsg) Mikrobielle Proteingewinnung und Biotechnologie, 2. Symposium 1980, Verlag Chemie, Weinheim Deerfield Beach, Florida Basel, pp 117-124.
- Shilo, M. 1970. Lysis of blue-green algae by *Myxobacter*, J. Bacteriol. **104**: 453-461.
- Shimkets, L. J. & Kaiser, D. 1982. Murein components rescue developmental sporulation in *Mixococcus xanthus*, J. Bacteriol. **152**: 462-470.
- Sigg, H. P. & Toth, A. 1967. Über die Struktur der Phenazin-N-Oxide, Helvetica Chimica Acta **50**: 716-719.
- Thierbach, G., & Reichenbach, H. 1981a. Myxothiazol, a new antibiotic interfering with respiration, Antimicrob. Agents Chemother. **19**: 504-507.
- Thierbach, G., & Reichenbach, H. 1981b. Myxothiazol, a new inhibitor of the cytochrome b-c₁ segment of the respiratory chain. Biochim. Biophys. Acta **638**: 282-289.

- Thierbach, G. & Reichenbach, H. 1983. The effect of the new antibiotic myxothiazol on the respiration of *Paracoccus denitrificans*. Arch. Microbiol. 134: 104-107.
- Trowitzsch, W., Reifenstahl, G., Wray, V. & Gerth, K. 1980. Myxothiazol, an antibiotic from *Myxococcus fulvus* (Myxobacterales). II. Structure elucidation. J. Antibiot. (Tokyo) 33: 1480-1490.
- Trowitzsch, W., Wray, W., Gerth, K. & Höfle, G. 1982. Structure of myxovirescin A., a new macrocyclic antibiotic from gliding bacteria. J. Chem. Soc. Chem. Commun. 1340-1432.
- Tuschido, T., Hiraoka, T., Takano, M. & Shibasaki, I. 1985. Involvement of autolysin in cellular lysis of *Bacillus subtilis* induced by short- and medium-chain fatty acids. J. Bacteriol. 162: 42-46.
- Vaks, B., Zuckerberg, A. & Rosenberg, E. 1974. Purification and partial characterization of an antibiotic produced by *Myxococcus xanthus*. Can. J. Microbiol. 20: 155-161.
- Voelz, H.G. & Dworkin, M. 1962. Fine structure of *Myxococcus xanthus* during morphogenesis. J. Bacteriol. 84: 943-952.
- Walstad, D. L., Reitz, R. C. & Sparling, P. F. 1974. Growth inhibition among strains of *Neisseria gonorrhoeae* due to production of inhibitory free fatty acids and lysophosphatidylethanolamine; absence of bacteriocins. Infect. Immun. 10: 481-488.
- Weigele, M. & Leimgruber, W. 1967. The structure of myxin. Tetrahedron Lett. 715-718.

BIBLIOGRAFIA

- White, D., Dworkin, M. & Tipper, D. J. 1968. Peptidoglycan of *Myxococcus xanthus*: structure and relation to morphogenesis. *J. Bacteriol.* **95**: 2186-2197.
- Wireman, J. W. & Dworkin, M. 1975. Morphogenesis and developmental interactions in myxobacteria. *Science*, **189**: 516-522.
- Wireman, J. W. & Dworkin, M. 1977. Developmentally induced autolysis during fruiting body formation by *Myxococcus xanthus*. *J. Bacteriol.* **129**: 796-802.
- Zafriri, D., Rosenberg, E. & Mirelman, D. 1981. Mode of action of *Myxococcus xanthus* antibiotic TA. *Antimicrob. Agents Chemother.* **19**: 349-351.