La presente Tesis Doctoral ha sido realizada en el Departamento de Microbiología (Facultad de Ciencias ) de la Universidad de Granada durante los años 84-88, con ayuda de una beca de Formación del Personal Investigador del Ministerio de Educación y Ciencia.

Mi agradecimiento sincero:

Al Prof. Dr. D. José Mª Arias Peñalver, Director de esta Tesis, por sus valiosas ideas y constante apoyo en la realización de este trabajo.

De igual forma, doy las gracias a mi compañero Antonio Gálvez del Postigo y al Dr. Ruiz-Bravo López por la importante ayuda que me han prestado, y expreso asímismo mi gratitud a todos los miembros del Departamento de Microbiología, por el ambiente de amistad y colaboración disfrutado en su compañía a lo largo de los años de realización de este trabajo.

# UNIVERSIDAD DE GRANADA

## ACTA DEL GRADO DE DOCTOR EN MEDICINA

Curso de 19 88 a 19 89 Folio 41 vta Número 83

Reunido en el día de la fecha el Tribunal nombrado para el Grado de Doctor de D.ª Mª Dol
Montoya Linde, el aspirante leyó un discurso sobre el sigu
tema, que libremente había elegido: "Producción, actividad biológica y actividad
"in vivo" de los antibióticos producidos por Myxococcus Coralloide

Terminada la lectura y contestadas la objecciones formuladas por los Jueces del Tribunal,
le calificó de Apto "Cum laude"

Granada 21 de Enero de 19 89

El Secretario del Tribunal,

EL PRESIDENTE,

Fdo.: Gonzalo Piédrola Angulo

Fdo.: José M. Ortega López

EL VOCAL,

Fdo: José M. Ortega Ruiz

EL VOCAL,

Fdo.: Carmen Macoto Vela

EL VOCAL,

Fdo.: [illegible]

FIRMA DEL GRADUANDO,

Dpto. Microbiología.

A mi Padre, por sus enseñanzas.

INDICE

Pag

INTRODUCCION

Caracteres generales de las mixobacterias..... 1

Estructura y movilidad de las células vegetativas..... 4

Nutrición y metabolismo..... 10

Ciclos de vida de las mixobacterias..... 16

Agregación..... 18

Esporulación..... 20

Germinación y significado del ciclo de desarrollo..... 23

Autolisis de cultivos dispersos..... 25

Producción de antibióticos..... 26

OBJETO DEL TRABAJO..... 34

MATERIAL Y METODOS

1. Microorganismos empleados..... 36
2. Medios de cultivo..... 38
3. Técnicas de cultivo..... 44
4. Medida del crecimiento bacteriano..... 45
5. Producción de antibiótico..... 46
6. Valoración de la actividad antibiótica..... 49
7. Mutagénesis de *M. coralloides* D..... 52
8. Determinación de la actividad biológica del antibiótico..... 53

RESULTADOS

1. Producción..... 57

1.1. Influencia de la fuente de carbono y nitrógeno..... 58

1.2. Efecto de la concentración de ión ortofosfato sobre la producción de antibiótico..... 60

1.3. Empleo de mutantes superproductoras..... 62

Pag

1.4. Influencia de la modalidad de cultivo sobre la producción de antibiótico..... 64

2. Extracción y purificación..... 67

2.1. Experiencias previas..... 68

2.2. Esquema de extracción y purificación desarrollado.. 72

2.3. Rendimiento del procedimiento de extracción..... 74

2.4. Determinación de la homogeneidad y pureza del antibiótico..... 74

3. Espectro antimicrobiano..... 77

4. Efecto del antibiótico sobre *S. aureus*..... 79

4.1.1. Efecto del antibiótico sobre el crecimiento de *S. aureus*..... 79

4.1.2. Efecto del antibiótico sobre el crecimiento de *S. aureus* en un medio hipotónico..... 82

4.2. Efecto del antibiótico sobre la viabilidad de *S. aureus*..... 84

4.3. Efecto del antibiótico sobre la síntesis de ARN en *S. aureus*..... 92

4.4. Idem sobre la síntesis de proteínas..... 94

4.5. Idem sobre la síntesis de ADN..... 97

4.6. Idem sobre la síntesis de componentes globales de la pared celular..... 100

4.7. Idem sobre la síntesis del peptidoglucano..... 103

5. Efecto sobre mixobacterias.

5.1. Efecto del antibiótico sobre *M. coralloides*..... 106

5.2. Efecto del antibiótico sobre *M. xanthus*..... 121

6. Actividad *in vivo* del antibiótico..... 128

DISCUSION

Producción..... 129

Extracción y purificación..... 134

Actividad biológica..... 136

Pag

Efecto *in vivo*..... 144

CONCLUSIONES..... 146

BIBLIOGRAFIA..... 148

# INTRODUCCION

Las mixobacterias productoras de cuerpos fructificantes fueron descritas por vez primera por Roland Thaxter en 1.892 cuando, mientras se dedicaba a la recolección de hongos en Nueva Inglaterra, observó sobre maderas y otros materiales orgánicos en descomposición la existencia de crecimientos de aspecto mucoso y color anaranjado brillante. Thaxter (1.892) clasificó estos organismos como hongos del género *Myxobacter*, en razón de su aspecto mucoso.

A pesar de haber transcurrido ya casi 100 años desde la fecha de su descripción, los conocimientos existentes sobre las mixobacterias dejan mucho que desear y han sido adquiridos prácticamente en el transcurso de los últimos 20 años. El motivo de este retraso radica, de una parte, en que hasta entonces los estudios sobre mixobacterias fueron realizados desde un punto de vista casi exclusivamente

morfológico y, de otra, porque las técnicas microbiológicas clásicas son de difícil aplicación al estudio de estas bacterias al ser incapaces de crecer las mismas de forma dispersa en cultivos sobre medios líquidos.

Dejando a un lado los primeros intentos de clasificación de estas bacterias (Jahn, 1.915 y 1.924; Soriano, 1.947; Stanier, 1.942 y 1.957), McCurdy (1.974), en la octava edición del Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, incluyó las mixobacterias en el orden I, *Myxobacterales*, dentro del grupo segundo que comprende las "bacterias deslizantes", con las siguientes características:

« Bacilos unicelulares,con un diámetro menor de 1'5 µm, embebidos típicamente en una capa de mucílago más o menos tenaz. Los bacilos pueden ser uniformemente cilíndricos, con los extremos romos y redondeados o bien afilados. La multiplicación se lleva a cabo por fisión binaria transversal. Capaces de llevar a cabo un movimiento deslizante lento cuando están en contacto con una superficie sólida o en la interfase aire-agua, pero carentes de órganos de locomoción detectables. Gram-negativos. »

« Bajo condiciones ambientales apropiadas las células se agregan para formar cuerpos fructificantes, constituidos por mucílago y células, los cuales presentan a menudo colores brillantes y dimensiones macroscópicas. Dentro de los cuerpo fructificantes las células vegetativas se transforman en células en reposo llamadas mixósporas. En algunos casos las mixósporas no son facilmente distinguibles de las células vegetativas; en otros aparecen como bacilos acortados o esferas, refráctiles y encapsuladas, que se conocen con el nombre de microquistes. Los cuerpos fructificantes pueden consistir simplemente en una masa de mucílago y mixósporas, o bien éstas pueden estar encerradas en esporangios, de forma y

dimensiones características, que pueden estar elevados sobre el sustrato sobre pedúnculos simples o ramificados. »

« Quimiorganótrofos y aerobios estrictos, con un metabolismo respiratorio, nunca fermentativo. Es típica la producción de enzimas capaces de hidrolizar una variedad de macromoléculas, tales como proteinas, ácidos nucleicos, esteres de ácidos grasos y varios polisacáridos, incluida la celulosa en el caso de algunas especies. Muchas son capaces de lisar otros microorganismos eucarióticos o procarióticos. Carecen de pigmentos fotosintéticos, pero producen pigmentos carotenoideos característicos y a menudo melaninas. »

« El contenido del ADN en G+C oscila entre 67-71 moles % en todas las especies ensavadas. »

Aún cuando se encuentran distribuidas en todos los suelos del mundo, desde los trópicos hasta el ártico (Brockman y Boyd, 1.963; Reichenbach, 1.986), el orden está muy bien definido y constituye un grupo muy homogeneo de bacterias, como muestran la similitud del contenido en G+C de todas las especies (Mandel y Leadbetter, 1.965; McCurdy y Wolf, 1.967) y la secuencia de los ARNs ribosómicos 16S (Ludwig *et al.*, 1.983).

En el momento de escribir esta Introducción no ha sido publicado aún el volumen correspondiente a estas bacterias del Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, pero, no obstante, se conoce ya su contenido, por lo que se puede adelantar que reserva para las mixobacterias una entera sección bajo el epígrafe de "Bacterias deslizantes y fructificantes", dentro de la cuál se engloba el orden *Myxobacterales* con las características indicadas.

No han sido recogidas, pues, en esta edición las propuestas formuladas por algunos autores (Soriano, 1.973; Reichenbach, 1.981;

Reichenbach y Dworkin, 1.981) de creación de una clase, *Flexibacteriae*, para englobar las bacterias deslizantes unicelulares y dentro de la cuál se encuadrarían dos órdenes, *Cytophagales* y *Myxobacterales*, diferenciables por la producción de cuerpos fructificantes por las especies del segundo.

**Estructura y movilidad de las células vegetativas.**

Como ha sido citado al hablar de las características generales del orden, los bacilos, con extremos redondeados o más frecuentemente afilados, se encuentran embebidos en un mucílago más o menos tenaz constituyendo una colonia plana característica que recibe el nombre de "enjambre". En *Myxococcus virescens* el mucílago está compuesto mayoritariamente por un complejo de proteína-polisacárido-lípido en proporción 14:8:16 (Gnosspelius, 1.978a). En *Myxococcus xanthus* el material extracelular está compuesto por un polisacárido neutro, carente de ácidos urónicos, que representa del 5 al 10 % del peso seco total de la colonia (Sutherland y Thomson, 1.975). A este mucílago se le han atribuido varias funciones, ninguna de las cuales ha sido demostrada claramente: facilitar la adhesión de unas células a otras; facilitar la adhesión a sustratos sólidos así como su digestión; suministrar protección frente a toxinas y bacteriófagos; e intervenir en el movimiento por deslizamiento.

Desde el punto de vista estructural las células vegetativas de las mixobacterias son similares a otras bacterias Gram-negativas, distinguiéndose en ellas de dentro a fuera el protoplasto delimitado por la membrana citoplasmática, una capa de peptidoglucano y finalmente una membrana externa.

Por lo que respecta al protoplasto, éste presenta inclusiones de polifosfatos y polisacáridos (Voelz *et al.*,1.966). En *M. xanthus* se ha demostrado que el cromosoma posee un tamaño de 5.690 ±510 Kb

(Yee e Inouye, 1.981 y 1.982), casi el doble del de *E. coli* y uno de los genomios cromosómicos más grandes de los existentes en bacterias. No parece que este tamaño esté relacionado con los procesos de formación de mixósporas, puesto que *Bacillus subtilis*, una bacteria que forma endosporas, tiene un genomio similar al de *E. coli*. Se ha especulado con que este gran exceso de ADN podría ser necesario para los procesos de fructificación; de ser ésto así todas las mixobacterias deberían presentar un gran genomio, pero por el momento ésto sólo ha sido demostrado en el citado *M. xanthus*. Otra característica peculiar del genomio de las mixobacterias es su alto contenido en G+C, que Yee e Inouye (1.984) consideran como una protección a la radiación ultravioleta, a la que, por vivir normalmente en la superficie de los suelos, están muy expuestas.

Por último, se ha comprobado en diversas especies de mixobacterias la existencia de ADNs accesorios, lineales y de cadena simple, conocidos como msADN-1 y msADN-2, de función desconocida. El msADN-1 contiene ribonucleótidos en su extremo 5', existiendo de 500 a 700 copias por cromosoma (Dhundale *et al.*, 1.985).

Por lo que respecta a la membrana plasmática, ésta se ajusta al modelo general, si bien hay que hacer notar que los ácidos grasos de sus fosfolípidos, frecuentemente insaturados, presentan ramificaciones e hidroxilaciones en α o β (Schröder y Reichenbach, 1.970; Ware y Dworkin, 1.973; Fautz *et al.*, 1.979 y 1.981). El fosfolípido mayoritario es la fosfatidiletanolamina (60% del total). El perfil de proteínas es muy diferente al de la membrana externa (Orndorff y Dworkin, 1.980).

Con objeto de defenderse de la luz solar las mixobacterias producen pigmentos de tipo carotenoideo que se localizan en la membrana plasmática (Kleinig, 1.972); habiendose podido demostrar

que su síntesis es fotoinducible (Buchard y Dworkin, 1.966; Arias y Montoya, 1.982).

En cuanto a la capa de peptidoglucano, éste es cualitativamente similar al de *E. coli*, pero se encuentra en menor cantidad, ya que representa aproximadamente el 0'6 % del peso seco de la célula (White *et al.*, 1.968). De otra parte, el peptidoglucano de las mixobacterias, a diferencia del de otras bacterias, es sensible a la acción de la tripsina que lo fragmenta en pequeños trozos. Ello es debido a que el peptidoglucano no constituye en este caso una molécula gigante continua, sino que se presenta a manera de "paquetes", conectados entre sí por un material sensible a la tripsina formado por polímeros de glicocola y serina (White *et al.*, 1.968). Se ha sugerido que el bajo contenido en peptidoglucano y su discontinuidad pueden estar relacionados con la flexibilidad de las células y su capacidad para diferenciarse a mixósporas (Kaiser *et al.*, 1.979).

La membrana externa es similar a la del resto de bacterias Gram-negativas, estando formada por fosfolípidos del mismo tipo que los presentes en la membrana plasmática, proteínas y lipopolisacáridos. Los lipopolisacáridos, no obstante, presentan la particularidad de carecer de heptosa y presentar en algunos casos 3-O-metil-D-xilosa (Sutherland y Smith, 1.973; Rosenfelder *et al.*, 1.974). Así mismo, el contenido en fosfolípidos de esta membrana es superior al normal (Orndorff y Dworkin, 1.980).

Hay que hacer notar también que las mixobacterias son más sensibles que otras bacterias Gram-negativas a antibióticos hidrófobos, tales como actinomicina D, rifampicina, novobiocina, etc. (Dworkin, 1.969). Esto se ha interpretado como debido a que la membrana externa de las mixobacterias presenta una estructura más

permeable a las sustancias de tipo hidrófobo que la de bacterias entéricas (Kaiser *et al.*, 1.979).

Finalmente, las mixobacterias presentan apéndices extracelulares de tipo fimbrias de localización polar, a las que se atribuye un papel en el movimiento coordinado de estas bacterias (Kaiser, 1.979).

Como es característico del grupo en que se incluyen, las mixobacterias se mueven por deslizamiento sobre superficies sólidas o en las interfases aire-agua. Hasta el momento el mecanismo de dicho movimiento permanece totalmente oscuro, habiéndose alternativamente atribuido a la excreción del mucílago extracelular (Fluegel, 1.963), a la formación activa de gradientes de tensión superficial (Keller *et al.*, 1.983) y, como parece más probable, a la contracción de filamentos intracelulares asociados a la membrana plasmática que han sido observados en muchas mixobacterias y que están ausentes en mutantes que han perdido la capacidad de moverse (Schmidt-Lorenz y Kühlwein, 1.968; MacRae y McCurdy, 1.976; Buchard *et al.*, 1.977; Inouye *et al.*, 1.985).

Las células se mueven en paralelo a su eje longitudinal, de manera que el número de direcciones que una célula puede tomar está restringido si se compara con una bacteria flagelada. El movimiento es lento, del orden de 2 µm/min (Shimkets, 1.987).

Curiosamente las mixobacterias, a más del movimiento individual de cada célula, son capaces de moverse como conjuntos coordinados, como puede observarse en la expansión de los enjambres y en la agregación de las células durante la fructificación, en que tiene lugar un fenómeno rítmico muy peculiar en el que ondas oscilantes de células discurren sobre la superficie del enjambre (Reichenbach y Dworkin, 1.981; Reichenbach, 1.965 y 1.966). El fenómeno se conoce como "oleaje", dado que el aspecto de las ondas recuerda el de las

olas sobre la superficie del mar. Las ondas, alineadas paralelamente y perpendiculares al radio del enjambre, consisten en crestas formadas por varias capas de células y están separadas entre sí por una monocapa con pocas células (Shimkets y Kaiser, 1.982). Las ondas cambian continuamente su posición, viajando con una notable velocidad (2'2 μm/min), hasta el punto de que su migración puede observarse con el microscopio de disección. El oleaje puede ser inducido por preparaciones de peptidoglucano o ciertos componentes del mismo (Shimkets y Kaiser, 1.982).

El significado de este fenómeno permanece oscuro, aunque obviamente implica alguna clase de comunicación entre las células del enjambre. Como dice Reichenbach (1.986), el oleaje implica que « el enjambre de mixobacterias no es simplemente una masa de células apiladas, sino una sociedad gobernada por ciertas reglas. Aparentemente las mixobacterias se comportan socialmente en otras ocasiones distintas a la de formación de cuerpos fructifi-cantes ».

En estos movimientos coordinados es necesario, como queda dicho, la interacción entre células (Kaiser y Crosby, 1.983), interacción en la que al parecer juegan un papel fundamental las fimbrias polares de estas bacterias (Kaiser, 1.979).

Desde el punto de vista genético el movimiento deslizante está controlado en *M. xanthus* por dos sistemas multigénicos: el sistema A (de "aventurero"), que controla el deslizamiento de las células individuales, y el sistema S (de "social"), que controla el movimiento de los grupos coordinados de células o enjambres . El sistema A contiene al menos 22 *loci* y el S al menos 10 (Hodgkin y Kaiser, 1.977, 1.979a y 1.979b).

Las células $A^+S^+$ se mueven individualmente o en grupos compuestos desde una pocas a miles de células; estando controladas

las diferentes pautas de movimiento por la expresión relativa del sistema A o S. Células con una mutación en el sistema A ($A^-S^+$) exhiben un comportamiento social puro y se deslizan en enjambres densos, pero nunca como individuos. Por el contrario las células capaces de un comportamiento exclusivamente aventurero ($A^+S^-$) se deslizan fundamentalmente como individuos. Finalmente, células con mutaciones en los dos sistemas ($A^-S^-$) son inmóviles.

Los mutantes $A^-S^-$ son incapaces tanto de formar cuerpos fructificantes como de dar el fenómeno del oleaje. En relación con esto último, la movilidad aventurera parece ser requerida para el oleaje, ya que los mutantes $A^-S^+$ no lo producen; por el contrario, la mayoría de estos mutantes forman cuerpos fructificantes. Por último, alrededor de los dos tercios de las estirpes $A^+S^-$ son incapaces de formar cuerpos fructificantes o dar oleaje, lo que lleva a la conclusión de que la movilidad social es fundamental para estos comportamientos de las mixobacterias.

El contacto celular parece ser requerido para la movilidad social, ya que las células $A^-S^+$ son inmóviles cuando están separadas por una distancia igual o superior a la longitud de una célula (Kaiser y Crosby, 1.983). Este contacto celular está facilitado por dos caracteres que parecen estar regulados por el sistema S: la formación de fimbrias y la cohesión celular. En *M. xanthus* la formación de las fimbrias polares está correlacionada con la movilidad social, dado que las células $A^+S^+$ y $A^-S^+$ presentan fimbrias, mientras que la mayoría de las $A^+S^-$ no las presentan (Kaiser, 1.979). De otra parte, la estirpes $A^+S^+$ y $A^-S^+$de *M. xanthus* tienden a adherirse y aglutinar en poco tiempo cuando se suspenden en tampón conteniendo $Ca^{2+}$ y $Mg^{2+}$, mientras que las estirpes $A^+S^-$ no aglutinan o lo hacen muy pobremente.(Shimkets, 1.986 y 1.987). Resultados parecidos han sido obtenidos con estirpes de *Stigmatella aurantiaca* (Quall y White, 1.982; Gilmore y White, 1.985). Así pues la

cohesión celular, uno de cuyos factores condicionantes es probablente la presencia de fimbrias y cuyo establecimiento es energia dependiente en *M. xanthus*, constituye uno de los factores que condicionan la movilidad social al promover y mantener la existencia de grupos de células.

**Nutrición y metabolismo.**

Los estudios de nutrición y del metabolismo intermediario de las mixobacterias han venido siendo dificultados por la tendencia de estas bacterias a crecer en medios líquido en forma no dispersa y por el hecho de que, salvo excepciones, crecen mejor y más rápidamente en medios muy complejos con macromoléculas insolubles de muy diversa naturaleza o células vivas o muertas de otros microorganismos. Hasta tal punto es ésto así que uno de los métodos que da mejor resultado para aislar la mayoría de las mixobacterias consiste en depositar partículas de suelo en la superficie de un agar mineral sobre el que se ha extendido una capa espesa de bacterias vivas (Singh, 1.947).

Esta capacidad para crecer a expensas de células, así como de macromoléculas insolubles, es consecuencia de su habilidad para producir una gran variedad de enzimas extracelulares o epicelulares, tales como enzimas bacteriolíticos, proteasas, lipasas, celulasas, amilasas, etc. En la lisis de otras células, a más de los citados enzimas, es probable que intervengan también antibióticos y bacteriocinas (Rosenberg y Varon, 1.984).

Entre los enzimas líticos de la pared celular de bacterias encontramos muramidasas (Harcke *et al.*, 1.971 y 1.972); glucosaminidasas (Hart y Zahler, 1.966; Sudo y Dworkin, 1.972; Haskâ, 1.974); amidasas (Katz y Strominger, 1.967; Tsai *et al.*, 1.965; Sudo y Dworkin, 1.972), que separan el tetrapeptido del ácido murámico; y

peptidasas (Tsai *et al.*, 1.965; Tipper *et al.*, 1.967; Sudo y Dworxin, 1.972; Haskâ, 1.974), que rompen enlaces en el tetrapéptido. De estos tipos de enzimas los tres primeros son especificos de paredes celulares, mientras que los del cuarto tipo pueden actuar también sobre otros péptidos distintos de los del peptidoglucano.

Los enzimas proteoliticos juegan un papel muy importante en la bacteriolisis, a más de ser responsables del crecimiento de las mixobacterias a expensas de muy diversos tipos de proteínas. Son numerosos los enzimas de este tipo que han sido caracterizados y en algunos casos purificados. Así, *Myxobacter* AL 1 produce dos enzimas proteoliticos, proteasas I y II, el primero de los cuales es también activo frente a paredes celulares (Jackson y Wolfe, 1.968; Wingard *et al.*, 1.972); *M. virescens* produce al menos tres proteasas distintas, una de las cuales ha sido purificada y demostrado ser activa frente a caseina y hemoglobina y romper preferentemente enlaces peptídicos entre aminoácidos con cadenas laterales no polares (Gnosspelius, 1.978b). Otros sistemas proteolíticos extracelulares han sido demostrados en *Sorangium* (Whitaker, 1.965; Jurasek y Whitaker, 1.965), *Chondrococcus coralloides* (Harke *et al.*, 1.971) y *M. xanthus* (Rodriguez y Montoya, 1.980). Como ocurre también con la actividad bacteriolitica, la actividad proteolítica de las mixobacterias es afectada por la composición del medio de cultivo (Haskâ y Stahl, 1.971; Perez-Lopez *el al.*, 1.978).

Fosfatasas ácidas y alcalinas, extracelulares y periplásmicas, han sido detectadas en *M. xanthus* (Nicaud *et al.*, 1.984) y en *M. coralloides* D (González *et al.*, 1.987).

Por lo que respecta a la hidrólisis de ácidos nucleicos, la utilización de ADN por mixobacterias fue ya descrita en 1.950 por Finck. Posteriormente Noren (1.955) detectó actividad desoxirribo y ribonucleásica en varias mixobacterias, e incluso observó

crecimiento de las mismas en medios suplementados con ADN o ARN como únicas fuentes de carbono y nitrógeno; esto último,sin embargo, fue negado por Loebeck y Klein (1.956). Estudios más recientes (Mayer y Reichenbach, 1.978) indican que si bien una gran variedad de mixobacterias (*M. fulvus, M. virescens, M. xanthus, M. stipitatus, Archangium serpens* y *Podangium erectum*) sintetizan abundantes nucleasas de restricción, la localización de las mismas es el espacio periplásmico y por tanto no se segregan. En el mismo sentido apuntan los trabajo de Morris y Parish (1.976) sobre nucleasas de restricción de *M. virescens* y de Martínez-Cañamero (1.986) sobre desoxirribonucleasas de *M. coralloides* D.

Otra actividad enzimática típica de las mixobacterias es la lipásica. Sørhaug (1.974) encontró una hidrolasa de ésteres del glicerol en *M. xanthus*, aun cuando no aclaró su localización. Posteriormente Rodríguez *et al.* (1.979) demostraron la existencia en esta misma bacteria de una actividad esterásica no difusible, sino asociada a la superficie celular. Finalmente, Ruiz-Rodríguez (1.980) encontró dos sistemas enzimáticos con actividad lipásica en el citado *M. xanthus*, uno de ellos extracelular y otro unido a estructuras celulares.

Por último, las mixobacterias presentan capacidad hidrolítica frente a muy diversos tipos de polisacáridos que, aunque muy mal estudiada, es muy amplia, ya que abarca desde celulasas a amilasas y enzimas que degradan polisacáridos complejos presentes en las paredes celulares de bacterias, levaduras y hongos filamentosos (Solnseva, 1940 y 1.941; Beebe, 1.943; Noren, 1.955; McCurdy, 1.969; Irschik y Reichenbach, 1.985; Reichenbach, 1.986).

Aparte de los enzimas citados, también se ha atribuido un papel en la lisis de otros microorganismos a los antibióticos y bacteriocinas producidas por las mixobacterias, en el sentido de que

su acción microbicida podría ser un paso previo a la lisis por los enzimas extracelulares.

La producción de antibióticos será objeto de otro apartado de esta Introducción. Por lo que se refiere a la producción de bacteriocinas, y en contraste con la abundancia de antibióticos encontrados, solo se ha descrito en cuatro especies: *M. xanthus* (McCurdy y MacRae, 1.974), *M. fulvus* (Hirsch, 1.977), *M. virescens* (Brown *et al.*, 1.976) y *M. coralloides* (Muñoz *et al.*, 1984), si bien posiblemente sea un fenómeno general.

Aún cuando es posible que antibióticos y bacteriocinas jueguen algún papel en la lisis de otros microorganismos, son los enzimas extra y epicelulares los directamente implicados en la misma. En algunos casos la actividad predadora de las mixobacterias puede ser atribuida exclusivamente a la producción de enzimas extracelulares (lisis de bacterias Gram-positivas), pero en los restantes se requiere además un contacto directo entre la mixobacteria y su presa (Burnham *et al.*, 1.981), lo que indica la intervención de enzimas u otras sustancias unidas a estructuras celulares.

Aunque sin relación con las actividades líticas de las mixobacterias hay que citar, dada su rareza, la síntesis y excreción de esteroides en cantidades sustanciales por mixobacterias del género *Nannocystis* (Kohl *et al.*, 1.9830.

Como ha sido dicho al comienzo de este apartado, gracias a la producción de este conjunto de enzimas las mixobacterias crecen mejor y más rápidamente en medios de cultivo a base de macromoléculas, bacterias o levaduras que en los medios convencionales y por supuesto que en medios definidos. La complejidad de estos medios ha dificultado y por tanto retrasado los estudios sobre nutrición y metabolismo de estas bacterias.

Ultimamente, sin embargo, la obtención de cultivos dispersos de algunas mixobacterias (Dworkin, 1.962; Haskä y Stahl, 1.971; Arias y Montoya, 1.978), así como la introducción de medios mínimos definidos para *M. xanthus* (Bretscher y Kaiser, 1.978), han permitido comenzar a conocer algunos de sus requerimientos nutritivos y algunos aspectos de su metabolismosmo intermediario, en especial para la mixobacteria citada.

La mayoría de las mixobacterias, con excepción de las celulolíticas, usan aminoácidos como fuente de carbono, nitrógeno y energía y contienen vías metabólicas para oxidar dichos compuestos (Shimkets, 1.984). *M. xanthus* puede ser cultivado en medios con caseína purificada (Rosenberg *et al.*, 1.977) o aminoácidos como solos constituyentes orgánicos (Dworkin, 1.963). Los azúcares no son utilizados al parecer por las mixobacterias bacteriolíticas, aunque sorprendentemente utilizan polisacáridos, incluido el almidón, que degradan a trisacáridos que pueden incorporar y metabolizar (Irschik y Reichenbach, 1.985).

Todos los enzimas del ciclo de los ácidos tricarboxílicos han sido detectados en *M. xanthus*, así como los enzimas propios del ciclo del glioxalato. Este último ciclo actua de forma reducida durante el crecimiento vegetativo en medios ricos, pero incrementa su actividad durante el desarrollo (Shimkets, 1.984).

En relación con los enzimas de la vía glicolítica, que en estas bacterias parece funcionar exclusivamente en sentido inverso, se ha detectado la presencia de hexoquinasa dependiente de pirofosfato y no de ATP; en general *M. xanthus* posee todos los enzimas necesarios para la síntesis de azúcares a partir de aminoácidos (Filer *et al.*, 1.977).

Watson y Dworkin (1.968) han puesto de manifiesto la existencia en *M. xanthus* de dos de los enzimas del ciclo del fosfogluconato. Dado que la ribosa no es incorporada con efectividad, es lógica la existencia de dicha vía para la síntesis de ribosa-5-fosfato que será usado en la biosíntesis de nucleótidos.

En corcondancia con este último trabajo, Irschik y Reisenbach (1.985) encontraron en *Coralloccoccus coralloides* que la glucosa puede ser metabolizada una vez que se encuentra en el interior de la célula, pero que así como hexoquinasa, glucosa-6-fosfato deshidrogenasa y 6-fosfogluconato deshidrogenasa están presentes en cantidades razonables, el enzima clave de la vía glicolítica, fructosa-1,6-difosfato aldolasa, está presente en cantidad mínima. Esto sugiere que la glucosa es usada principalmente por la vía de las pentosas fosfato, para suministrar ribosa, y solamente una pequeña fracción, si acaso, de los carbohidratos puede ser aprovechada como fuente de energía.

*M. xanthus* contiene un "pool" pequeño de nucleótidos en comparación con el existente en *E. coli*, siendo el ATP su principal constituyente. En células vegetativas los valores medios de la carga energética del sistema adenilato son de 0'81-0'87 (Hanson y Dworkin, 1.974).

Finalmente y a pesar de que en *M. xanthus* los aminoácidos sirven como fuente de carbono, nitrógeno y energía, se conoce muy poco sobre el metabolismo intermediario de estos compuestos. Como se indicará más adelante, la familia del aspártico y la aspártoquinasa parecen jugar cierto papel en el control del desarrollo. La metionina requiere para su síntesis una fuente exógena de vitamina $B_{12}$ (Bretscher y Kaiser, 1.978). Los aminoácidos ramificados (leucina, isoleucina y valina) deben ser aportados como nutrientes (Umbarger, 1.978); mientras que los aminoácidos aromáticos, fenilalanina,

tirosina y triptófano pueden ser sintetizados por la propia bacteria (Bretscher y Kaiser, 1.978). El estudio de las numerosas actividades transaminásicas y deshidrogenantes ligadas al metabolismo de los aminoácidos no ha pasado, en la mayoría de los casos, de su detección en extractos celulares (Shimkets, 1.984).

**Ciclos de vida de las mixobacterias.**

Dependiendo de las condiciones ambientales, las mixobacterias pueden, alternativamente, desarrollar dos ciclos de vida estrechamente entrelazados: un ciclo vegetativo y un ciclo de desarrollo (Dworkin, 1.972).

El ciclo vegetativo es muy simple, ya que consiste en la división binaria transversal de los bacilos, lo que en medios sólidos lleva a la expansión del enjambre y en aquellos casos de mixobacterias qu crecen dispersas en medios líquidos a un aumento de la densidad óptica del cultivo. Este crecimiento vegetativo se mantiene en tanto el medio de cultivo contenga abundancia de nutrientes.

Coincidiendo, como se verá más adelante, con el agotamiento del medio en nutrientes se dispara la iniciación del ciclo de desarrollo, durante el cuál tiene lugar una morfogénesis cooperativa, que lleva a la formación de cuerpos fructificantes (fructificación) por la acción conjunta de decenas de miles de células, y una morfogénesis celular, durante la cual las células vegetativas sufren una serie de cambios que llevan a la aparición de células de reposo, mixósporas, localizadas en el interior de los cuerpos fructificantes (esporulación).

Han sido aislados un gran numero de mutantes relacionados con el desarrollo y comprobado que pueden agruparse en tres amplias clases: mutantes que no agregan ni esporulan, es decir, que se comportan

como defectivas en la iniciación del desarrollo (Hagen *et al.*, 1.978; Morrison y Zusman, 1.979; McVittie *et al.*, 1.962; Rudd y Zusman, 1.979); mutantes que esporulan pero que no agregan adecuadamente (Hagen *et al.*, 1.978; Morrison y Zusman, 1.979); y, finalmente, mutantes que agregan normalmente pero que no forman esporas. Estos resultados sugieren que el desarrollo puede ser dividido en tres etapas: iniciación, agregación con formación de cuerpos fructificantes y esporulación.

**Iniciación.** El desarrollo es una respuesta a una carencia nutricional que dispara la iniciación del proceso, considerándose que una inanición parcial es más probable que conduzca a un desarrollo rápido y sincrónico que una inanición severa, puesto que los aminoácidos, carbono y energía son requeridos para la consumación con éxito del desarrollo (Manoil y Kaiser, 1.980b).

En especies celulolíticas, tales como *Sorangium compositum*, el desarrollo se inicia cuando la fuente hidrocarbonada se convierte en limitante (Couche, 1.969). En las especies proteolíticas, tales como *M. xanthus*, el hambre de aminoácidos es la señal ambiental principal para la iniciación del desarrollo (Dworkin, 1.963).

Estudios sobre el control nutricional del desarrollo llevados a cabo sobre esta última bacteria, mediante el empleo de medios definidos, han demostrado que la inanición parcial para los aminoácidos que son requeridos para el crecimiento vegetativo (leucina, isoleucina y valina) induce rápidamente el desarrollo (Manoil y Kaiser, 1.980b; Bretscher y Kaiser. 1.978), pero, sin embargo, la carencia de otros aminoácidos n esenciales, de la fuente de carbono y energía (piruvato) y de fosfatos inorgánicos también dispara dicho proceso (Manoil y Kaiser, 1.980b).

La naturaleza de las señales intracelulares implicadas en la detección de los niveles de aminoácidos e iniciación del desarrollo permanece sin ser aclarada, habiéndose relacionado con la respuesta estricta y sus mediadores (Manoil y Kaiser, 1.980a y 1.980b), con la familia de aminoácidos del aspártico y la aspartoquinasa (Rosenberg *et al.*, 1.973b) y con compuestos derivados de la adenina y nucleótidos cíclicos (Campos y Zusman, 1.975; Manoil y Kaiser, 1.980c; Passador y McCurdy, 1.985).

**Agregación.** Supuesta una iniciación del desarrollo adecuada, las células de los enjambres de mixobacterias se deslizan hacia centros de agregación para constituir acúmulos que finalmente darán lugar a cuerpos fructificantes.

La agregación necesita para ser llevada a cabo con éxito, a más de la carencia nutricional necesaria para la iniciación, una superficie sólida que soporte el movimiento deslizante, una gran densidad celular y, en algunas especies, luz (Wireman y Dworkin, 1.975; Qualls *et al.*, 1.978).

La fructificación requiere normalmente la participación de decenas de miles de células, de manera que si no está presente un número suficiente de éstas la agregación no tiene lugar o es muy pobre (Wireman y Dworkin, 1.975). Fundado en este fenómeno ha sido desarrollado un método de ensayo muy simple para la identificación de factores determinantes de la agregación, consistente en la diseminación de células sobre la superficie de un agar no nutritivo, a una densidad inferior a la que permite la agregación, tratamientos de las mismas con los factores en cuestión y observación de su efecto sobre la agregación. Los resultados obtenidos en la práctica de este ensayo sugieren que ciertos compuestos actúan como señales intercelulares en la agregación de *M. xanthus* y *Sigmatella aurantiaca*.

Las células de *S. aurantiaca*, a densidades menores de la permisiva, son estimuladas para formar cuerpos fructificantes por la luz, una feromona y compuestos derivados de la guanina (Stephens y White, 1.980 y 1.982; Qualls *et al.*, 1.978). Una combinación de las luz más feromona, o de feromona y guanosina monofosfato, aceleran dramáticamente la agregación. Las interacciones entre luz, feromona y los compuestos con guanina en relación con la agregación son desconocidas y constituyen un problema fascinante que merece la máxima atención.

En *M. xanthus* la agregación no es estimulada por la luz; no obstante, compuestos conteniendo adenina estimulan en este caso la formación de cuerpos fructificantes (Shimkets y Dworkin, 1.981). La adenosina parece ser la señal principal para la agregación y su secreción no es constitutiva, sino que está regulada por el propio desarrollo; no obstante, al parecer se segregan otras señales químicas no conocidas.

La interpretación más racional de estos experimentos consiste en suponer que la agregación es nula o defectuosa a concentraciones bajas de células porque éstas no pueden generar cantidades suficientes de las señales de agregación.

Se ha conseguido aislar un gran número de mutantes agregación-defectiva, muchas de las cuales presentan un defecto en la movilidad. Esto es lógico si se considera que para la formación de cuerpos fructificantes las células en la vecindad de un centro de agregación deben ser capaces de localizarlo y moverse hacia él, lo que requiere movimientos de grupos coordinados y un control de la dirección del movimiento celular.

Finalmente, debe ser citado que durante la agregación en *M. xanthus* se produce una lectina conocida como MBHA ("MixoBacterial

HemAgglutinin") que llega a representar el 1-2 % de las proteínas del cultivo (Cumsky y Zusman, 1.979). MBHA se encuentra en la superficie de las células y se localiza específicamente en los polos de las mismas, lo que sugiere que pueda funcionar en interacciones polo a polo durante la agregación. No obstante, el papel de la MBHA en el desarrollo es hoy por hoy desconocido, si bien se sabe que está de algún modo relacionada con la movilidad social (Cumsky y Zusman, 1.979 y 1.981).

En la actualidad las proteínas de superficie de las células en desarrollo se están estudiando mediante el empleo de anticuerpos monoclonales (Gill y Dworkin, 1.986).

**Esporulación.** Simultaneamente con la formación de cuerpos fructificantes tiene lugar, como ha sido citado, una morfogénesis celular durante la cual las células vegetativas se convierten en mixósporas, que se localizan en los cuerpos fructificantes. Las mixósporas se diferencian de las endosporas formadas por las especies del género *Bacillus* en dos características fundamentales: las endosporas son células formadas *de novo*, mientras que las mixósporas son las mismas células vegetativas transformadas; y las mixósporas, aunque resisten condiciones adversas tales como calor (60º C durante 1 hora), detergentes y sonicación, son mucho menos resistentes que las endosporas de *Bacillus*.

El proceso de esporulación ocurre normalmente junto con el de agregación pero, como ha sido ya citado, estos dos procesos, aunque interrelacionados, son independientes y transcurren paralelamenrte.

En *M. xanthus* el proceso de esporulación es reversible hasta las 32 horas de iniciado el desarrollo, tiempo al cabo del cual las células se encuentran ya en un estado "comprometido" a esporular y esporulan aunque se las traslade a un medio rico (Wireman, 1.979).

Evidentemente esto supone la existencia tras la iniciación de un periodo de señalización intercelular que "compromete" a las células para llevar a cabo la esporulación.

Un hecho muy destacado en el proceso de esporulación es la autolisis del 80% aproximadamente de las células agregadas, de forma que solamente un 20% llegan a formar mixósporas (Wireman y Dworkin, 1.975 y 1.977). Esta autolisis masiva parece ser que está ligada al programa de desarrollo, ya que los mutantes SpoC, que no muestran autolisis, no esporulan; la estimulación en estos mutantes de la esporulación se traduce paralelamente en unos niveles normales de autolisis (Shimkets y Kaiser, 1.982b). Wireman y Dworkin (1.977) han formulado la hipótesis de que, dado que el desarrollo supone un estado de inanición, la muerte y lisis de la mayor parte de la población tiene por objeto suministrar a los supervivientes suficientes nutrientes para esporular. Esto podría ser considerado, desde un punto de vista sociobiológico, como un caso de altruismo por parte de la población que se sacrifica; aunque también cabe considerarlo como un caso de canibalismo por parte de la población superviviente.

Otra teoria mantiene que algunos de los productos liberados en la lisis podrían actuar como señales químicas que inducirían la esporulación. Los resultados obtenidos por Shimkets y Kaiser (1.982a) apoyan esta hipótesis, ya que pudieron comprobar que los componentes del peptidoglucano son capaces de inducir la esporulación en mutantes SpoC.

Como en el caso anterior, esta última hipótesis también considera la autolisis como un fenómeno de cooperación entre las células de la población; sin embargo, hay que tener en cuenta que las células esporulantes que están sujetas a morfogénesis son osmóticamente delicadas y, por tanto, están expuestas a la lisis, que podría

representar sólo un fracaso en el intento de esporular, con poco o ningún papel en el desarrollo (Zusman, 1.984).

En cuanto al mecanismo íntimo de la autólisis poco es conocido. Recientemente han sido puestas de manifiesto y extraídas de las células vegetativas unas sustancias, conocidas como autocidas, capaces de matar y lisar células de *M. xanthus* (Varon *et al.*, 1.984). De estas autocidas la más abundante, conocida por AM I, es una mezcla de ácidos grasos que han sido purificados e identificados (Varon *et al.*, 1.986), correspondiendo el 75% de su actividad autolítica a ácidos grasos monoinsaturados. Todos los mutantes AM I-resistentes son incapaces de formar cuerpos fructificantes.

Durante la esporulación las células vegetativas se van recubriendo de una cubierta gruesa y cambian de forma. La excepción la constituyen las especies de la familia *Polyangiaceae* cuyas mixósporas son idénticas a las células vegetativas. Por el contrario, en la familia *Myxococcaceae* el cambio de forma es muy acusado dado que las mixósporas tienen forma esférica. En los restantes casos las mixósporas aparecen como formas bacilares acortadas. En todos los casos la tasa respiratoria de las mixósporas es nula. Entre los componentes de las cubiertas de las mixósporas maduras destacan dos proteínas; una que es sintetizada tempranamente durante el proceso de esporulación recibe el nombre de proteína S y la otra que se sintetiza tardíamente el nombre de proteína U (Inouye *et al.*, 1.979a y 1.979b).

La diferenciación de células vegetativas a mixósporas no es dependiente de la formación de cuerpos fructificantes, ya que Dworkin y Gibson (1.964) observaron que la adición de glicerol 0'5 M a cultivos de *M. xanthus* en fase exponencial daba lugar a la producción de mixósporas. Con posterioridad Bacon y Rosenberg

(1.967) encontraron que otros polialcoholes y el dimetilsulfóxido tenían el mismo efecto que el glicerol.

Las mixósporas obtenidas tras la inducción con los compuestos citados son similares a las que se encuentran en los cuerpos fructificantes por lo que respecta a forma, refringencia y resistencia a los agentes externos, pero son diferentes en otros aspectos. Así por ejemplo presentan una tasa de respiración del orden del 20% de la de las células vegetativas (Bacon *et al.*, 1.975), acumulan gran cantidad de carbohidratos y su cubierta es mucho más delgada, ya que aunque presentan la proteína U carecen de la proteína S. Esta última diferencia se cree que es debida a que en la esporulación inducida con glicerol sólo tienen lugar los últimos pasos del proceso de esporulación que se da durante la formación de cuerpos fructificantes (Zusman, 1.984), por lo que la síntesis de proteína S que es temprana no se efectua.

**Germinación y significado del ciclo de desarrollo.** La mayoría de los estudios realizados sobre el ciclo de desarrollo han sido enfocados hacia los procesos de agregación y esporulación, habiéndose abordado pocas veces el estudio de la germinación de las mixósporas y siendo, por tanto, escasos los conocimientos existentes sobre la misma.

La germinación tiene lugar cuando las mixósporas son colocadas en un medio rico en nutrientes, por lo que se cree que alguno de éstos debe actuar como señal para el desencadenamiento del proceso. Existe evidencia de que en *M. xanthus* el fosfato inorgánico actua como factor activador de la germinación de las mixósporas obtenidas por inducción con glicerol (Dworkin, 1.973); por el contrario, las mixósporas de cuerpos fructificantes de esta misma bacteria no parecen responder a esta señal (White. 1.975). En *M. coralloides* la germinación de las mixósporas inducidas con glicerol es independiente de la concentración de fosfato (González *et al.*, 1.987).

En medios pobres (agua destilada, p.e.) la germinación requiere una vez más cooperación celular, ya que sólo tiene lugar si la densidad celular es alta (Dworkin, 1.973).

En cualquier caso, una vez desencadenada la germinación, las mixósporas pierden rápidamente su refringencia, la cubierta se rompe y emerge la nueva célula vegetativa bacilar, dejando atrás la cubierta vacía (Voelz y Dworkin, 1.962).

Aún cuando las mixóporas pueden germinar aisladamente en medios ricos, este hecho no se da en la naturaleza, en la que, supuesto que existan condiciones favorables, germinan simultaneamente todas las mixósporas contenidas en un cuerpos fructificante o un esporangio, con lo que directamente se origina un nuevo enjambre donde se reemprende el crecimiento vegetativo.

Precisamente este hecho es el que da significación biológica al complicado ciclo de desarrollo de las mixobacterias, ya que su función no es otra que asegurar que los nuevos ciclos vegetativos se inicien a partir de una comunidad y no de una célula aislada. En este sentido, los cuerpos fructificantes pueden ser considerados como colonias o enjambres en reposo.

Cabe preguntarse ahora el por qué de esa necesidad de que los ciclos de crecimiento vegetativo se inicien con una comunidad. La respuesta está en la peculiar modalidad de nutrición que desarrollan estas bacterias en la naturaleza. Efectivamente, como ha sido citado, las mixobacterias viven a expensas de la degradación de macromoléculas que generalmente forman parte de partículas solidas. Esto supone, de una parte, que el alimento no difunde hacia ellas, sino que son ellas las que tienen que ir hacia el alimento, lo que motiva el movimiento deslizante, y, de otra, que para captar nutrientes las mixobacterias deben producir y excretar al medio un conjunto de

enzimas que hidrolicen la macromolécula en cuestión. Si las mixobacterias creciesen aisladamente la cantidad de enzimas producida por una sola célula sería muy escasa, con lo que la degradación de la macromolécula sería muy lenta y además los productos de su degradación, al difundir radialmente, sólo serían aprovechados mínimamente por la célula. Por el contrario, si una macromolécula o partícula es atacada por un enjambre la producción de enzimas será decenas de miles de veces más elevada, con lo que las macromoléculas se degradarán mucho más rápidamente y además el aprovechamiento de sus productos de degradación será mucho mayor, ya que al ser absorbidos por toda la comunidad las pérdidas por difusión se reducirán a un mínimo.

**Autolisis de cultivos dispersos.**

Como ha sido ya citado, durante el ciclo de desarrollo, una vez que las células se han agregado y antes de la esporulación, tiene lugar la lisis del 80% de la población aproximadamente, de manera que sólo el 20% llega a convertirse en mixósporas.

Ahora bien, en mixobacterias la autolisis no se da exclusivamente durante el ciclo de desarrollo, sino también, y con bastante frecuencia, durante el ciclo vegetativo en cultivos dispersos en medios líquidos. En estos casos los cultivos, tras una fase de crecimiento exponencial, entran en una corta fase estacionaria que se continua por una autolisis exponencial del cultivo que lleva a la muerte de todas las células. Este fenómeno ha sido descrito en *M. xanthus* (Mason y Powelson, 1.958), *M. virescens* (Haskâ y Stahl, 1.971) y *M. coralloides* (Fernandez-Vivas *et al.*, 1.983a), bacteria esta última sobre la que se han realizado la mayoría de los estudios sobre autolisis vegetativa.

Se han encontrado evidencias de que la autolisis es disparada por una factor activador que es liberado al medio durante la fase de crecimiento exponencial y que cuando alcanza una concentración critica activa los enzimas autoliticos (Arias *et al.*, 1.983). De otra parte, se ha encontrado que la composición del medio de cultivo influye poderosamente sobre la autolisis, en especial la concentración de fosfatos inorgánicos; concentraciones de ortofosfato de 40 mM inhiben totalmente el proceso (Fernández-Vivas *et al.*, 1.983a). Por otro lado, se ha conseguido inducir la lisis mediante el tratamiento de cultivos en fase de crecimiento exponencial con antibióticos que inhiben la síntesis de proteínas o de ARN y con agentes desacopladores de la fosforilación oxidativa; resultados que implican que la estabilidad celular está condicionada por una o varias proteínas y que la autolisis está estrechamente relacionada con el estado energético de la membrana (Fernández-Vivas, 1.983: Fernández-Vivas *et al.*, 1.985). No se ha encontrado en cambio relación entre la concentración de nucleótidos hiperfosfatados y el proceso de autolisis (Fernández-Vivas *et al.*, 1.983b).

Finalmente, ya ha sido mencionado el efecto de las autocidas de *M. xanthus* (Varon *et al.*, 1.984) sobre la muerte y lisis de la citada bacteria; es posible que dichas autocidas intervengan también en estos procesos de autolisis.

**Producción de antibióticos.**

La capacidad de las mixobacterias para producir sustancias de tipo antibiótico fue descrita por primera vez por Oxford (1.947), quién encontró que los sobrenadantes de cultivos de *M. virescens* inhibían el crecimiento de *Staphylococcus aureus*. No obstante, todos los intentos para aislar y purificar los antibióticos responsables de esta actividad fracasaron y un año más tarde Woods (1.948) fue incapaz de reproducir los resultados de Oxford.

Unos años más tarde Noren (1.953b), trabajando igualmente con *M. virescens*, no pudo tampoco reproducir los resultados de Oxford en relación con la inhibición del crecimiento de *S. aureus*. pero en cambio encontró actividad frente a *Aerobacter aerogenes*. De otra parte, también encontró que una estirpe de *Chondrococcus coralloides* producía sustancias antagónicas para *S. aureus* pero no para *A. aerogenes*; el hipotético antibiótico demostró ser muy inestable. Los resultados de Noren sobre *M. virescens* no pudieron ser reproducidos por otros autores (Kletter y Henis, 1.963).

Katto (1.955) afirmó que dos razas de *M. fulvus* aisladas por él mostraron actividad de tipo antibiótico tanto frente a bacterias Gram-negativas como Gram-positivas. Nuevamente estos resultados no pudieron ser reproducidos (Margalith, 1.962).

En 1.962, Noren y Raper informaron que una gran variedad de mixobacterias (*M. virescens, M. stipitatus,, M. fulvus, M. lactis, Ch. lacticus y Ch. crocatus*) producían antibióticos activos frente a cierto número de bacterias Gram-positivas, pero no frente a bacterias Gram-negativas. Como en casos anteriores, tampoco pudo ser aislado ningún antibiótico.

Durante la década de los sesenta la producción de antibióticos por mixobacterias siguió siendo un tema objeto de controversia y al que se prestó poca atención. Paradójicamente el interés por el mismo se reavivó con el descubrimiento y aislamiento de la **mixina**, un antibiótico producido por una bacteria identificada originalmente como una especie de *Sorangium* (Peterson *et al.*, 1.966), pero que más tarde fue clasificada como una especie de *Lysobacter* no relacionada con las mixobacterias.

Hay que esperar a 1.973, fecha en la que Rosenberg y colaboradores aislaron el antibiótico **TA** de *M. xanthus*, para tener la

primera demostración clara y directa de la producción de un antibiótico por una mixobacteria. Con posterioridad, los trabajos de Arias y colaboradores en Granada y sobre todo los del grupo dirigido por Hans Reichenbach en el Gesellschaft fur Biotechnologische Forschung de Braunschweig, han demostrado que las mixobacterias son una fuente abundante de antibióticos de muy diversa naturaleza química, con un amplio rango de acción y espectros antimicrobianos muy variados.

Por lo que respecta al antibótico TA de *M. xanthus* (Rosenberg *et al.*, 1.973), ha sido cristalizado y aun cuando su estructura quçimica ne es aún conocida, si se han estudiado sus propiedades químicas (Rosenberg *et al.*, 1.982; Fytlovitch *et al.*, 1.983).

Es un antibiótico bactericida, tanto frente a bacterias Gram-positivas como Gram-negativas, pero inactivo frente a levaduras, mohos y protozoos (Rosenberg *et al.*, 1.973; Vaks *et al.*, 1.974). Las bacterias más sensibles (*Klebsiella pneumoniae*, p.e.) son muertas por 0'1-1 µg/ml de antibiótico, mientras que las más resistentes (*Pseudomonas fluorescens*, p.e.) necesitan para morir 10-25 µg/ml de TA.

El antibiótico TA interfiere con la biosíntesis del peptidoglucano, por inhibición de la polimerización del disacárido-pentapeptido (Zafriri *et al.*, 1.981). Su producción es reprimida por una aireación fuerte o grandes concentraciones de peptona (Mizrahi *et al.*, 1.976). La alanina, serina y glicocola actuan como precursores (Fytlovitch *et al.*, 1.983).

El siguiente antibiótico de mixobacterias descrito fue la **ambruticina**, antibiótico antifúngico producido por *Polyangium cellulosum* ssp. *fulvum*. Desde el punto de vista químico es un ácido ciclopropil-polieno-pirano y es activo frente a una variedad de

hongos, incluidos algunos de gran interes médico tales como *Coccidiodes inmitis*, *Histoplasma capsulatum*, *Blastomyces dermatitides* y los hongos filamentosos dermatofíticos; sobre bacterias tiene una actividad muy baja (Ringel *et al.*, 1.977).

En 1.979, Arias y colaboradores aislaron un antibiótico de *M. coralloides* activo frente a una variedad de bacterias Gram-positivas pero no frente a Gram-negativas o levaduras. El antibiótico, que ha sido caracterizado y purificado parcialmente (Arias *et al.*, 1.979a; Arias *et al.*, 1.979c), tiene un efecto bactericida y lítico sobre las bacterias sensibles a su acción cuando éstas se encuentran en fase de crecimiento, pero es totalmente inactivo sobre células en reposo o cuyo crecimiento haya sido detenido por la acción de otro antibiótico bacteriostático Arias *et al.*, 1.979a; Arias *et al.*, 1.979b).

En 1.980. Reichenbach y colaboradores aislaron de *M. fulvus*, estirpe Mx f16, un nuevo antibiótico antifúgico al que llamaron **mixotiazol**. Su estructura química ha sido descifrada, habiéndose comprobado que la cisteina, treonina, leucina e isolucina son los precursores biosintéticos de la molécula (Gerth *et al.*, 1.980; Trowitzch *et al.*, 1.980).

El mixotiazol actua preferentemente sobre células eucariotas, inhibiendo a concentraciones de 0'01-3 µg/ml el crecimiento de muchas levaduras y mohos, merced al bloqueo del transporte de electrones dentro del segmento citocromos b - $c_1$ de la cadena respiratoria mitocondrial. El mixotiazol es muy tóxico para el ratón ($LD_{50}$: 2 mg/Kg) y fibroblastos de embrión de pollo (Thierbach y Reichenbach, 1.981a y 1.981b; Thierbach y Michaelis, 1.982).

Sobre bacterias ha mostrado ser activo solamente frente a *Micrococcus luteus*, *Nocardia corallina* y *Paracoccus denitrificans*.

Sobre esta ultima bacteria, cuya cadena transportadora de electrones es similar a la mitocondrial, el efectos del mixotiazol es similar al ejercido en mitocondrias de células eucarióticas (Thierbach y Reichenbach, 1.983).

En 1.982 fue aislado, también por el grupo de Reichenbach, otro antibiótico, **altiomicina**, de sobrenadantes de cultivos de *Cystobacter fuscus*, *M. virescens* y *M. xanthus* (Kunze *et al.*, 1.982); antibiótico que había sido descubierto previamente en *Streptomyces* sp. La altiomicina es activa frente a bacterias Gram-positivas y algunas Gram-negativas, pero es inactiva frente a microorganismos eucarióticos (Sakakibara *et al.*, 1.974). Este antibiótico inhibe la síntesis de proteínas a nivel de la subunidad 50S de los ribosomas por interferencia con la reacción de transpeptidación (Pestka y Brot, 1.971).

Otro antibiótico, descubierto en 1.982 por Reichenbach y colaboradores (Gerth *et al.*, 1.982a), es la **pirrolnitrina**, antibiótico antifúngico producido por la estirpe Mx f147 de *M. fulvus*. Como en el caso anterior, este antibiótico había sido descubierto en otras bacterias, concretamente en especies del género *Pseudomonas* (Elander *et al.*, 1.968), y sus propiedades antifúngicas descritas (Nishida *et al.*, 1.965). Además de por *M. fulvus* la pirrolnitrina es producida por otras mixobacterias (*Corallococcus exiguus* y *Cystobacter ferrugineus*).

Las **mixovirescinas** son una familia de al menos 12 antibióticos macrocíclicos estrechamente emparentados producidos por la estirpe Mx v48 de *M. virescens* (Gerth *et al.*, 1.982b). El principal antibiótico de la mezcla, mixovirescina A, cuya estructura química ha sido descifrada (Trowitzsch *et al.*, 1.982), parece ser muy similar al antibiótico TA de *M. xanthus*.

La mixovirescina A es activa frente a enterobacterias y otras bacterias Gram-negativas y a concentraciones elevadas también actua sobre algunas Gram-positivas; es totalmente inactiva frente a levaduras y mohos. Su acción parece consistir en un bloqueo de la síntesis de la pared celular.

Muy diversa estructura química presentan los antibióticos aislados de la estirpe Mx f65 de *M. fulvus*, ya que en este caso se trata de antibióticos peptídicos a base de valina, alanina y arginina y varios aminoácidos inusuales. Las **mixovalarginas**, como han sido llamados, son más activas frente a bacterias Gram-positivas que frente a Gram-negativas, siendo inhibidoras de la síntesis de proteinas (Irschik *et al.*, 1.983a).

El siguiente grupo de antibióticos aislado por el grupo de Reichenbach fue el de las **mixalamidas**, obtenidas a partir de sobrenadantes de cultivos de la cepa Mx x12 de *M. xanthus* (Gerth *et al.*, 1.983). Las mixalamidas (A, B, C y D) son activas frente a levaduras, mohos y algunas especies de bacterias Gram-positivas, donde bloquean la cadena respiratoriaa nivel del complejo NADH : ubiquinona reductasa, impidiendo la reducción del citocromo b. Su estructura química ha sido dilucidada (Jansen *et al.*, 1.983).

También en 1.983 se aislaron dos antibióticos de constitución similar, **mixopironinas A y B**, de la cepa Mx f50 de *M. fulvus* (Irschik *et al.*, 1.983b). Los dos antibióticos, cuya estructura química también ha sido descifrada (Kohl *et al.*, 1.983b), han mostrado ser unos poderosos inhibidores de la ARN polimerasa de bacterias y son activas fundamentalmente frente a bacterias Gram-positivas.

Un nuevo antibiótico antifúngico es la **estigmatelina**, aislado de cultivos de *Stigmatella aurantiaca* (Kunze *et al.*, 1.984; Höfle *et al.*,

1.984). No es activa frente a bacterias y es muy tóxico para animales.

Las **coralopironinas (A, B y C)** son un grupo de antibióticos, de estructura química similar a la de las mixopironinas, que han sido aisladas de cultivos de *Corallococcus coralloides* (Irschik *et al.*, 1.985). Al igual que ellas son inhibidoras de la ARN polimerasa y activas frente a bacterias Gram-positivas.

Los últimos antibióticos aislados por Reichenbach y colaboradores han sido las **sorangicinas A y B**, producidas por el *Polyangium cellulosum*, cepa So ol2 (Irschik *et al.*, 1.987). Las dos formas son activas pricipalmente frente a bacterias Gram-positivas, incluyendo micobacterias, y su efecto se basa igualmente en la inhibición de la ARN polimerasa.

Finalmente, un grupo de investigadores japoneses (Miyashiro *et al.*, 1.988; Takayama *et al.*, 1.988) han aislado recientemnte un grupo de nuevos antibióticos macrocíclicos de *Myxococcus virescens*, las **megovalicinas**, similares en cuanto a estructura y acción a las mixovirescinas.

Hasta aquí este breve resumen sobre los antibióticos de mixobacterias que han sido bien caracterizados; queda por hacer un breve comentario sobre el papel biológico de estos antibióticos.

Ya muy tempranamente se sugirió que la producción de antibioticos microbicidas podría estar relacionada con la lisis de bacterias y otros microorganismos vivos, en el sentido de que matarían y posiblemente modificarían de alguna forma las estructuras superficiales de los mismos como paso previo a la acción de los enzimas extracelulares que consumarían la lisis (Oxford y Singh, 1.946; Oxford, 1.947; Noren 1.953a).

Esta hipótesis fue totalmente descartada durante los años sesenta y buena parte de los setenta debido a que, como ha sido indicado, no fue posible durante este tiempo demostrar de manera firme la producción de antibióticos estables por las mixobacterias, en contraste con su patente habilidad lítica. Hoy dia, sin embargo, en que practicamente todas las estirpes de mixobacterias investigadas han demostrado ser capaces de producir antibioticos (Reichenbach, 1.986), esta hipotesis vuelve a cobrar fuerza y se tiende a admitir que los antibioticos pueden desempeñar un papel activo en la lisis de microorganismos, en el sentido indicado (Rosenberg y Varon, 1.984).

Como podrá verse más adelante, en esta Memoria se llega a la conclusión de que en el caso de *M. coralloides* D la producción de antibióticos constituye ademas una señal desencadenante del proceso de autolisis.

# OBJETO DEL TRABAJO

Como ha sido citado, Arias y colaboradores (1.979a, 1.979b y 1.979c) pusieron de manifiesto la producción de un antibiótico, activo fundamentalmente frente a bacterias Gram positivas, por parte de una estirpe de *M. coralloides* capaz de crecer en forma dispersa en medios líquidos (*M. coralloides* D).

En dichos trabajos estudiaron la producción y purificación parcial del citado antibiótico, su espectro antibacteriano, su comportamiento frente a distintos agentes físicos y químicos, así como comprobaron el efecto bactericida del mismo.

Los citados trabajos, no obstante, eran, de una parte, suceptibles de ser perfeccionados en lo referente a la producción y purificación del antibiótico y, de otra, no abordaron, o lo hicieron muy superficialmente, el estudio de su mecanismo de acción, su efecto sobre la

propia bacteria productora y su efecto *in vivo* sobre las bacterias sensibles.

Es por ello que se consideró oportuno llevar a cabo este trabajo de investigación en el que, como se indica en su titulo, se ha abordado el estudio de la producción de los antibióticos de *M. coralloides* D en distintas condiciones de cultivo y en presencia de distintas fuentes de nutrientes; se ha intentado y conseguido confeccionar un esquema de extracción y purificación que permite obtener el antibiótico mayoritario en un estado de relativa pureza; se ha estudiado el espectro antimicrobiano del citado antibiótico mayoritario y su efecto, *in vitro*, sobre la bacteria más sensible a su acción, *S. aureus*, así como investigado los procesos biosintéticos que interfiere en esta bacteria; también se ha estudiado el efecto de este antibiótico sobre la propia bacteria que lo produce y otras mixobacterias y las implicaciones biológicas del citado efecto; y, finalmente, se ha comprobado su efecto *in vivo* sobre una bacteria patógena sensible a su acción.

De todo ello se da cuenta en los capítulos siguientes de esta Memoria.

# MATERIAL Y METODOS

## 1. MICROORGANISMOS EMPLEADOS.

En la producción del antibiótico se ha empleado el ***Myxococcus coralloides*** D, cepa McA-1, aislada por Arias y Montoya en 1.978. Esta cepa es capaz de crecer en forma dispersa en medios líquidos en los cuales, tras una corta fase estacionaria, sufre un proceso de autolisis completa una vez terminada la fase de crecimiento exponencial. Esta misma cepa ha sido también utilizada para estudiar el efecto del antibiótico aislado sobre la bacteria productora.

Los mutantes superproductores McLm 81, 83, 711 y 817 han sido seleccionados en el transcurso de este trabajo, por los procedimientos que oportunamente se describirán.

Las bacterias y hongos empleados en la determinación del espectro antimicrobiano del antibiótico pertenecen a la colección del Departamento de Microbiología.

El *Staphylococcus aureus* empleado en la determinación de la actividad biológica del antibiotico ha sido la estirpe ATCC-8.

El *Myxococcus xanthus*, empleado también en la comprobación de la actividad biológica del antibiótico, ha sido la cepa DK-101, procedente de la colección de D. Kaiser.

Finalmente, la ameba "Limax", empleada en la comprobación del efecto del antibiótico sobre protozoos, ha sido la cepa S-3 de *Naegleria fowleri* de la colección del Departamento de Parasitología de la Universidad de Granada.

## 2. MEDIOS DE CULTIVO.

### 2.1. Medios de conservación y mantenimiento.

**Agar levadura.**

Este medio se ha empleado para el mantenimiento y conservación de *M. coralloides* y *M. xanthus*. Las dos mixobacterias crecen rápidamente en este medio, dando lugar a abundantes cuerpos fructificantes que se conservan viables durante varios meses. La composición de dicho medio es la siguiente:

| | |
|---|---|
| Levadura prensada de panadería . | 10'0 g |
| Agar | 20'0 g |
| Agua | 1.000 ml |
| pH 7'2 | |

La levadura, suspendida homogeneamente en una pequeña cantidad de agua, se añade al agar previamente fundido y filtrado, ajustando el pH con una solución al 10% de NaOH. El medio, como todos los restantes que se describen, se esteriliza a 117º durante 20 minutos.

### 2.2. Medios de crecimiento.

**Medio CT.**

Utilizado para el crecimiento en forma dispersa de *M. coralloides* D y *M. xanthus*, tiene la siguiente composición:

| | |
|---|---|
| Casitone (Difco) | 5'0 g |
| Sulfato de magnesio | 1'0 g |
| Fosfato dipotásico - monopotásico | 10 mM |
| Agua | 1.000 ml |
| pH 6'5 | |

**Medio CTA.**

Utilizado para el crecimiento vegetativo de *M. coralloides* D y *M. xanthus* sobre medios sólidos, responde a la siguiente composición:

| | |
|---|---|
| Casitone (Difco) | 10'0 g |
| Sulfato de magnesio | 1'0 g |
| Fosfato dipotásico - monopotásico | 10 mM |
| Agar | 18'0 g |
| Agua | 1.000 ml |
| pH 7'2 | |

**Agar común.**

Utilizado para el recuento de células viables de *S. aureus*, así como para la conservación de éste, posee la siguiente composición:

| | |
|---|---|
| Peptona | 10'0 g |
| Cloruro sódico. | 5'0 g |
| Extracto de carne (Bovril) | 3'0 g |
| Agar | 20'0 g |
| Agua | 1.000 ml |
| pH 7 | |

**Agar sangre.**

Empleado para el cultivo de *Listeria monocytogenes*, consiste en un agar común suplementado con el diez por ciento de sangre desfibrinada de carnero.

**Medio BHI.**

Infusión de cerebro - corazón (BBL); empleado para el crecimiento de *S. aureus* en medios líquidos y en las experiencias de incorporación de precursores radioactivos por esta bacteria, responde a la siguiente composición:

| | |
|---|---|
| Infusión de cerebro de ternera (sólidos). | 3'0 g |
| Infusión de corazón de buey (sólidos). | 3'0 g |
| Peptona de carne | 6'0 g |
| Digerido pancreático de gelatina | 14'5 g |
| Glucosa | 3'0 g |
| Cloruro sódico | 5'0 g |
| Fosfato disódico | 2'5 g |
| Agua | 1.000 ml |
| pH 7'4 | |

## 2.3. Medios para la producción de antibióticos.

**Medio CTG.**

Es el medio empleado por Arias y colaboradores (1.979a) para la producción de antibióticos por *M. coralloides* D. Consiste en el mismo medio CT, descrito anteriormente, adicionado de 10 g por litro de glucosa. La glucosa se esteriliza aparte, disuelta en una pequeña cantidad de agua, y se añade en condiciones asépticas al medio ya frío.

**Medio TTG.**

Ha sido el medio empleado en este trabajo de investigación para la producción masiva de antibióticos y responde a la siguiente constitución:

| | |
|---|---|
| Tripticasa (BBL). | 5'0 g |
| Glucosa | 5'0 g |
| Sulfato de magnesio. | 1'0 g |
| Fosfato dipotásico - monopotásico | 10 mM |
| Agua | 1.000 ml |
| pH 6'5 | |

Como en el caso anterior la glucosa se esteriliza aparte.

**Otros medios de producción.**

Como se expone en el capítulo siguiente, en los estudios sobre el efecto de las fuentes de carbono y nitrógeno sobre la producción de antibióticos, se emplearon diversos medios derivados del CTG en los que el casitone fue sustituido por peptona de carne (ADSA-Micro), Caseina (Merck), polipeptona (BBL), peptona de soja (Merck), probion F y probion L (Hoechst).

## 2.4. Medios empleados en la determinación de la actividad antibiótica.

**"Antibiotic medium - 1".**

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

| | |
|---|---|
| Peptona de gelatina. | 6'0 g |
| Tripticasa | 4'0 g |
| Extracto de levadura. | 3'0 g |
| Extracto de carne | 1'5 g |
| Glucosa. | 1'0 g |
| Agar. | 15'0 g |
| Agua . | 1.000 ml |
| pH 6'6 | |

**"Antibiotic medium - 2"**

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

| | |
|---|---|
| Peptona de gelatina. | 6'0 g |
| Extracto de levadura. | 3'0 g |
| Extracto de carne | 1'5 g |
| Agar. | 15'0 g |
| Agua | 1.000 ml |
| pH 6'6 | |

**Medio NG**

Este medio (Lindegren *et al.*, 1.958) se ha empleado para comprobar el efecto del antibiótico sobre el crecimiento de hongos filamentosos y levaduras y tiene la siguiente composición:

| | |
|---|---|
| Extracto de levadura (BBL) | 4'0 g |
| Peptona de carne (Analema) | 3'6 g |
| Glucosa | 10'0 g |
| Fosfato monopotásico | 0'2 g |

| | |
|---|---|
| Sulfato de magnesio | 1'0 g |
| Sulfato amónico | 2'0 g |
| Agar | 20'0 g |
| Agua | 1.000 ml |

El pH original de este medio es de 4'5, pero dado que en estas condiciones el antibiótico es insoluble en agua y su difusión baja, se empleo un pH final de 6'5.

**Medio THA**

Caldo Todd Hewitt (Instituto Pasteur) añadido de agar; se ha empleado para comprobar el efecto del antibiótico sobre *Streptococcus agalactiae* y tiene la siguiente composición:

| | |
|---|---|
| Infusión de corazón de buey | 500'0 ml |
| Peptona | 20'0 g |
| Glucosa | 2'0 g |
| Cloruro sódico. | 2'0 g |
| Fosfato disódico anhidro.. | 0'4 g |
| Bicarbonato sódico | 2'5 g |
| Agar | 15'0 g |
| Agua | 500'0 ml |

**Medio de Nelson.**

Empleado para el cultivo de *Naegleria fowleri* (Nelson y Jones, 1.970) y la observación del efecto del antibiótico sobre la citada ameba, tiene la siguiente composición:

| | |
|---|---|
| Cloruro sódico | 0'120 g |
| Sulfato de magnesio | 0'004 g |
| Fosfato disódico | 0'004 g |
| Fosfato monopotásico | 0'142 g |
| Glucosa | 1'000 g |
| "Panmede" (Extracto hepático) | 1'000 g |
| Agua | 1.000 ml |

El medio se suplementa con un 10% de suero bovino fetal inactivado.

## 3. TECNICAS DE CULTIVO.

### 3.1. Conservación de las cepas de *M. coralloides* y *M. xanthus*.

Se ha llevado a cabo por resiembras periódicas, cada 30 días aproximadamente, en cajas de Petri con agar levadura. Las cajas, después de inoculadas, se incubaron a 28º durante cuatro días y a continuación se conservaron en la oscuridad a temperatura de aproximadamente 4º.

### 3.2. Propagación de las cepas de *M. coralloides*.

Se llevó a cabo a partir de cultivos en agar levadura, por siembra de los cuerpos fructificantes en tubos con 5 ml de medio CT. Los tubos se incubaron a 28º, con agitación continua, y a partir de ellos se efectuaron resiembras sucesivas a intervalos menores de 48 horas para evitar la autolisis o bien se emplearon como inóculos para volúmenes mayores de medio.

## 4. MEDIDA DEL CRECIMIENTO BACTERIANO.

### 4.1. Medidas turbidimétricas.

Se llevaron a cabo determinando la densidad óptica a 650 nm en un Spectronic 20 a intervalos regulares de tiempo. Para este fin, los cultivos se llevaron a cabo en "nefelómetros" consistentes en matraces Erlemmeyer de 100 ml, conteniendo 20 ml de medio, provistos de una tubuladura lateral del calibre adecuado para el espectrofotómetro.

En las experiencias de corta duración, en las que la esterilidad no es absolutamente necesaria, el seguimiento de la densidad óptica de los cultivos se llevó a cabo en tubos de Spectronic, sin taponar, con 6 ml de medio.

### 4.2. Determinación del número de células viables.

Empleada para cultivos de *S. aureus* y *M. xanthus*, se llevó a cabo por la técnica ordinaria de diseminación en la superficie de un medio adecuado (agar común o CTA, según los casos) de 0'1 ml de una dilución adecuada del cultivo problema. Al objeto de poder calcular la media estadística, de cada dilución se sembraron 5 caja de Petri con el volumen indicado.

### 4.3. Determinación del número de células totales de *M. coralloides*.

Empleada en la determinación del número de células en los cultivos en diálisis, se llevó a cabo en una cámara de Petrofi-Hauser, según la técnica ordinaria y empleando un miscroscopio de fase Zeiss KpiW.

## 5. PRODUCCION DEL ANTIBIOTICO.

Salvo en los casos en que se indica expresamente, se llevó a cabo sobre medio TTG, segun las siguientes modalidades:

### 5.1. Producción en cultivos en agitación.

Se emplearon matraces Erlemmeyer de 1000 ml de capacidad con 500 ml de medio. Los matraces fueron inoculados con el 1% de su volumen de un cultivo de *M. coralloides* D de 48 horas sobre medio CT y se incubaron a 28º en un agitador orbital, a 200 rpm.

### 5.2. Producción en cultivos sumergidos.

Se llevó a cabo empleando fermentadores consistentes en matraces esféricos de fondo plano de 10 litros de capacidad, conteniendo 9 litros de medio. Los matraces estuvieron provistos de un tapón de caucho con tres orificios correspondientes a la entrada de aire estéril, salida del mismo y paso de un tubo de silicona conectado con una bomba peristáltica y empleado para siembras y toma de muestras. La aireación empleada fue de 2'4 litros por minuto y litro de medio, que, aparte de la oxigenación necesaria, suministra a los cultivos una agitación adecuada. Al objeto de evitar la formación de espuma, se añadió al medio, antes de su esterilización, 0'25 ml por litro de silicona antiespumante. Como en casos anteriores los fermentadores se incubaron a 28º.

### 5.3. Producción en medios sometidos a diálisis.

Se llevó a cabo en sacos de diálisis con 50 ml de medio, sumergidos en 1.800 ml de medio de igual composición.

Para confeccionar los sacos de diálisis se emplearon tubos de diálisis de 2'5 cm de diámetro que permiten el paso de moléculas de un tamaño inferior a 12.000 daltons. Al objeto de abrir los poros y estabilizar las membranas de diálisis, éstas se sometieron a ebullición durante 10 minutos en tampón Tris-ClH 10 mM, pH 7'6, con EDTA 1 mM y bicarbonato sódico al 2%, y a continuación, después de lavadas abundantemente con agua destilada, se volvieron a hervir durante 10 minutos en agua destilada.

Los tubos de diálisis, cerrados por un extremo, se montaron en un matraz Kitasato de 2 litros de capacidad, tal como se muestra en la figura 1. El volumen inicial de medio en el saco de diálisis fue de 50 ml y de 1.800 en el matraz. El tubo lateral de silicona se conectó con una bomba peristáltica y sirvió para la recogida de muestras. El medio de diálisis fue sometido a agitación continua mediante un agitador magnético. La inoculación del medio contenido en el saco de diálisis se llevó a cabo con 0'5 ml de un cultivo de 48 horas de las cepas de *M. coralloides* empleadas. Al objeto de evitar la formación de espuma, se adicionó una pequeña cantidad de silicona antiespumante al medio contenido en el saco de diálisis.

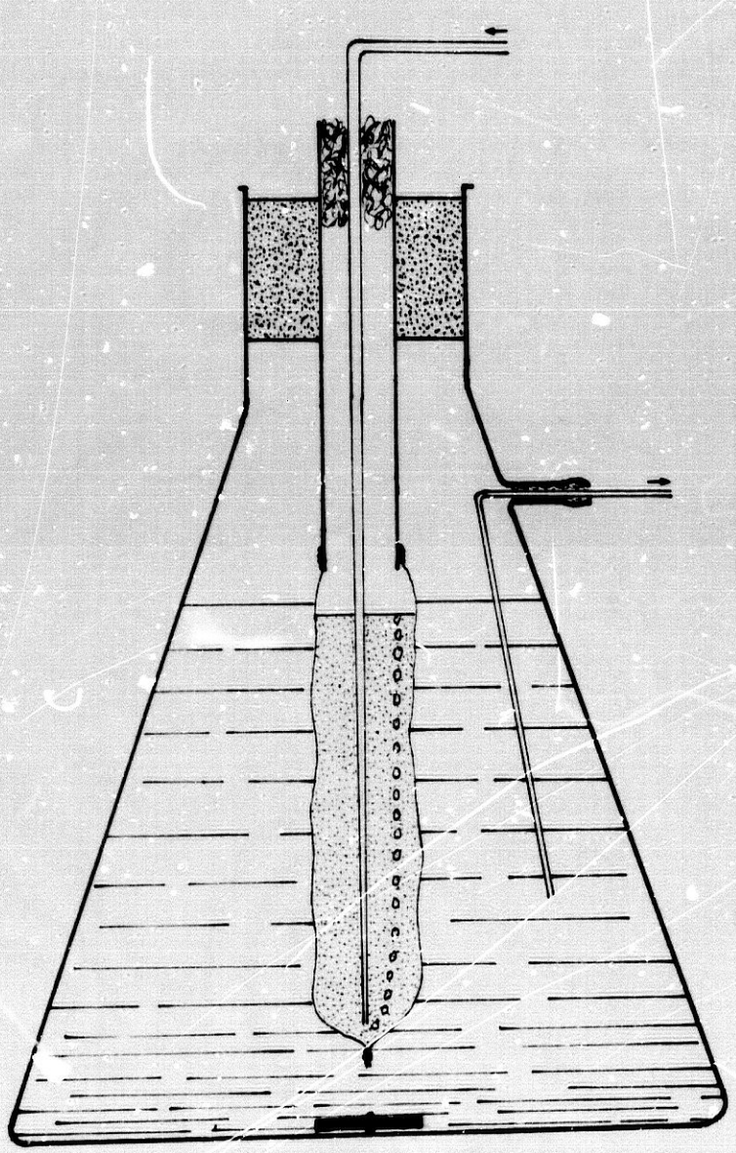

**Figura** 1. Dispositivo empleado para la producción de antibiótico en medios sometidos a diálisis.

## 6. VALORACION DE LA ACTIVIDAD ANTIBIOTICA.

### 6.1. Método de los discos.

Se llevó a cabo impregnando discos de papel de filtro con la solución de antibiotico y determinando el halo de inhibición del crecimiento que producen en placas inoculadas con *S. aureus* ATCC-8.

Se emplearon "Bacto-Concentration Disks" (Difco) de 1/4 de pulgada de diámetro. Estos discos, que absorben aproximadamente 0'02 ml de agua, se impregnaron de las soluciones problemas por inmersión en las mismas durante unos diez segundos; una vez eliminado el exceso de solución, los discos se desecaron a 37º antes de su uso.

Por lo que respecta a la preparación de las placas, se utilizó el método de la doble capa. A tal fin se dispuso en una caja de Petri de 9 cm de diámetro una capa base de 6 ml de "antibiotic medium 2"; una vez solidificada la citada capa base, se añadieron sobre ella 3 ml de "antibiotic medium 1", mantenido en sobrefusión a 45º e inoculado con 0'2 ml de un cultivo de 24 horas de *S. aureus* sobre medio BHI. Es conveniente llevar a cabo la preparación de estas placas sobre una superficie horizontal, al objeto de que las capas de agar sean de un espesor uniforme; igualmente es conveniente, antes de verter la segunda capa de agar, calentar la capa base a unos 40º, al objeto de evitar la solidificación prematura de la capa de agar inoculado.

Una vez solidificada la segunda capa de agar, se depositan los discos sobre la superficie, presionando ligeramente, y se deja la placa una hora a la temperatura ambiente al objeto de que el antibiótico difunda. Transcurrido este tiempo, las placas se incuban a 37º durante 18 horas, al cabo de las cuales se mide el diámetro

del halo de inhibición del crecimiento del *S. aureus* que destaca muy bien sobre el barniz continuo bacteriano.

La actividad antibiótica de las soluciones ensayadas se expresó en unidades por ml (u/ml), entendiendo por una unidad la actividad correspondiente a un sobrenadante de un cultivo o a un extracto purificado del antibiótico que cuando ensayado por la técnica descrita origina un halo de inhibición de 9 mm de diámetro.

Al objeto de facilitar la valoración de las distintas preparaciones de antibiótico ensayadas en el transcurso de los trabajos que se incluyen en esta Memoria, se confeccionó una gráfica patrón en la que se relacionaron concentraciones de antibiótico en u/ml y diámetro de los halos de inhibición. Dicha gráfica se expone en la figura 2 y en relación con ella debe hacerse notar que, aunque la correlación entre los logaritmos de las concentraciones y el diámetro de los halos es buena, la fiabilidad de los resultados es mayor cuando se emplean preparaciones con concentraciones de antibiótico inferiores a 5 u/ml.

### 6.2. Bioautografía.

Empleada para la detección del antibiótico en las preparaciones sometidas a cromatografía, se llevó a cabo depositando sobre la superficie de placas, preparadas como se ha descrito en el apartado anterior, tiras de papel de aproximadamente 0'5 - 0'6 cm de anchura cortadas en el sentido de la marcha del cromatograma. Las tiras deben ser previamente desecadas al objeto de eliminar la fase móvil orgánica.

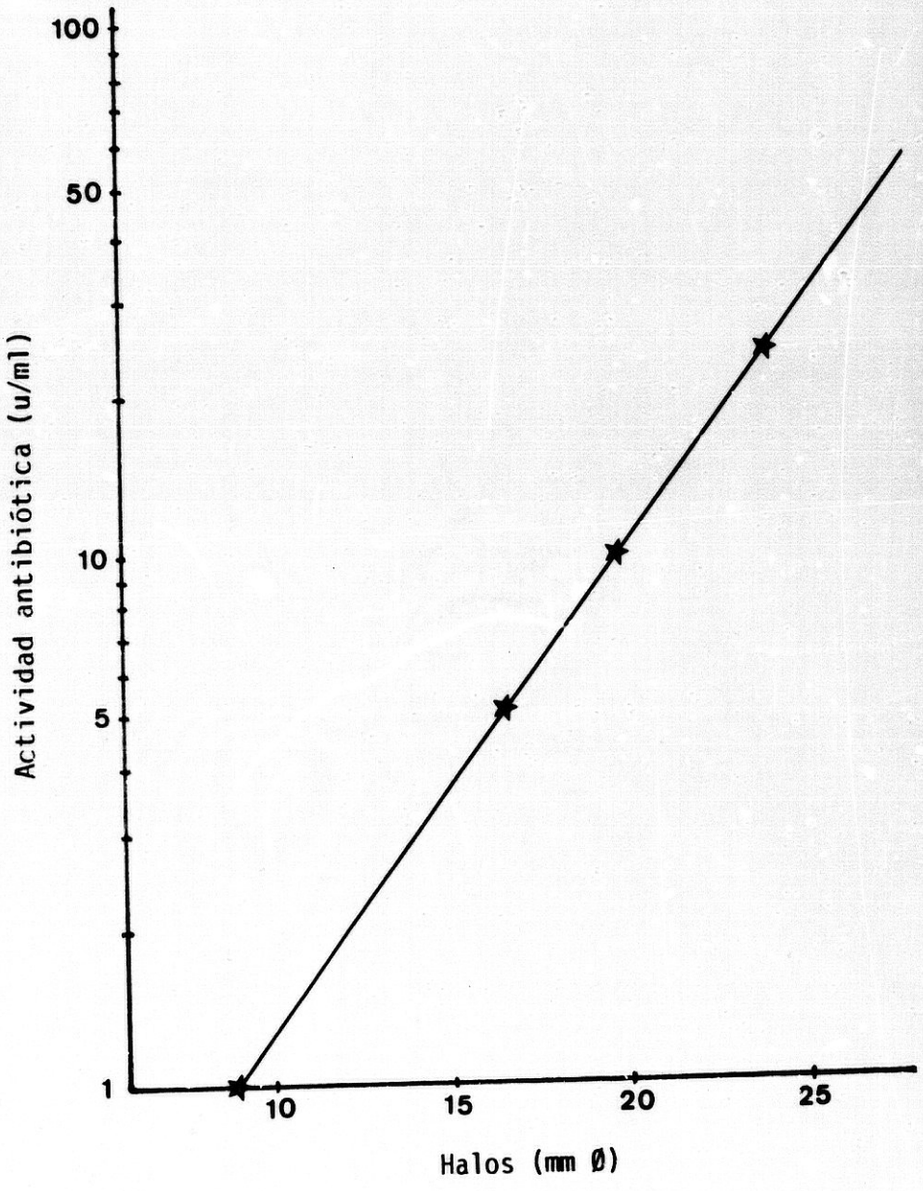


**Figura 2.** Correlación existente entre el diámetro de los halos de inhibición y el logaritmo de las concentraciones de antibiótico.

## 7. MUTAGENESIS DE *M. CORALLOIDES* D.

Se llevó a cabo mediante tratamientos de células en crecimiento de *M. coralloides* D con N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina (nitrosoguanidina) Se intentó también la mutagenesis con ácido nitroso, pero hubo que desechar este procedimiento porque el pH ácido a que es necesario someter las bacterias para llevarlo a cabo mataba al *M. coralloides*.

La nitrosoguanidina se disolvió en agua destilada a concentración de 1 mg/ml y, distribuida en porciones de 1 ml, se conservó congelada a -20º y en la oscuridad.

A la hora de llevar a cabo la mutagénesis, se partió de un cultivo de *M. coralloides* D sobre medio CT con una densidad óptica de aproximadamente 0'1. Este cultivo fue centrifugado y las células resuspendidas en 0'5 volúmenes de tampón fosfatos 0'05 M, pH 7, añadiéndose a continuación a la suspensión cantidad suficiente de la solución madre de nitrosoguanidina, descongelada recientemente, para lograr una concentración final de 50 µg/ml. La suspensión se incubó a 30º durante 30 minutos, al cabo de los cuales se centrifugó, resuspendiéndose las células en un volumen igual de solución salina.

En las condiciones descritas, la supervivencia del *M. coralloides* osciló entre un 0'5 y un 1 por ciento de las células tratadas.

## 8. DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD BIOLOGICA DEL ANTIBIOTICO.

### 8.1. Efecto sobre el crecimiento de *S. aureus*.

Para comprobarlo, un cultivo de 18 horas de dicha bacteria sobre medio BHI se diluyó 1/10 con medio fresco precalentado y se distribuyó en tubos de Spectronic, a razón de 5 ml por tubo. Los tubos se incubaron en baño de agua a 37º y el crecimiento, con o sin antibiótico, fue determinado observando a intervalos regulares de tiempo la evolución de la densidad óptica a 650 nm.

### 8.2. Efecto sobre la viabilidad del *S. aureus*.

Se llevó a cabo tomando un cultivo de 18 horas de dicha bacteria sobre medio BHI, diluyéndolo 1/10 en medio fresco precalentado y distribuyéndolo en matraces Erlemmeyer estériles de 100 ml, a razón de 25 ml por matraz. Los matraces se incubaron a 37º y el número de células viables, en presencia y ausencia del antibiótico, fue determinado tomando muestras a intervalos regulares de tiempo, diluyéndolas convenientemente y diseminándolas sobre agar común. Al objeto de poder someter los resultados a tratamiento estadístico, se sembraron 5 cajas de Petri por cada dilución.

### 8.3. Incorporación de precursores radioactivos a células de *S. aureus* en crecimiento.

Se utilizó para determinar el efecto del antibiótico sobre la síntesis de macromoléculas por *S. aureus*.

Se emplearon los siguientes precursores suministrados por Amersham Intl. (Inglaterra): (5,6-$^{3}$H) uridina, para seguir la síntesis de ARNs; L-(4,5-$^{3}$H) leucina para la de proteínas; (6-$^{3}$H)

timidina para la de ADN; y ($^{14}C$) N-acetilglucosamina para la de componentes globales de la pared celular y peptidoglucano.

Para la realización de las determinaciones, el *S. aureus* fue cultivado en medio BHI hasta alcanzar una densidad óptica a 650 nm de aproximadamente 0'1. En ese momento se adicionó el precursor marcado a una concentración final de 2'5 µCi/ml para la uridina, 3'3 µCi/ml para la leucina, 1'6 µCi/ml para la timidina y 2 µCi/ml para la N-acetil-glucosamina. A los 15 minutos de incubación en presencia del precursor se retiraron alícuotas de 100 µl que se diluyeron en 4 ml de ácido tricloroacético (TCA) al 5% enfriado a 0º. A los 30 minutos los cultivos fueron divididos en dos porciones iguales a una de las cuales se añadió antibiótico hasta lograr una concentración final de 5 u/ml y a la otra un volumen igual de solución salina. A los 1, 6, 17, 35, 60 y 90 minutos en el caso de uridina, leucina y timidina, y a los 0, 5, 15, 35, 60 y 90 minutos en el caso de la N-acetilglucosamina, se tomaron alícuotas de 100 µl de los dos cultivos que se diluyeron con TCA en frío. Tras dos horas de precipitación en hielo, las muestras se recogieron sobre filtros Whatman GF/C (Whatman Ltd.) y se lavaron cinco veces con 5 ml de TCA 5% enfriado a 0º. A continuación los filtros fueron desecados y colocados en viales de cristal a los que se añadió 10 ml de líquido de centelleo, midiéndose la radioactividad en un contador de centelleo líquido Beckman LS 70500. El líquido de centelleo contenía por litro de tolueno 4 g de 2-difeniloxazol (Merck) y 250 mg de 2,2'-fenilen-bis(5-feniloxazol) (Merck); antes de su uso, esta solución se sometió a agitación magnética durante 18 horas a 4º en la oscuridad.

Por la técnica antes descrita se determina la radioactividad debida a la incorporación de la N-acetilglucosamina tanto al peptidoglucano como a los ácidos teicoicos de la pared. Al objeto de determinar solamente la incorporada al peptidoglucano, las muestras

se hirvieron durante 15 minutos en TCA 5% para solubilizar los ácidos teicoicos. Las muestras se dejaron enfriar, se recogieron en filtros Whatman y se lavaron con TCA 5%, tras lo cual se siguió el proceso habitual de secado y determinación de la radioactividad retenida en los filtros.

**8.4. Efecto del antibiótico sobre el crecimiento de *M. curalloides* y *M. xanthus*.**

Se comprobó siguiendo la evolución de la densidad óptica a 650 nm de cultivos de las dos bacterias, llevados a cabo en nefelómetros.

**8.5. Efecto del antibiótico sobre la viabilidad de células de *M. xanthus* en reposo y crecimiento.**

Se llevó a cabo mediante recuento de las células viables de los cultivos o suspensiones, convenientemente diluidas, por diseminación en mdio CTA.

**9. Experiencias *in vivo*.**

**9.1. Efecto del antibiótico sobre ratones infectados con *Listeria monocytogenes*.**

Se emplearon ratones de las razas BALB/c y suiza procedentes del Criadero de Animales de Experimentación de la Universidad de Granada.

La infección experimental de los ratones se llevó a cabo por inoculación intravenosa de una suspensión de células de un cultivo reciente de *L. monocytogenes* sobre agar sangr. La vía de inoculación fue el seno venoso retroorbital.

El antibiótico se administró a los animales infectados por vía intraperitoneal.

# RESULTADOS

## 1. PRODUCCION

Arias (1.977) obtuvo la producción óptima de antibióticos de *M. coralloides* D con un medio de cultivo a base de casitone 0'5%, sulfato magnésico 0'1% y glucosa 1% en tampón de fosfato potásico 10 mM, pH 6'5; con este medio y en cultivos con agitación continua obtuvo rendimientos entre 5 y 5'5 unidades por ml.

A la hora de emprender la producción masiva de antibiótico se han reexaminado las condiciones óptimas para su producción en relacion con la naturaleza del sustrato empleado como fuente de carbono y nitrógeno, la concentración del mismo, la concentración de

ión ortofosfato, la modalidad de cultivo y el empleo de mutantes superproductores.

**1.1. Influencia de la fuente de carbono y nitrógeno.**

A más del casitone (Difco), se han utilizado como fuente de nutrientes orgánicos caseina, tripticasa (BBL), polipeptona (BBL), peptona de carne para bacteriología (ADSA-Micro), peptona de soja (Merck), Probion F y Probion L (Hoechst). Probion F es la proteína unicelular cruda obtenida de *Methylomonas clarae*; Probion L es la misma proteína sometida a una hidrolisis enzimática después de extraidos los lípidos y ácidos nucleicos (Schlingmann *et al.*, 1.982).

Todos los sustratos citados se emplearon al 0'5%, en medios conteniendo además sulfato magnésico 0'1% y glucosa 1%; como disolvente se empleó tampón de fosfato potásico 10 mM, pH 6'5. Los cultivos se llevaron a cabo en matraces Erlemmeyer de 1000 ml, conteniendo 500 ml de medio, inoculados con el 1% de un cultivo de *M. coralloides* D de 48 horas en medio CT e incubados con agitación continua (200 rpm), a 28º, durante cuatro días, tiempo al cabo del cual los cultivos se encuentran ya en fase de lisis.

Los resultados obtenidos se expresan en la tabla 1, e indican que en las condiciones citadas los mejores rendimientos de actividad antibiótica se obtienen cuando se utiliza tripticasa como sustrato nutritivo.

**1.1.2. Influencia de la concentración de tripticasa sobre la producción de antibiotico.**

Comprobada la conveniencia de utilizar tripticasa como nutriente,

**Tabla** 1. Producción de antibióticos por *M. coralloides* D en medios con diversas fuentes de nutrientes.

| Nutrientes | Actividad (u/ml) |
|---|---|
| Casitone | 5'5 |
| Caseina | 4'5 |
| Tripticasa. | 7'5 |
| Peptona | 3'0 |
| Polipeptona. | 4'5 |
| Peptona de soja. | 3'5 |
| Probion F | 3'5 |
| Probion L | 4'0 |

**Tabla** 2. Producción de antibióticos por *M. coralloides* D en medios con diversas concentraciones de tripticasa.

| Concentración (g%) | Actividad (u/ml) |
|---|---|
| 0'1 | 2'5 |
| 0'5 | 7'5 |
| 1'0 | 7'5 |
| 1'5 | 7'5 |
| 2'0 | 6'5 |

se determinó a continuación el efecto de diversas concentraciones de la misma sobre la producción de antibióticos en experimentos totalmente similares a los reseñados en el apartado anterior. Los resultados se exponen en la tabla 2 e indican que a partir del 0'5% los resultados son prácticamente los mismos.

## 1.2. Efecto de la concentración de ión ortofosfato sobre la producción y actividad del antibiótico.

### 1.2.1. Determinación de la concentración óptima para la producción.

Ha sido comprobado previamente (Fernández-Vivas *et al.*, 1983a) que concentraciones elevadas de ortofosfato inhiben totalmente el proceso de autolisis en *M. coralloides* D en medios líquidos. Es por ello que se pensó que el retraso en la iniciación de la autolisis en presencia de concentraciones elevadas de ortofosfato podría favore-

**Tabla 3.** Actividad antibiótica* en sobrenadantes de cultivos de *M. coralloides* D en función de la concentración de fosfato.

| Incubación | Concentración de ortofosfato (mM/l) | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| (días) | 1 | 5 | 10 | 20 | 30 | 40 | 50 |
| 1 | 0 | 0 | 1'5 | 2'0 | 0 | 0 | 0 |
| 2 | 1 | 1 | 4'0 | 5'0 | 0 | 0 | 0 |
| 3 | 1 | 1 | 7'0 | 7'5 | 2 | 0 | 0 |
| 4 | 1 | 1 | 7'5 | 7'5 | 2 | 0 | 0 |
| 5 | 1 | 1 | 7'5 | 7'5 | 2 | 0 | 0 |
| 6 | 0 | 1 | 7'0 | 7'0 | 1 | 0 | 0 |
| 7 | 0 | 0 | 7'0 | 6'5 | 1 | 0 | 0 |

*: unidades/ml

cer la producción de antibiótico al prolongar la duración de la fase estacionaria.

Se estudió el efecto del ión ortofosfato a concentraciones de 1 a 50 mM en una serie de experimentos planteados como en apartados anteriores, aunque en este caso se determinó la actividad antibiótica de los cultivos a lo largo de una semana, a intervalos de 24 horas. Los resultados obtenidos se expresan en la tabla 3 y demuestran que concentraciones de ortofosfato superiores a 20 mM inhiben parcial o totalmente la producción de antibióticos.

**1.2.2. Efecto de la concentración de ortofosfato sobre la actividad de los antibióticos producidos por *M. coralloides* D.**

La experiencia anterior parece indicar que el ión ortofosfato, por encima de determinada concentración, reprime la producción de antibióticos por *M. coralloides* D. No obstante, pudiera suceder que el efecto del citado ión consista no en una represión de la síntesis de los antibióticos sino en una inhibición de su actividad.

Para descartar esta posibilidad se efectuó un experimento en el que sobrenadantes de cultivos, con una actividad de 6 u/ml, se mezclaron con volúmenes iguales de tampón de fosfato, pH 7, de concentraciones adecuadas para obtener las finales de 1, 5, 10, 20, 30, 40 y 50 mM. Las mezclas se incubaron a 30º durante seis horas y al cabo de este tiempo se determinó la actividad antibiótica de las mismas frente a *S. aureus*.

En todos los casos el diámetro de los halos fue de 14 mm, equivalente a 3 u/ml, lo que indicó que en ningún caso el fosfato había inactivado los antibióticos.

## 1.3. Empleo de mutantes superproductores.

Mediante el empleo del *M. coralloides* D de colección (cepa McA 1) y en las condiciones óptimas determinadas, la actividad antibiótica máxima obtenida fue de unas 7'5 u/ml. Al objeto de aumentar los rendimientos se pensó en seleccionar, para usar en la producción de antibióticos, mutantes de *M. coralloides* D superproductores del mismo.

A tal efecto el *M. coralloides* D, McA 1, se sometió a mutagénesis con NG, en las condiciones especificadas en el apartado 7 de Material y Métodos. Las células mutagenizadas se diluyeron convenientemente en solución salina y alícuotas de 0'1 ml se diseminaron en cajas de Petri con medio CTA. Las cajas se incubaron a 28º y, cuando las colonias adquirieron un diámetro de aproximadamente 0'5 mm, se añadió una capa de "antibiotic medium 1" inoculado con *S. aureus*, incubándose a continuación las cajas a 37º.

En estas condiciones las colonias de la estirpe McA 1 producen halos de inhibición de 5-10 mm de diámetro, por lo que se seleccionaron todas aquellas colonias que originaron halos de inhibición de 15 mm o más de diámetro. Esta técnica de selección demostró ser efectiva solamente si el número de colonias por caja es reducido, entre 10 y 15 por caja de 15 cm de diámetro, ya que de lo contrario los halos de inhibición son confluentes y es prácticamente imposible determinar su diámetro.

Las colonias preseleccionadas se cultivaron y con cada una de ellas se inoculó centralmente una caja de Petri con medio CTA. Las cajas se incubaron a 28º durante 5 días, al cabo de los cuales las colonias alcanzaron un tamaño alrededor de los 3 mm de diámetro, añadiéndoseles en este momento la capa de agar blando inoculada con *S. aureus*. Después de 24 horas de incubación a 37º, se midió el

diámetro de los halos de inhibición, seleccionándose como superproductoras aquellas cepas cuyas colonias dieron halos de inhibición con un diámetro superior a 45 mm, dado que en las mismas condiciones la estirpe madre dió lugar a halos de 30-40 mm de diámetro.

Por este procedimiento se seleccionaron cuatro cepas, designadas como McLm 81, McLm 83, McLm 711 y McLm 817, que por la técnica antes descrita produjeron halos de inhibición de 60, 60, 50 y 55 mm, respectivamente.

Estas cuatro cepas, junto con la McA 1, se ensayaron para la produción de antibióticos en cultivos en medio líquido, mediante la técnica ya descrita. Los resultados se expresan en la tabla 4, donde sorprendentemente puede verse que las actividades conseguidas con

**Tabla 4.** Actividad antibiótica[1] de sobrenadantes de cultivos de diversas cepas de *M. coralloides* D en función del tiempo.

| Cepa | Tiempo de incubación (días) | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
| McA 1 | 1'0 | 3'5 | 6'0 | 7'5* | 7'5* |
| McLm 81 | 2'0 | 5'5 | 7'0* | 7'0* | 7'0* |
| McLm 83 | 2'0 | 6'5* | 7'0* | 7'0* | 7'0* |
| McLm 711 | 1'0 | 4'0 | 7'5* | 7'0* | 7'0* |
| McLm 817 | 1'0 | 5'0 | 7'0* | 7'0* | 7'0* |

1: unidades/ml.

*: cultivo lisado.

los supuestos mutantes superproductores son iguales e incluso ligeramente menores que los conseguidos con la cepa madre.

Otro hecho notable observado fue que los cultivos de estas cepas se lisaron 24 e incluso 48 horas antes que los de la cepa madre.

## 1.4. Influencia de la modalidad de cultivo sobre la producción de antibiótico.

### 1.4.1. Producción de antibiótico en cultivos en diálisis.

Los resultados obtenidos con los mutantes superproductores llevaron a pensar que los antibióticos producidos podrían actuar desencadenando la autolisis cuando alcanzan una concentración crítica en el medio, con lo que, independientemente de la capacidad de producción de los mismos por parte de los mutantes seleccionados, nunca se podría sobrepasar dicha concentración crítica de antibióticos en sistemas cerrados. Esta hipótesis, confirmada por los experiementos descritos en el apartado 5.1.1 de este capítulo, llevó a plantear la producción de antibióticos en un sistema sometido a diálisis continua y en el que, por tanto, son drenados continuamente del cultivo y diluidos en los líquidos de diálisis.

Se utilizó para ello el dispositivo descrito en el apartado 5.3 de Material y Métodos, probándose las cepas McA 1 y McLm 83. Desgraciadamente estos experimentos se vieron casi totalmente frustrados por un hecho no previsto: al cabo de unos 5 días de incubación los sacos de diálisis se deterioran y la mixobacteria es capaz de atravesarlos y crecer, por tanto, en los líquidos de diálisis.

No obstante se pudieron comprobar los siguientes hechos:

En el interior del saco de diálisis la densidad celular al término de los 5 días de incubación fue del orden de $4.10^{10}$ bacterias por ml, cuando la densidad máxima alcanzada en cultivos normales es de $4\text{-}5.10^{8}$.

Los líquidos de diálisis, inmediatamente antes de ser invadidos por la mixobacteria, mostraron una actividad antibiótica de 1 u/ml. Dado que el volumen total de los líquidos de diálisis fue de 1.800 ml y el del cultivo en el saco de diálisis de 50 ml, resulta que el cultivo en diálisis produjo 36 u/ml, es decir, cinco veces más que la actividad producida en cultivos normales.

No se encontraron diferencias entre las cepas McA 1 y McLm 83.

**1.4.2. Producción de antibióticos en cultivo sumergido.**

Salvo en el caso anterior, todas las experiencias de producción de antibióticos descritas han sido llevadas a cabo en matraces de 1000 ml, con 500 ml de medio, sometidos a agitación continua en un agitador orbital. A la hora de producir los antibióticos en gran escala este método presentaba grandes limitaciones, por lo que se pasó a producir los antibióticos en cultivos sumergidos con aireación y agitación. Se utilizaron los fermentadores descritos en el apartado 5.2 de Material y Métodos. La fermentación se llevó a cabo sobre medio TTG añadido de silicona antiespumante (0'25 ml por litro de medio), con una aireación de 2'4 litros por minuto y litro de medio; el inóculo fue en todos los casos del 2'5% de un cultivo en agitación de 48 horas.

En estas condiciones el *M. coralloides* D, McA 1, crece bien, alcanzando una densidad máxima de $3\text{-}4.10^{8}$ células/ml alrededor de las 72-80 horas y una franca lisis a las 96. No obstante, el rendimiento obtenido por este procedimiento fue siempre menor que

en los cultivos en agitación, ya que la actividad obtenida fue de 5 u/ml y en ocasiones menor.

En el transcurso de las experiencias descritas en esta Memoria han sido procesados por este procedimiento un total de 540 litros de medio.

## 2. EXTRACCION Y PURIFICACION.

En 1.979, Arias y colaboradores establecieron dos métodos para la extracción a gran escala del antibiótico producido por *M. coralloides* D, McA 1.

El primero de dichos métodos consistió en la concentración de los sobrenadantes de los cultivos exentos de células hasta 1/10 de su volumen primitivo, seguida de una extracción con cloroformo. El extracto clorofórmico se desecó con sulfato sódico anhidro y el antibiótico fue adsorbido sobre ácido silícico, de donde se eluyó finalmente con etanol al 5% en cloroformo. Por este procedimiento se recuperó el 25% de la actividad inicial de los sobrenadantes.

El segundo método consistió en la adsorción del antibiótico presente en sobrenadantes exentos de células sobre carbón activo, seguida del lavado y desecación de este último y posterior elución del antibiótico mediante dos extracciones con cloroformo. Por este procedimiento es posible recuperar el 30% de la actividad inicial.

Al igual que en el caso de la producción, a la hora de obtener antibiótico en cantidad suficiente para llevar a cabo el plan de trabajo contemplado en esta Memoria, se creyó conveniente reexaminar estos procesos de extracción, al objeto de simplificar la misma y de incrementar sus rendimientos.

A tal fin, y partiendo de preparaciones crudas de antibiótico obtenidas por extracción de sobrenadantes concentrados con cloroformo, se relizaron una serie de experiencias previas tendentes a estudiar la solubilidad del antibiótico en diversos disolventes orgánicos, así como la adsorción y elución del mismo sobre diversos materiales.

## 2.1. Experiencias previas.

### 2.1.1. Extracción del antibiótico con disolventes orgánicos.

Se partió de dos soluciones acuosas del antibiótico, con una actividad de 10 u/ml, que se llevaron a pH 7'5 y 4, respectivamente, extrayéndose cada una de ellas tres veces con un décimo de su volumen del disolvente empleado en cada caso. Las fracciones orgánicas, separadas por decantación, se reunieron y evaporaron bajo vacío en un Rotovator. Los residuos fueron disueltos en un volumen igual al de las soluciones primitivas de tampón de fosfatos 10 mM, pH 7'5, ensayándose la actividad frente a *S. aureus*.

Los disolventes orgánicos empleados fueron cloruro de metileno, cloroformo, tetracloruro de carbono, eter etílico, eter de petroleo y heptano. Los resultados obtenidos en estos experimentos se exponen en la tabla 5.

### 2.1.2. Solubilidad del antibiótico en agua tamponada a diferentes pHs.

El residuo seco proveniente de la evaporación de una solución clorofórmica, con actividad de 10 u/ml, se extrajo con un volumen igual de agua tamponada con acético-acetato 10 mM o fosfato 10 mM, a pHs comprendidos entre 4 y 8, durante una hora, a 40º y con agitación continua. Los resultados obtenidos se exponen en la tabla 6 y muestran que el antibiótico sólo es soluble en agua a pHs próximos a la neutralidad o alcalinos.

### 2.1.3. Adsorción del antibiótico sobre diversos materiales.

Se emplearon carbón activo (Merck), florisil (Serva), una sepiolita natural, bentonita sódica y celita (Merck). Florisil es

**Tabla 5.** Extracción del antibiótico con diversos disolventes a partir de soluciones acuosas a pHs ácido y alcalino.

| Disolvente | Actividad recuperada (%) | |
|---|---|---|
| | Extracción a pH 4 | Extracción a pH 7'5 |
| $Cl_2CH_2$ | 100 | 100 |
| $Cl_3CH$ | 100 | 100 |
| $Cl_4C$ | 100 | 100 |
| Eter etílico | 90 | 5 |
| Eter de petroleo. | 100 | 0 |
| Heptano.. | 100 | 0 |

**Tabla 6.** Extracción del antibiótico (residuo seco) con agua tamponada a diferentes pHs.

| pH | Actividad recuperada (%) |
|---|---|
| 4'0 | < 5 |
| 4'5 | < 5 |
| 5'0 | < 5 |
| 5'5 | < 5 |
| 6'0 | < 5 |
| 6'5 | 100 |
| 7'0 | 100 |
| 7'5 | 100 |
| 8'0 | 100 |

el nombre comercial de un trisilicato de magnesio para cromatografía y celita el de tierra de infusorios purificada.

En cada caso el material adsorbente fue añadido a sobrenadantes de cultivos exentos de células de actividad conocida, en proporción del 2% (p/v). Las mezclas fueron mantenidas en agitación durante una hora a la temperatura ambiente y al cabo de este tiempo el adsorbato fue separado por filtración, determinándose la actividad residual de los sobrenadantes. Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 7 y demuestran que, de los materiales ensayados, solamente el carbón activo y el florisil adsorben el principio o principios activos. No obstante, los sobrenadantes adsorbidos con sepiolita o bentonita son mucho menos coloreados que los originales, lo que indica que estos materiales adsorben pigmentos y posiblemente otras impurezas que acompañan al antibiótico.

**Tabla** 7. Actividad residual de sobrenadantes de cultivos de *M. coralloides* despues de tratados con diversos adsorbentes.

| Adsorbente | Actividad residual* |
|---|---|
| Carbón activo | 0 |
| Florisil | 15 |
| Sepiolita | > 95 |
| Bentonita | > 95 |
| Celita | > 95 |

*: % de la primitiva.

### 2.1.4. Elución de los antibióticos de los adsorbatos.

#### 2.1.4.1. Elución del carbón activo.

Se estudió mediante el tratamiento del adsorbato, lavado con agua destilada, con los siguientes eluyentes: metanol; metanol-agua (1:1) a pHs 8 y 4; etanol; etanol-agua (1:1) a pHs 8 y 4; butanol; butanol-agua (1:1) a pHs 8 y 4; acetona; acetona-agua (1:1) a pHs 8 y 4; y soluciones acuosas al 10% de cloruro sódico a pHs de 8 y 4. En todos los casos el adsorbato se suspendió en 10 volúmenes (p/v) del eluyente y la mezcla se sometió a agitación continua durante una hora a la temperatura ambiente, separándose después el sobrenadante por filtración.

Los resultados de todos estos experimentos fueron negativos ya que, en ningún caso, se detectó actividad alguna en los filtrados.

Cuando el adsorbato se desecó y extrajo a continuación con cloroformo, en idénticas condiciones, se pudo recuperar un 25-30 % de actividad, tal como habían encontrado previamente Arias y colaboradores (1.979). Las eluciones con cloruro de metileno y tetracloruro de carbono dieron resultados similares.

#### 2.1.4.2. Elución del florisil.

Se llevó a cabo con los mismos eluyentes descritos en el apartado anterior y en las mismas condiciones. A diferencia de lo que ocurre en el caso del carbón activo, en este caso se recuperaron porcentajes elevados de la actividad antibiótica presente en los caldos adsorbidos, tal como puede ser observado en la tabla 8, donde se expresa la actividad recuperada en cada caso en % sobre la adsorbida.

**Tabla 8** Recuperación de la actividad antibiótica adsorbida en florisil por tratamiento del mismo con diversos eluyentes.

| Eluyente | Actividad recuperada* |
|---|---|
| Metanol | 35 |
| Metanol-agua pH 4 | 0 |
| Metanol-agua pH 8 | 49 |
| Etanol | 35 |
| Etanol-agua pH 4 | 0 |
| Etanol-agua pH 8 | 51 |
| Butanol | 27 |
| Butanol-agua pH 4 | 5 |
| Butanol-agua pH 8 | 43 |
| Acetona | 41 |
| Acetona-agua pH 4 | 0 |
| Acetona-agua pH 8 | 57 |
| NaCl 10%, pH 4 | 0 |
| NaCl 10%, pH 8 | 15 |

*: por ciento sobre la actividad adsorbida.

Cuando el adsorbato se desecó y extrajo con cloroformo, se recuperó, segun las distintas experiencias, entre el 55 y 60 % de la actividad adsorbida.

**2.2. Esquema de extracción y purificación desarrollado.**

De acuerdo con las experiencias previas antes descritas y tras la realización de diversos tanteos, se desarrolló el siguiente método de extracción y purificación:

1.- Eliminación de células y restos celulares por centrifugación o filtración por papel en casos de cultivos lisados.

2.-Tratamiento de los sobrenadantes con un 2 % de bentonita sódica durante una hora en agitación continua.

3.- Eliminación de la bentonita por filtración y tratamiento de los filtrados con un 2 % de florisil, durante una hora en agitación continua.

4.-Separación del florisil mediante filtración y lavado del mismo con agua destilada. Se desechan los filtrados y las aguas de lavado.

5.- Elucion de los antibióticos del florisil mediante tres extracciones sucesivas del mismo con tres volúmenes de una mezcla de acetona y agua a partes iguales.

6.- Reunión de los extractos cetónicos, acidificación de los mismos a pH 5 y extracción con eter de petroleo: tres extracciones sucesivas con 1/10 del volumen del extracto cetónico. La fase orgánica se separa por centrifugación y decantación, desechándose la fase acuosa.

7.- Extracción de los extractos etereos con tampón de fosfato 10 mM, pH 7'5: 1/5 de su volumen repartido en tres extracciones sucesivas. La fase acuosa se separa por decantación, desechándose la fase orgánica.

8.- Extracción de la solución acuosa con cloroformo: 1'5 volúmenes de cloroformo repartidos en tres extracciones sucesivas.

9.- Separación de los extractos clorofórmicos por decantación, desecación de los mismos con sulfato sódico anhidro y evaporación del cloroformo bajo presión reducida a 40º.

El residuo resultante de la evaporación del cloroformo es de consistencia oleaginosa y color amarillo verdoso, facilmente soluble en agua y con una actividad de 1 unidad por cada 2'72 µg.

**2.3. Rendimiento del procedimiento de extracción adoptado.**

Tal como ha sido menciondo el florisil sólo adsorbe el 85% de la actividad antibiótica de los sobrenadantes. La extracción del florisil con acetona-agua, tal como ha sido también expuesto, sólo permite recuperar el 57% de la actividad adsorbida.

Por lo que respecta a la extracción de los extractos cetónicos con eter de petroleo y posterior extracción de éste con tampón a pH alcalino, sólo se recuperó el 70% de la actividad contenida en los primeros. Finalmente, la extracción con cloroformo del antibiótico en solución acuosa permite recuperar el 100% de la actividad contenida en ésta.

Teniendo en cuenta estos porcentajes de recuperación en las distintas etapas del proceso, el rendimiento global del mismo debería ser del 33'8% de la actividad inicial. En la práctica, sin embargo, los rendimientos obtenidos oscilaron entre un 30 y 31%.

**2.4. Determinación de la homogeneidad y pureza del antibiótico.**

La homogeneidad y pureza del antibiótico obtenido por el procedimiento descrito se comprobó por cromatografía descendente sobre papel, utilizando diversas fases móviles, y cromatografía en columna de sephadex LH 20. Los cromatogramas fueron revelados por

bioautografía y examen a la luz ultravioleta. En cuanto al eluato de la cromatografía en columna, se determinó la absorción a 280 nm de las distintas fracciones, así como la actividad antibiótica de las mismas.

En la cromatografía sobre papel se emplearon las siguientes fases móviles, con los resultados que se indican:

Eter de petroleo-cloroformo (1:1), una sola mancha con actividad de antibiótico que emigra con el frente.

Eter de petroleo-cloroformo (12:1), una sola mancha con un Rf de 0'13.

Propanol-acetato de etilo-agua (6:2:1), una sola mancha que emigra con el frente.

Butanol-acético-agua (12:3:5), una sola mancha con Rf de 0'9.

Butanol-piridina-agua (12:3:5), una sola mancha que emigra con el frente.

Como puede verse en ningún caso se detectó más de una mancha con actividad de antibiótico. De otra parte, el examen con luz ultravioleta tampoco mostró otras manchas distintas de la activa.

Por lo que respecta a la cromatografía sobre sephadex LH 20, efectuada en columnas de 1'5 $cm^2$ de sección por 25 cm de altura, fue desarrollada con metanol, recogiéndose el eluato en fracciones de 2 ml. Sólo se detectó un pico de actividad de antibiótico, coincidente con el máximo de absorción de la luz ultravioleta.

Estos resultados, si bien no concluyentes, parecen indicar que la preparación de antibiótico obtenida es razonablemente homogenea y pura, y probablemente está constituida por una sola especie de molécula o una mezcla de moléculas de estructura química muy similar.

## 3.- ESPECTRO ANTIMICROBIANO.

Se determinó observando la sensibilidad de los diferentes microorganismos de prueba frente a diversas concentraciones del antibiótico purificado. A tal fin se emplearon discos de papel de filtro impregnados con soluciones del antibiotico conteniendo 1, 5, 10 y 25 u/ml, lo que equivale a un contenido en antibiótico por disco de 0'054, 0'27, 0'54 y 1'36 µg, respectivamente, y el ensayo se realizó en placa por el método descrito. En el caso de hongos filamentosos y levaduras se empleó el medio NG en lugar de los "antibiotic media" 1 y 2; CTA en el caso de *M. xanthus*; THA en 1 caso de *S. agalactiae*.

Los resultados obtenidos se exponen en la tabla 9 e indican que el antibiótico solamente es activo frente a bacterias Gram positivas. Dentro de estas, la especie más sensible es el *S. aureus*, seguida de *M. luteus* y, a distancia, de las especies del género *Bacillus* ensayadas y finalmente de *S. faecalis*, *C. glutamicum* y *L. monocytogenes*.

En cuanto a su efecto sobre protozoos, el antibiótico fue ensayado frente amebas Limax, mediante la técnica descrita. Se emplearon concentraciones de 1, 10 y 25 u/ml del antibiótico y en ningún caso pudo comprobarse que éste provocase la lisis o el enquistamiento de las amebas.

Aún cuando en medios sólidos y por la técnica detallada no fue posible poner de manifiesto actividad del antibiótico frente a mixobacterias, las experiencias que se describen en el apartado 5 de este capítulo demuestran que el antibiótico presenta un fuerte poder bactericida frente a *M. xanthus* y el propio *M. coralloides* cuando se emplea a concentraciones adecuadas sobre cultivos en crecimiento en medios líquidos.

**Tabla 9.** Espectro antimicrobiano del antibiótico producido por *M. coralloides* D.*

| Organismo | Antibiótico (µg/disco) | | | |
|---|---|---|---|---|
| | 0'054 | 0'27 | 0'54 | 1'36 |
| *Myxococcus xanthus* | 0 | 0 | 0 | 0 |
| *Pseudomonas aeruginosa.* | 0 | 0 | 0 | 0 |
| *Pseudomonas reptilivora* | 0 | 0 | 0 | 0 |
| *Escherichia coli* | 0 | 0 | 0 | 0 |
| *Salmonella typhimurium* | 0 | 0 | 0 | 0 |
| *Klebsiella pneumoniae* | 0 | 0 | 0 | 0 |
| *Proteus inconstans* | 0 | 0 | 0 | 0 |
| *Micrococcus luteus* | 8 | 13 | 15 | 19 |
| *Staphylococcus aureus* | 9 | 16 | 20 | 24 |
| *Streptococcus agalactiae* | 0 | 0 | 0 | 0 |
| *Streptococcus faecalis* | 0 | 8 | 10 | 15 |
| *Bacillus subtilis* | 0 | 9 | 12 | 16 |
| *Bacillus megaterium* | 0 | 11 | 14 | 18 |
| *Corynebacterium glutamicum* | 0 | 0 | 9 | 11 |
| *Listeria monocytogenes* | 0 | 0 | 9 | 10 |
| *Mycobacterium phlei* | 0 | 0 | 0 | 0 |
| *Mycobacterium smegmatis* | 0 | 0 | 0 | 0 |
| *Nocardia coralina* | 0 | 0 | 0 | 0 |
| *Saccharomyces cerevisiae* | 0 | 0 | 0 | 0 |
| *Torula utilis* | 0 | 0 | 0 | 0 |
| *Aspergillus niger* | 0 | 0 | 0 | 0 |

*: Resultados expresados como mm de diámetro del halo de inhibición.

## 4. EFECTO DEL ANTIBIOTICO SOBRE *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*.

Como ha sido visto en el apartado anterior, el microorganismo más sensible, entre los ensayados, resultó ser el *S. aureus*. A la hora, por tanto, de estudiar el mecanismo de acción del antibiótico aislado, se eligió esta bacteria para llevar a cabo una serie de experimentos encaminados a determinar el efecto bacteriostático o bactericida del antibiótico, así como su efecto sobre las principales rutas biosintéticas.

### 4.1.1. Efecto del antibiótico sobre el crecimiento del *S. aureus*.

Se comprobó añadiendo a cultivos en fase exponencial de *S. aureus* en medio BHI cantidades de antibiótico suficientes para conseguir unas concentraciones de 2 y 10 u/ml. La evolución de los cultivos, junto con la de otro testigo sin antibiótico, se siguió determinando la densidad óptica a 650 nm a intervalos de una hora. Los resultados se exponen en la tabla 10 y figura 3 e indican que el antibiótico detiene instantaneamente el crecimiento, sin que, durante el tiempo de duración del experimento, se observen indicios apreciables de lisis a ninguna de las concentraciones de antibiótico empleadas.

**Tabla 10.** Evolución de la densidad óptica (650 nm) de cultivos de *S. aureus* adicionados de antibiótico.

| Tiempo* (h) | Antibiótico añadido (u/ml) 0 | 2 | 10 |
|---|---|---|---|
| -1 | 0'11 | 0'11 | 0'11 |
| 0 | 0'16 | 0'16 | 0'16 |
| 1 | 0'23 | 0'18 | 0'18 |
| 2 | 0'33 | 0'19 | 0'18 |
| 3 | 0'47 | 0'19 | 0'18 |
| 4 | 0'68 | 0'19 | 0'18 |
| 5 | 0'86 | 0'19 | 0'18 |
| 6 | 1'00 | 0'19 | 0'18 |
| 7 | 1'15 | 0'19 | 0'18 |
| 8 | 1'30 | 0'18 | 0'17 |

*: El tiempo 0 corresponde al momento de la adición del antibiótico.

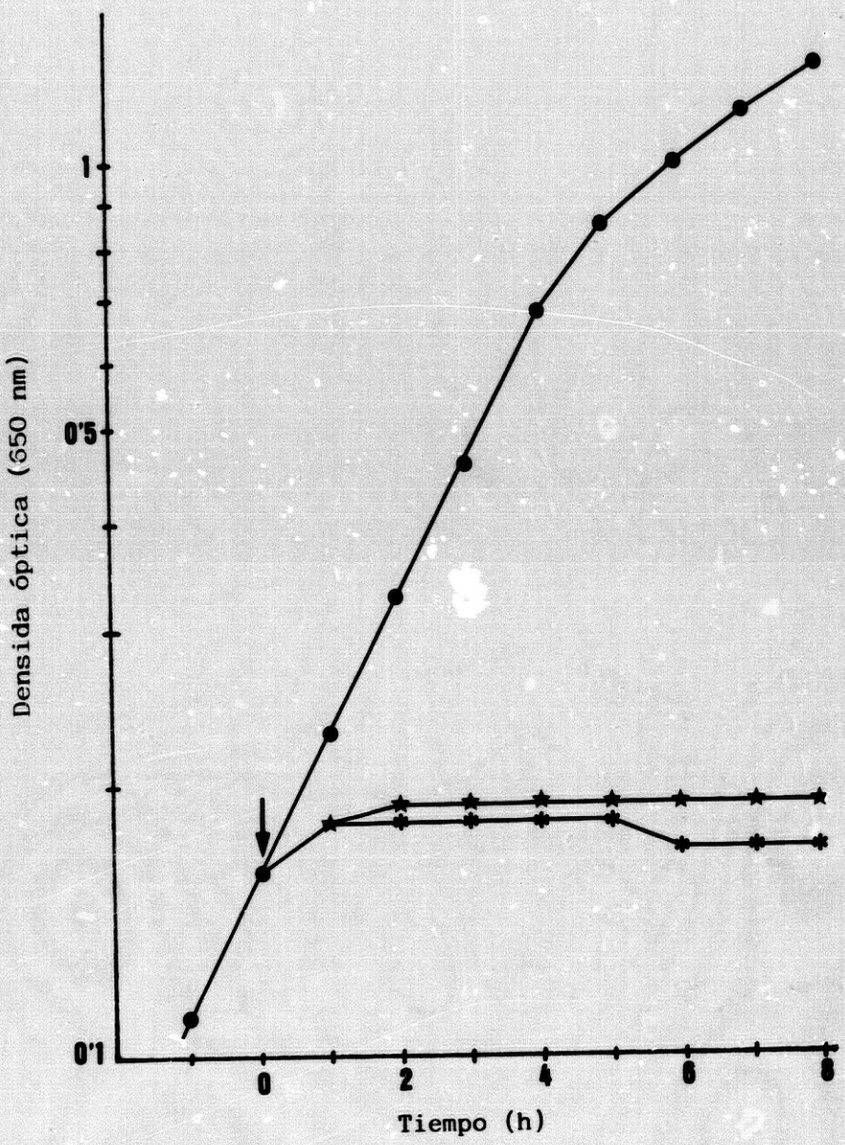


**Figura 3.** Evolución de la densidad óptica de cultivos de *S. aureus* adicionados de antibiótico. ●: testigo; ★: 2 u/ml; ✱: 10 u/ml.

**4.1.2. Efecto del antibiótico sobre el crecimiento del *S. aureus* en un medio hipotónico.**

Al objeto de comprobar si el *S.aureus* se lisa por acción del antibiótico cuando se cultiva en medios hipotónicos (Arias, 1.977) se realizó un experimento en el que el *S. aureus* se cultivó en medio BHI diluido cinco veces con agua destilada en presencia de 10 u/ml de antibiótico. La evolución del cultivo, junto con la de otro testigo sin antibiótico, se siguió determinando la densidad óptica a 650 nm a intervalos de una hora. Los resultados se exponen en la tabla 11 y figura 4 e indican que, como en el caso anterior el antibiótico detiene inmeditamente el crecimiento, pero sin que se aprecie una lisis significativa del cultivo.

**Tabla 11.** Evolución de la densidad óptica (650 nm) de cultivos de *S. aureus* en un medio hipotónico adicionados de antibiótico.

| Tiempo* (h) | Antibiótico añadido (u/ml) 0 | 10 |
|---|---|---|
| -1 | 0'11 | 0'11 |
| 0 | 0'13 | 0'13 |
| 1 | 0'15 | 0'14 |
| 2 | 0'17 | 0'14 |
| 3 | 0'20 | 0'14 |
| 4 | 0'23 | 0'13 |
| 5 | 0'27 | 0'13 |
| 6 | 0'29 | 0'13 |
| 7 | 0'31 | 0'13 |
| 8 | 0'32 | 0'12 |

*: El tiempo 0 corresponde al momento de la adición del antibiótico.

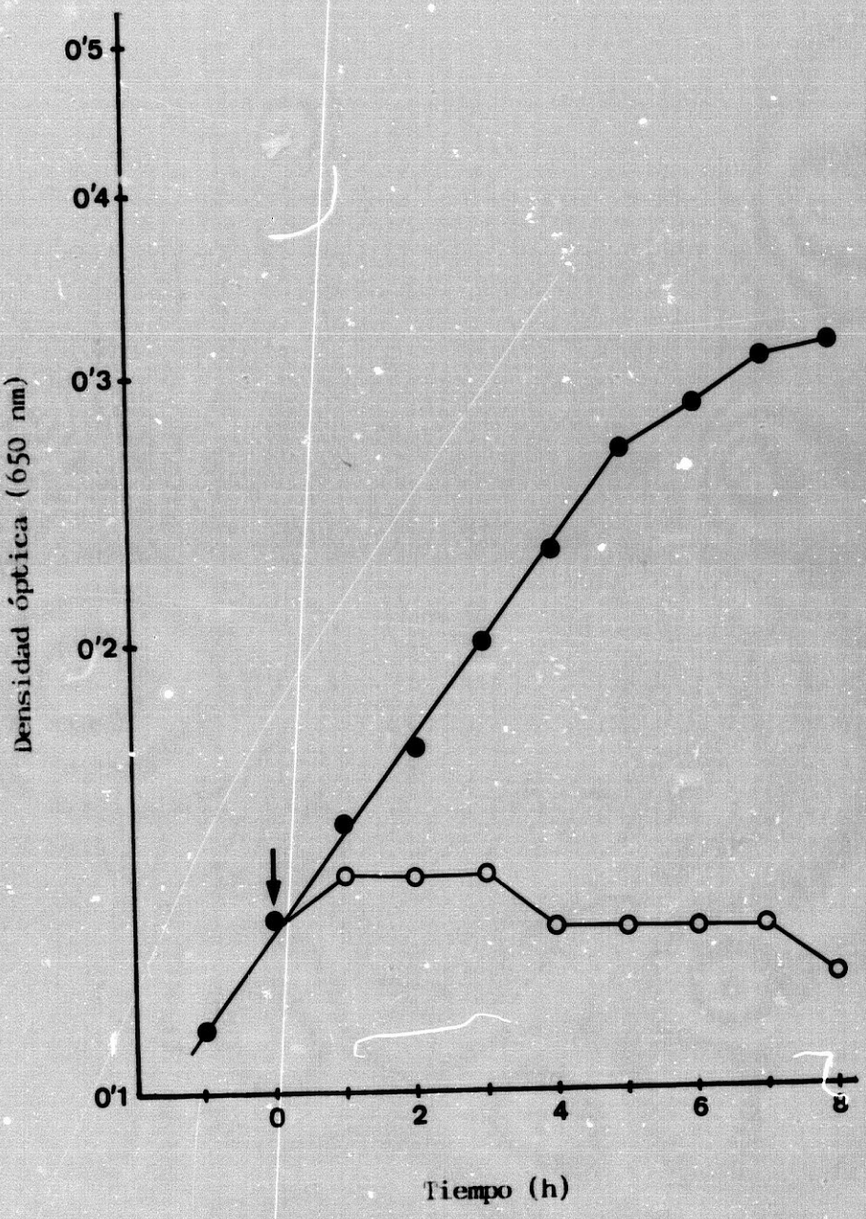


**Figura 4.** Evolución de la densidad óptica (650 nm) de cultivos de *S. aureus* en medio hipotónico adicionados de antibiótico (10 u/ml). Los símbolos llenos corresponden al cultivo testigo; los vacios al adicionado de antibiótico. La flecha indica el momento de la adición del antibiótico.

## 4.2. Efecto del antibiótico sobre la viabilidad de *S. aureus*.

### 4.2.1. Efecto sobre la viabilidad de *S. aureus* en crecimiento.

Se comprobó añadiendo a cultivos en fase exponencial de *S. aureus* en medio BHI cantidad de antibiótico suficiente para conseguir una concentración de 2 u/ml. La evolución del cultivo problema, junto con la de otro testigo sin antibiótico, fue seguida tomando muestras a intervalos de una hora, diluyéndolas convenientemente y efectuando el recuento de las células viables por siembra en cajas de Petri con agar común. Por cada dilución se sembraron 5 cajas de Petri, al objeto de poder calcular una media estadística y el error de la misma.

Los resultados se exponen en la tabla 12 y la figura 5 e indican que el antibiótico es fuertemente bactericida sobre células de *S. aureus* en crecimiento

**Tabla 12.** Evolución del numero de células viables en cultivos de *S. aureus* adicionados de antibiótico.

| Tiempo* (h) | Antibiótico añadido (u/ml) 0 | 2 |
|---|---|---|
| -1 | $1'1(\pm0'05).10^{7}$ | $1'1(\pm0'05).10^{7}$ |
| 0 | $1'6(\pm0'08).10^{7}$ | $1'6(\pm0'08).10^{7}$ |
| 1 | $2'3(\pm0'12).10^{7}$ | $9'3(\pm0'38).10^{6}$ |
| 2 | $3'3(\pm0'09).10^{7}$ | $2'7(\pm0'13).10^{6}$ |
| 3 | $4'7(\pm0'17).10^{7}$ | $6'4(\pm0'27).10^{5}$ |
| 4 | $6'8(\pm0'32).10^{7}$ | $1'4(\pm0'08).10^{5}$ |
| 5 | $9'3(\pm0'19).10^{7}$ | $4'4(\pm0'21).10^{4}$ |
| 6 | $1'1(\pm0'07).10^{8}$ | $1'0(\pm0'13).10^{4}$ |
| 7 | $1'3(\pm0'09).10^{8}$ | ND |
| 8 | $1'5(\pm0'11).10^{8}$ | ND |

*: El tiempo 0 corresponde al momento de la adición del antibiótico.

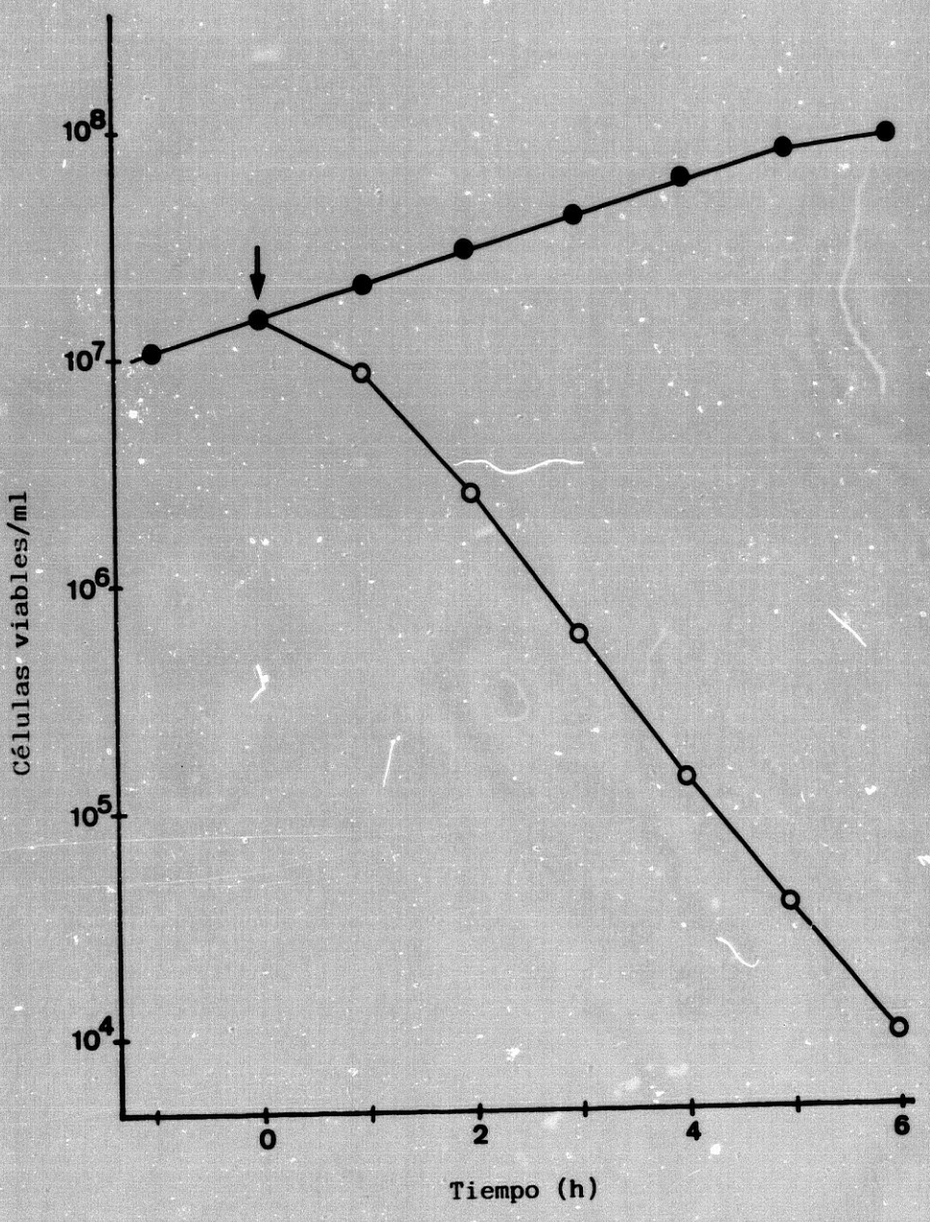


**Figura 5.** Evolución del número de células viables en cultivos de *S. aureus* adicionados de antibiótico. Los símbolos llenos corresponden al cultivo control; los vacíos al adicionado de antibiótico.

**4.2.2. Efecto del antibiótico sobre la viabilidad de celulas en reposo de *S. aureus*.**

Un cultivo de 24 horas de *S. aureus* sobre medio BHI fue centrifugado y las células, lavadas una vez con solución salina, fueron suspendidas en un volumen de solución salina igual al del cultivo primitivo. La suspensión se incubó durante dos horas a 37º, al objeto de que las células terminaran los ciclos celulares en que estuvieran engarzadas, y a continuación se dividió en tres lotes a dos de los cuales se añadió antibiotico en cantidad necesaria para lograr concentraciones de 2 y 10 u/ml, respectivamente; el tercer lote se dejó como testigo.

Las tres suspensiones se incubaron a 37º y, a intervalos de una hora, se tomaron muestras en las que se determinó el número de células viables por siembra en agar comun. Los resultados obtenidos a lo largo de 8 horas de incubación se exponen en la tabla 13 y muestran que, en contra de lo que sucede con células de *S. aureus* en crecimiento, el antibiótico no afecta la viabilidad de las células en reposo de la citada bacteria.

**Tabla 13.** Evolución del número de células viables ($\times 10^8$) de suspensiones de *S. aureus* adicionadas de antibiótico.

| Tiempo (h) | Antibiótico añadido (u/ml) 0 | 2 | 10 |
|---|---|---|---|
| 0 | 2'6 (±0'16) | 2'7 (±0'11) | 2'6 (±0'18) |
| 1 | 2'6 (±0'21) | 2'6 (±0'17) | 2'5 (±0'18) |
| 2 | 2'5 (±0'16) | 2'4 (±0'22) | 2'6 (±0'09) |
| 3 | 2'6 (±0'07) | 2'6 (±0'14) | 2'7 (±0'12) |
| 4 | 2'6 (±0'17) | 2'5 (±0'22) | 2'5 (±0'17) |
| 5 | 2'5 (±0'17) | 2'5 (±0'14) | 2'5 (±0'21) |
| 6 | 2'5 (±0'09) | 2'5 (±0'14) | 2'5 (±0'16) |
| 7 | 2'4 (±0'14) | 2'5 (±0'23) | 2'4 (±0'09) |
| 8 | 2'4 (±0'16) | 2'4 (±0'07) | 2'4 (±0'10) |

**4.2.3. Efecto del antibiótico sobre la viabilidad de células de *S. aureus* en cultivos añadidos de cloranfenicol.**

Como complemento de la experiencia anterior, se llevó a cabo otra consistente en comprobar si un antibiótico bacteriostático, del tipo del cloranfenicol, interfiere con el efecto bactericida del antibiótico aislado.

A tal fin, un cultivo de *S. aureus* en fase exponencial, sobre medio BHI, fue dividido en cuatro lotes iguales y al cabo de una hora de incubación adicional se añadió a uno de ellos 5'5 µg/ml del antibiótico aislado (2u/ml), a otro 25 µg/ml de cloranfenicol y a un tercero una mezcla de cloranfenicol y antibiótico a las concentraciones indicadas; el cuarto lote se utilizó como testigo. A intervalos de una hora se tomaron muestras de cada uno de los lotes, determinándose el número de células viables por siembra en agar común.

Los resultados se exponen en la tabla 14 y la figura 6 e indican que la presencia de cloranfenicol interfiere la acción bactericida del antibiótico aislado, lo que confirma los resultados obtenidos en la experiencia anterior que indicaban que el antibiótico sólo es bactericida sobre células en crecimiento.

**Tabla 14** Evolución del número de células viables en cultivos de *S. aureus* añadidos de cloranfenicol (CP)*, antibiótico de *M. coralloides* (A)* y de ambos.

| Tiempo** (h) | Antibiótico añadido | | | |
|---|---|---|---|---|
| | Ninguno | A | CP | A + CP |
| -1 | $9'3.10^6$ | $9'3.10^6$ | $9'3.10^6$ | $9'3.10^6$ |
| 0 | $1'4.10^7$ | $1'4.10^7$ | $1'4.10^7$ | $1'4.10^7$ |
| 1 | $1'8.10^7$ | $1'0.10^7$ | $1'6.10^7$ | $1'2.10^7$ |
| 2 | $2'7.10^7$ | $3'0.10^5$ | $1'8.10^7$ | $9'1.10^6$ |
| 3 | $3'6.10^7$ | $9'6.10^5$ | $1'9.10^7$ | $8'7.10^6$ |
| 4 | $5'2.10^7$ | $2'5.10^5$ | $2'0.10^6$ | $8'3.10^6$ |
| 5 | $6'7.10^7$ | $8'2.10^4$ | $1'9.10^7$ | $7'6.10^6$ |
| 6 | $7'6.10^7$ | $2'0.10^4$ | $1'9.10^7$ | $7'6.10^6$ |

*.- CP: 25 µg/ml; A: 5'5 µg/ml.

**.- El tiempo 0 corresponde al momento de la adición de los antibióticos.

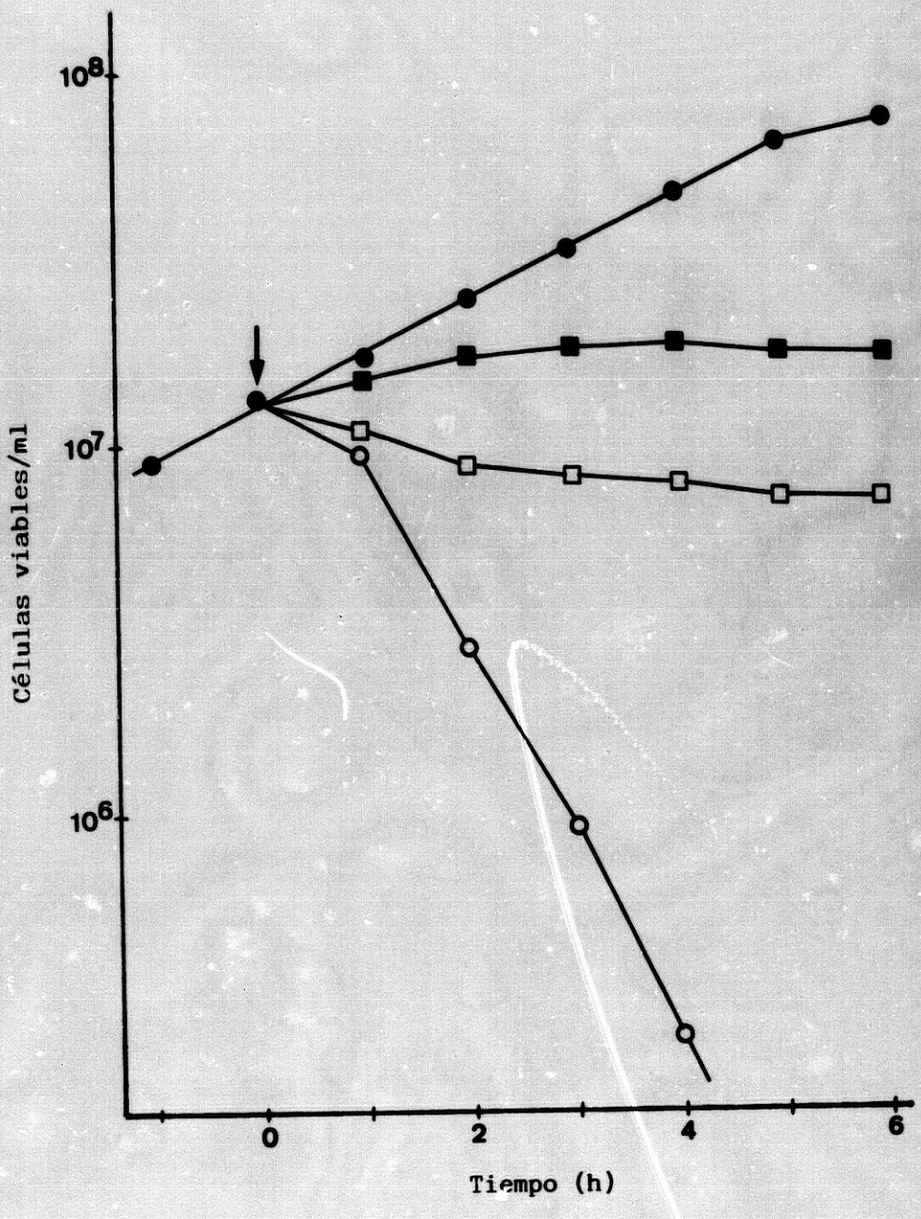


**Figura 6.** Evolución del número de células viables en cultivos de *S. aureus* añadidos del antibiótico de *M. coralloides* (5'5 µg/ml), cloranfenicol (25 µg/ml) y ambos. ● testigo; ○ antibiótico; ■ cloranfenicol; □ mezcla de ambos.

**4.3. Efecto del antibiótico sobre la síntesis de ARN en *S. aureus*.**

Se comprobó determinando la incorporación de (5,6 $^{3}$H)uridina a células de *S. aureus* en crecimiento exponencial sobre medio BHI.

El precursor radioactivo se adicionó cuando el cultivo alcanzó una densidad óptica de 0'11, en cantidad de 2'5 µCi/ml; el cultivo se dividió en dos lotes, a uno de los cuales, tras 30 minutos de incubación, se añadieron 5 u/ml del antibiótico, comprobándose la incorporación del precursor radioactivo durante 90 minutos más.

Los resultados se exponen en la tabla 15 y la figura 7 y demuestran que el antibiótico detiene instantaneamente la síntesis de ARN.

**Tabla 15.** Efecto del antibiótico de *M. coralloides* (5 u/ml) sobre la incorporación de (5,6 $^{3}$H)uridina por células de *S. aureus*.

| Tiempo (min) | Radioactividad incorporada (cpm) | |
|---|---|---|
| | Control | + antibiótico |
| -15 | 8.130 | 8.203 |
| 1 | 10 555 | 10.504 |
| 6 | 11.564 | 10.797 |
| 17 | 14.687 | 10.736 |
| 35 | 18.764 | 11.134 |
| 60 | 32.462 | 10.311 |
| 90 | 54.110 | 9.847 |

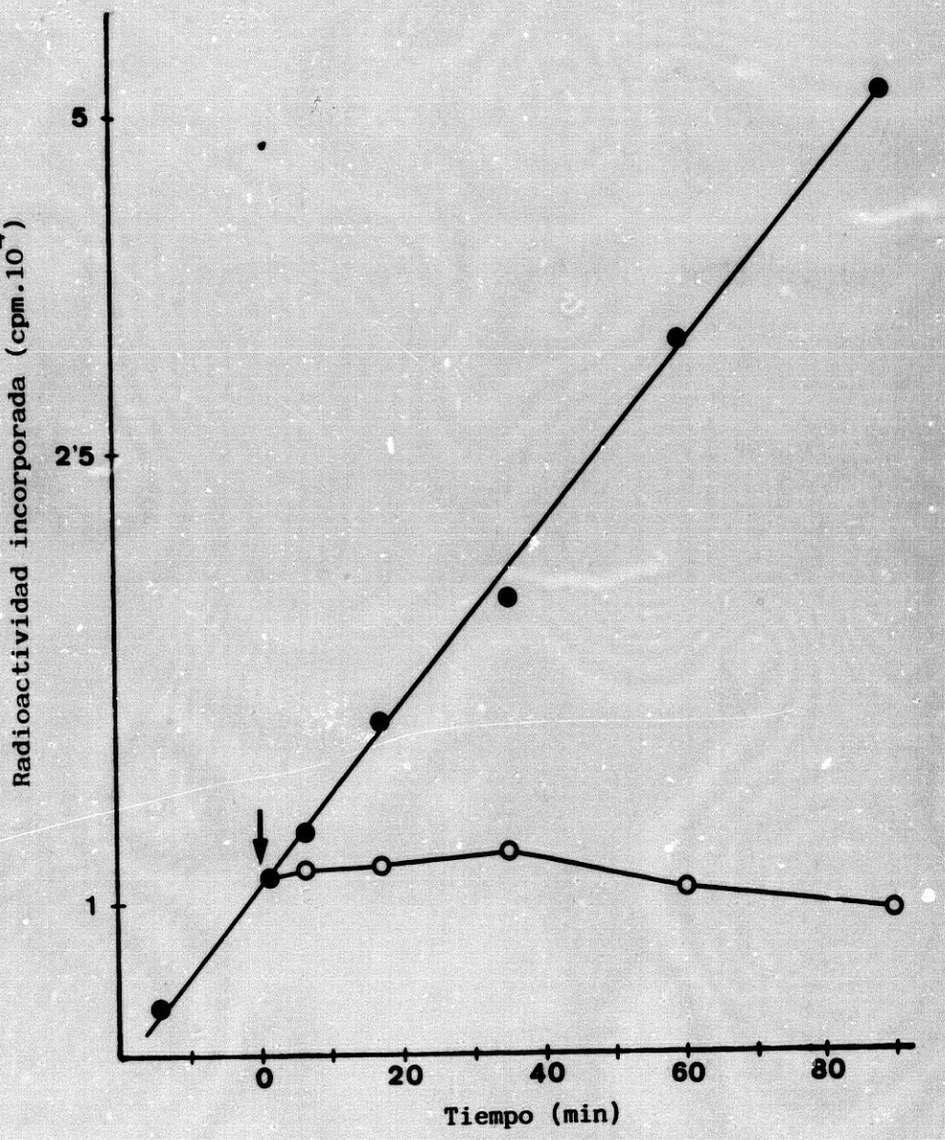


**Figura 7.** Efecto del antibiótico de *M. coralloides* (5 u/ml) sobre la incorporación de uridina tritiada por células de *S. aureus* en crecimiento exponencial. Los símbolos llenos corresponden al cultivo control; los vacios al adicionado de antibiótico. La flecha indica el momento de adición del antibiótico.

**4.4. Efecto del antibiótico sobre la síntesis de proteínas en *S. aureus*.**

Se comprobó determinando el efecto del antibiótico sobre la incorporación de leucina tritiada a células de *S. aureus* en crecimiento exponencial sobre medio BHI.

El precursor radioactivo se adicionó cuando el cultivo alcanzó una densidad óptica de 0'11, en cantidad de 3'3 µCi/ml; el cultivo se dividió en dos lotes, a uno de los cuales, tras 30 minutos de incubación adicional, se añadieron 5 u/ml del antibiótico, comprobándose la incorporación de leucina tritiada durante 90 minutos más.

Los resultados obtenidos se exponen en la tabla 16 y la figura 8 e indican que el antibiótico, a partir de los 17 minutos de su adición, bloquea totalmente la síntesis de proteínas.

**Tabla 16.** Efecto del antibiótico de *M. coralloides* (5 u/ml) sobre la incorporación de leucina tritiada por células de *S. aureus* en crecimiento.

| Tiempo (min) | Radioactividad incorporada (cpm) | |
|---|---|---|
| | Control | + antibiótico |
| -15 | 588 | 580 |
| 1 | 961 | 898 |
| 6 | 1.006 | 1.010 |
| 17 | 1.314 | 1.065 |
| 35 | 2.149 | 1.047 |
| 60 | 3.545 | 1.079 |
| 90 | 7.465 | 1.049 |

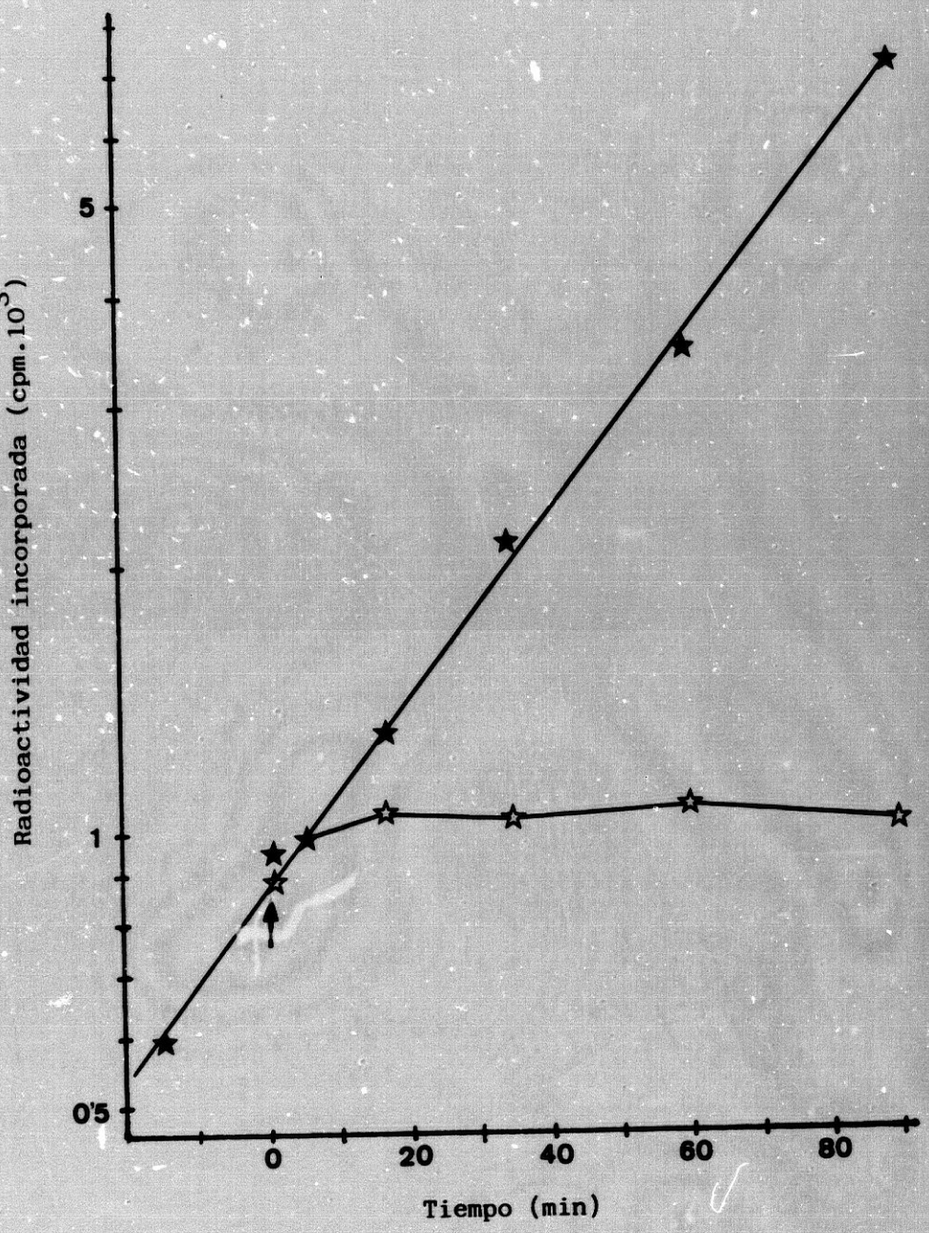


**Figura 8.** Efecto del antibiótico de *M. coralloides* (5 u/ml) sobre la incorporación de leucina tritiada por células de *S. aureus* en crecimiento. Los símbolos llenos corresponden al cultivo control; los vacios al adicionado de antibiótico. La flecha indica el momento de adición del antibiótico.

**4.5. Efecto del antibiótico sobre la síntesis de ADN en *S. aureus*.**

Se comprobó determinando el efecto del antibiótico sobre la incor-poración de timidina tritiada a células de *S. aureus* en crecimiento exponencial sobre medio BHI.

El precursor radioactivo se adicionó cuando el cultivo alcanzó una densidad óptica de 0'11, en cantidad de 1'6 µCi/ml. Como en casos anteriores, el cultivo se dividió en dos lotes, a uno de los cuales, tras 30 minutos de incubación, se añadieron 5 u/ml del antibiótico, comprobándose la incorporación de timidina tritiada durante 90 minutos más.

Los resultados obtenidos se exponen en la tabla 17 y figura 9 e indican que el antibiótico bloquea la síntesis de ADN a partir de los 17 minutos de su adición.

**Tabla 17.** Efecto del antibiótico de *M. coralloides* (5 u/ml) sobre la incorporación de timidina tritiada por células de *S. aureus* en crecimiento.

| Tiempo (min) | Radioactividad incorporada (cpm) | |
|---|---|---|
| | Control | + antibiótico |
| -15. | 963 | 971 |
| 1 | 1.589 | 1.738 |
| 6 | 1.804 | 1.950 |
| 17 | 2.610 | 2.972 |
| 35 | 4.529 | 3.213 |
| 60 | 6.310 | 3.260 |
| 90 | 8.073 | 3.255 |

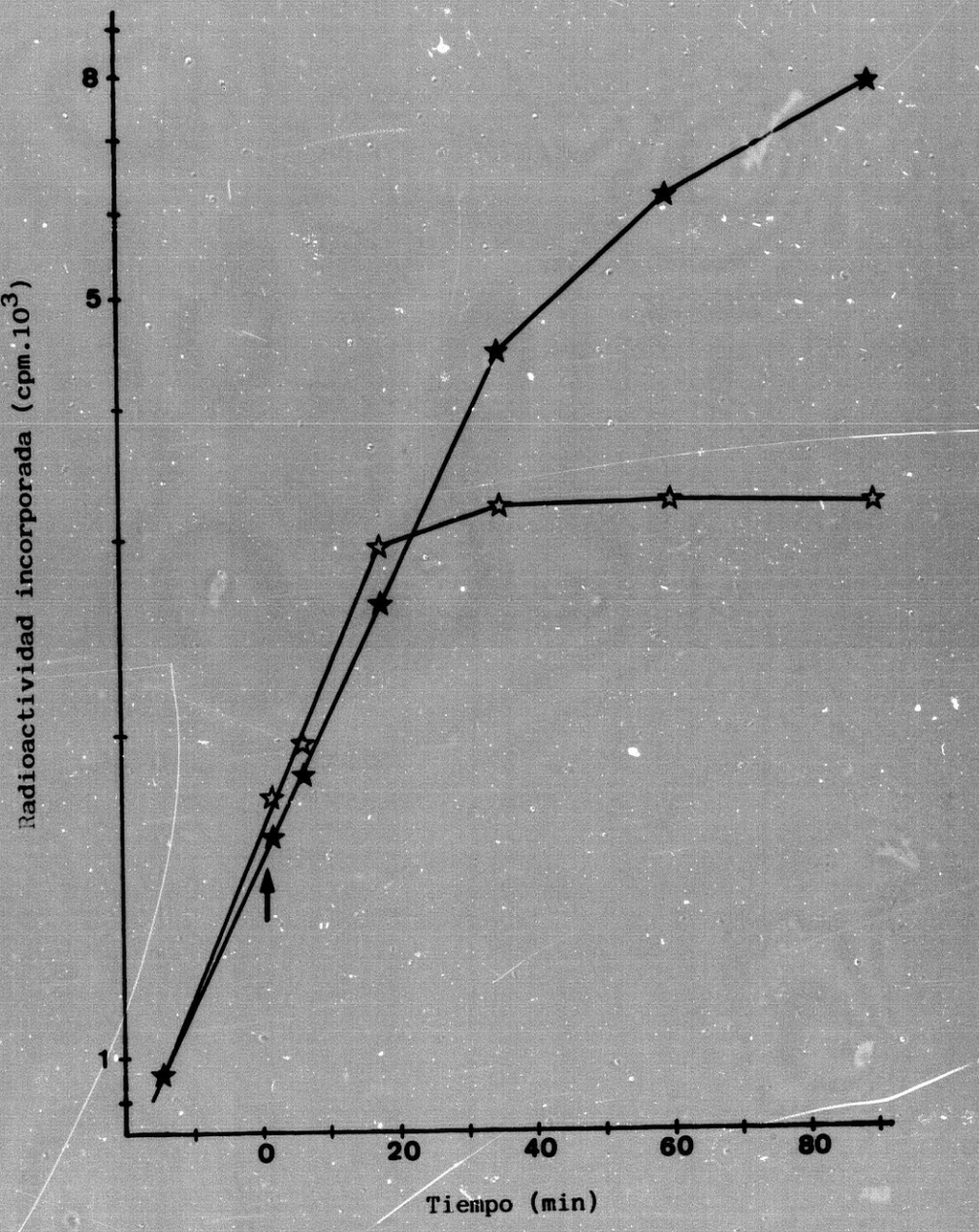


**Figura 9.** Efecto del antibiótico de *M. coralloides* (5 u/ml) sobre la incorporación de timidina tritiada por células de *S. aureus* en crecimiento. Los símbolos llenos corresponden al cultivo control; los vacios al adicionado de antibiótico. La flecha indica el momento de adición del antibiótico.

**4.6. Efecto del antibiótico sobre la síntesis de componentes globales de la pared celular en *S. aureus*.**

Se comprobó determinando el efecto del antibiótico sobre la incorporación de N-acetilglucosamina, marcada con $^{14}C$, a células de *S. aureus* en crecimiento exponencial sobre medio BHI.

El precursor radioactivo se adicionó cuando el cultivo alcanzó una densidad óptica de 0'11, en cantidad de 2 µCi/ml. El cultivo se dividió en dos lotes, a uno de los cuales, tras 30 minutos de incubación, se añadieron 5 u/ml del antibiótico, comprobándose la incorporación de la N-acetilglucosamina marcada en la fracción insoluble en frío en ácido tricloroacético 5% durante 90 minutos más.

Los resultados se exponen en la tabla 18 y la figura 10 e indican que el antibiótico origina un bloqueo no total de la síntesis de componentes de la pared celular a partir de los 15 minutos de su adición.

**Tabla 18.** Efecto del antibiótico de *M. corallcides* (5 u/ml) sobre la incorporación de N-acetilglucosamina, marcada con $^{14}C$, a la fracción insoluble en frío en ácido tricloroacético 5% de células de *S. aureus* en crecimiento.

| Tiempo* (min) | Radioactividad incorporada (cpm) | |
|---|---|---|
| | Control | + antibiótico |
| -15 | 49.320 | 49.287 |
| 0 | 79.984 | 78.700 |
| 5 | 101.000 | 90.666 |
| 15 | 144.271 | 114.733 |
| 35 | 268.300 | 136.412 |
| 60 | 412.066 | 165.900 |
| 90 | 510.008 | 171.032 |

*.- El tiempo 0 corresponde al momento de adición del antibiótico.

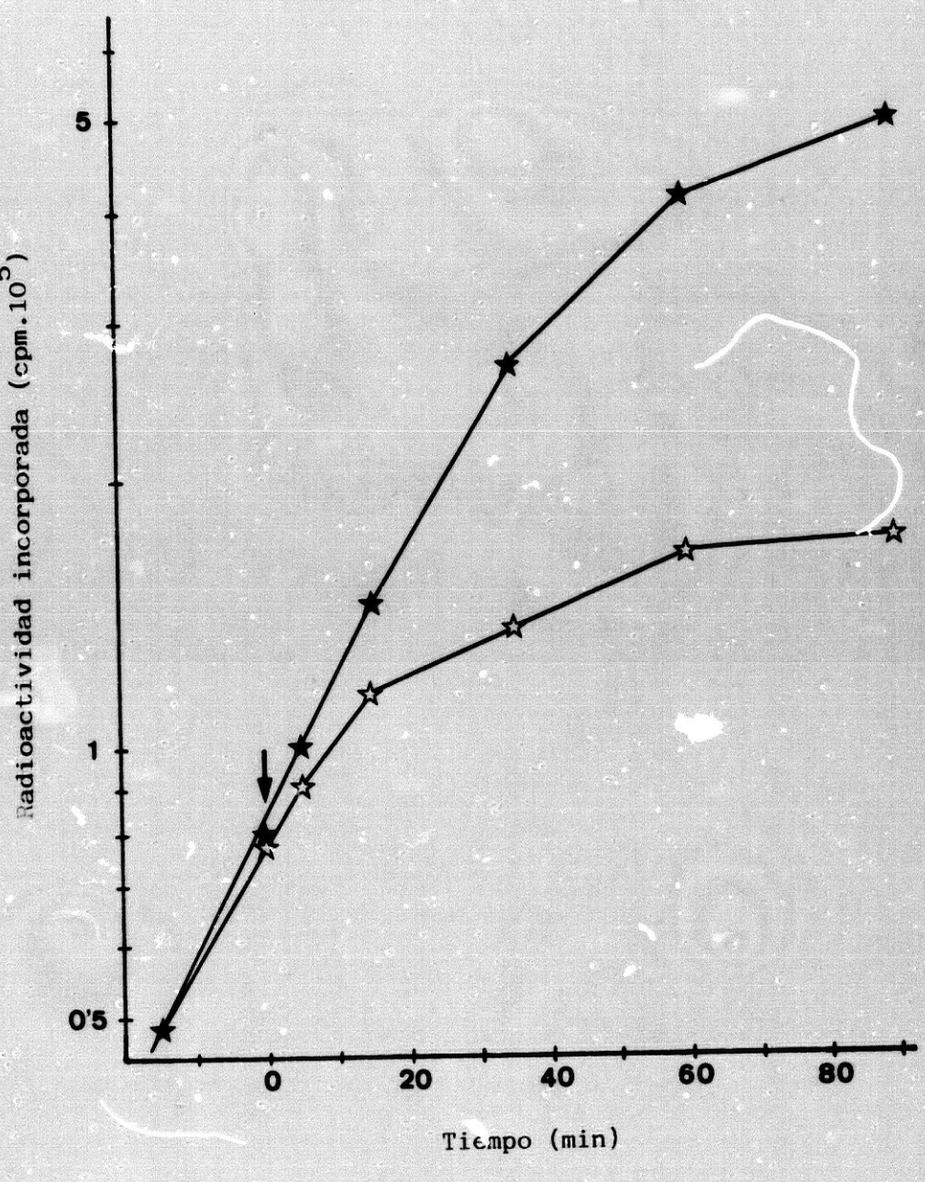


**Figura 10.** Efecto del antibiótico de *M. coralloides* (5 u/m,l) sobre la incorporación de N-acetilglucosamina, marcada con $^{14}C$, a la fracción insoluble en frío en ácido tricloroacético 5% de células de *S. aureus* en crecimiento. Los símbolos llenos corresponden al cultivo control; los vacios al adicionado de antibiótico. La flecha indica el momento de adición del antibiótico.

**4.7. Efecto del antibiótico sobre la síntesis de peptidoglucano en *S. aureus*.**

Se comprobó determinando el efecto del antibiótico sobre la incorporación de N-acetilglucosamina, marcada con $^{14}C$, a la fracción insoluble en caliente en ácido tricloroacético 5% de células de *S. aureus* en crecimiento exponencial sobre medio BHI.

El precursor radioactivo se añadió cuando el cultivo alcanzó una densidad óptica de 0'11, en cantidad de 2 µCi/ml. El cultivo, como en casos anteriores, se dividió en dos lotes, a uno de los cuales, tras 30 minutos de incubación, se añadieron 5 u/ml del antibiótico, comprobándose la incorporación de la N-acetilglucosamina marcada, en las condiciones indicadas, durante 90 minutos más.

Los resultados se exponen en la tabla 19 y la figura 11 e indican que, al igual que sucedía con los compuestos globales de la pared celular, el antibiótico produce un bloqueo no total de la biosíntesis del peptidoglucano a partir de los 15 minutos de su adición.

**Tabla 19**. Efecto del antibiótico de *M. coralloides* (5 u/ml) sobre la incorporación de N-acetilglucosamina, marcada con $^{14}C$, a la fracción insoluble en caliente en ácido tricloroacético 5% de células de *S. aureus* en crecimiento.

| Tiempo* (min) | Radioactividad incorporada (cpm. Control | + antibiótico |
|---|---|---|
| -15 | 29.520 | 29.490 |
| 0 | 44.139 | 43.690 |
| 5 | 53.465 | 47.323 |
| 15 | 63.830 | 59.847 |
| 35 | 111.300 | 69.913 |
| 60 | 149.400 | 79.516 |
| 90 | 167.905 | 83.223 |

*.- El tiempo 0 corresponde al momento de adición del antibiótico.

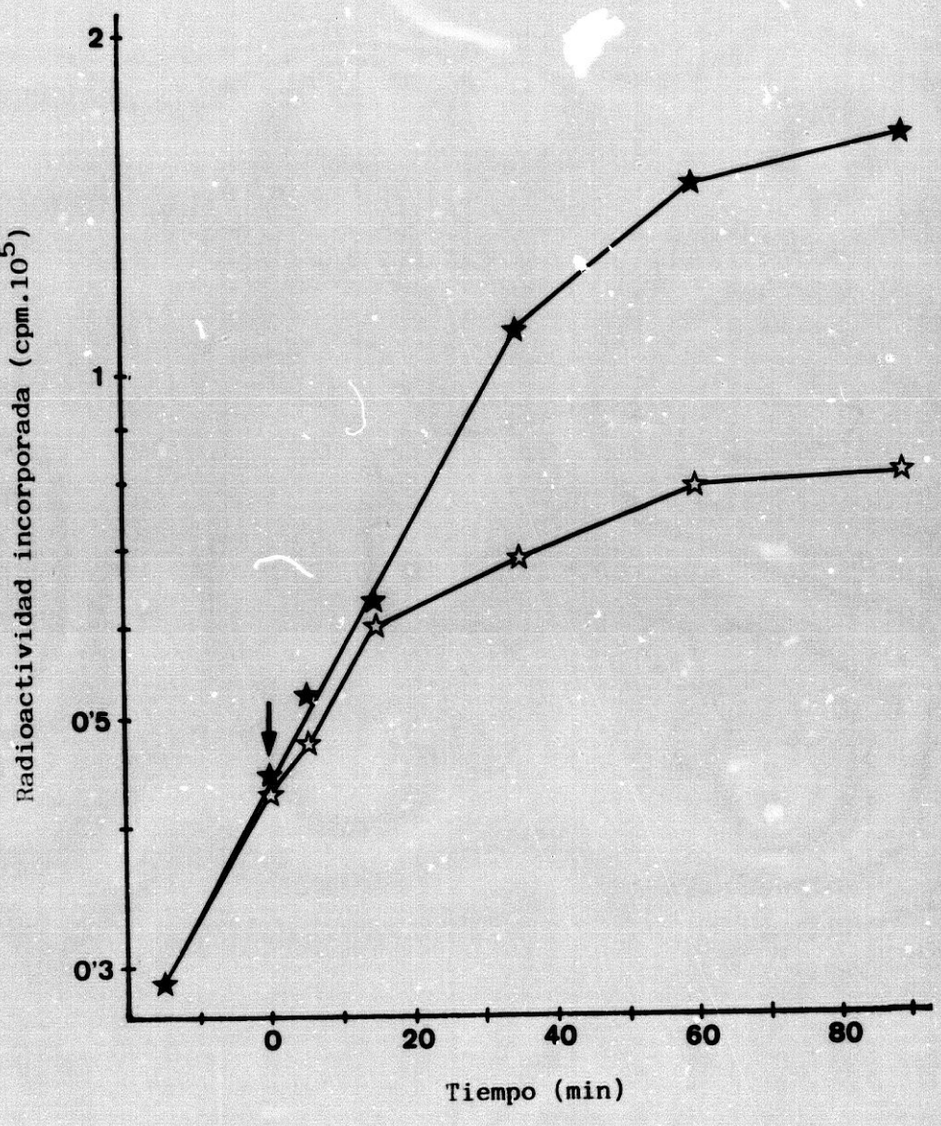


**Figura 11.** Efecto del antibiótico de *M. coralloides* (5 u/ml) sobre la incorporación de N-acetilglucosamina, marcada con $^{14}C$, a la fracción insoluble en caliente en ácido tricloroacético 5% de células de *S. aureus* en crecimiento. Los símbolos llenos corresponden al cultivo control; los vacíos al adicionado de antibiótico. La flecha indica el momento de la adición del antibiótico.

## 5. EFECTO SOBRE MIXOBACTERIAS.

### 5.1. Efecto del antibiótico sobre *M. coralloides*.

Como ha sido ya indicado, los resultados obtenidos con los mutantes superproductores llevaron a pensar que el antibiótico, por encima de determinada concentración, podría ser la señal desencadenante de la lisis del *M. coralloides* D, con lo que, cualquiera que fuese la capacidad de producción de antibiótico por una determinada cepa, la concentración del mismo que se alcanza en medios líquidos no podría superar nunca la citada concentración crítica.

Para comprobar esta hipótesis se plantearon una serie de experiencias en las que se comprobó el efecto del antibiótico sobre cultivos de *M. coralloides* en medios líquidos, sobre células en reposo de la citada bacteria y sobre cultivos de la misma en presencia de diversas concentraciones de ortofosfato. Una vez comprobado el efecto lítico del antibiótico sobre *M. coralloides* D, se determinó la concentración crítica que desencadena la lisis.

#### 5.1.1. Efecto del antibiótico sobre *M. coralloides* D en crecimiento.

Un cultivo de *M. coralloides* D en crecimiento exponencial sobre medio CT se dividió en dos lotes y, tras 30 minutos de incubación adicional a 30º en agitación continua, se añadió a uno de ellos 10 u/ml del antibiótico. Los dos cultivos se incubaron en iguales condiciones durante 6 horas más, determinándose la densidad óptica de los mismos a 650 nm a intervalos regulares de tiempo.

Los resultados se exponen en la tabla 20 y la figura 12 e indican que el antibiótico, a la concentración ensayada, provoca una lisis rápida del *M. coralloides* D. Igualmente fue encontrado que las

células de *M. coralloides* sufren una fuerte aglutinación inmediatamente después de la adición del antibiótico, con formación de pequeños grumos que tienden a sedimentar, dejando un sobrenadante transparente.

**Tabla 20.** Evolución de la densidad óptica (650 nm) de cultivos de *M. coralloides* D añadidos de antibiótico.

| Tiempo* (h) | Antibiótico añadido (u/ml) 0 | 10 |
|---|---|---|
| -0'5 | 0'37 | 0'37 |
| 0'0 | 0'40 | 0'40 |
| 0'5 | . | 0'39 |
| 1'0 | 0'44 | 0'37 |
| 1'5 | . | 0'35 |
| 2'0 | 0'50 | 0'25 |
| 3'0 | 0'54 | 0'11 |
| 4'0 | 0'63 | 0'06 |
| 5'0 | 0'69 | 0'05 |
| 6'0 | 0'73 | 0'04 |

*: El tiempo 0 corresponde al momento de la adición del antibiótico.

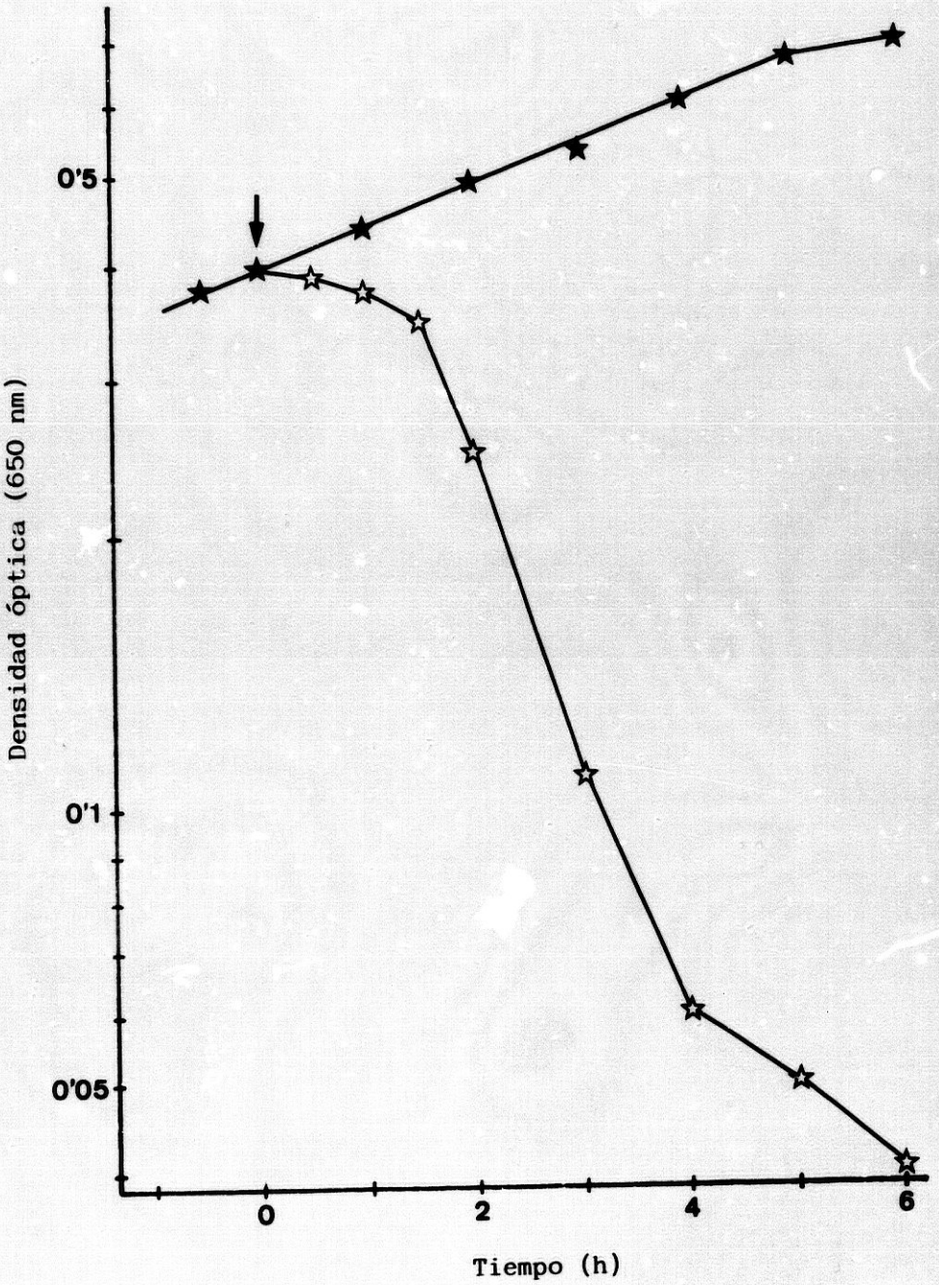


**Figura 12.** Evolución de la densidad óptica (650 nm) de cultivos de *M. coralloides* D añadidos de 10 u/ml de antibiótico. Los símbolos llenos corresponden al cultivo control; los vacios al adicionado de antibiótico. La flecha indica el momento de adición del antibiótico.

**5.1.2. Efecto del antibiótico sobre células de *M. coralloides* D en reposo.**

Un cultivo en fase exponencial de *M. coralloides* D fue centrifugado y las células, lavadas una vez con solución salina, fueron resuspendidas en un volumen mitad del primitivo de tampón de fosfatos 10 mM, pH 7. La suspensión fue dividida en tres lotes que se incubaron a 30º y en agitación continua durante una hora a fin de que las células terminaran los ciclos celulares en que estuviesen engarzadas. Al cabo de dicho tiempo, un lote fue adicionado de 5 u/ml de antibiótico y otro de 10 u/ml, utilizándose el tercer lote como control; la evolución de la densidad óptica a 650 nm fue seguida en las tres suspensiones durante 7 horas más.

Los resultados se exponen en la tabla 21 y muestran que el antibiótico no ejerce ningún efecto lítico apreciable sobre las células de *M. coralloides* D en reposo. Por lo que respecta al efecto aglutinante, éste fue tan patente como en el caso de las células en crecimiento.

**Tabla 21.** Evolución de la densidad optica (650 nm) de suspensiones de células de *M. coralloides* D en presencia del antibiótico.

| Tiempo* (h) | Antibiótico añadido (u/ml) 0 | 5 | 10 |
|---|---|---|---|
| -1 | 0'91 | 0'91 | 0'91 |
| 0 | 0'88 | 0'87 | 0'86 |
| 1 | 0'84 | 0'85 | 0'86 |
| 2 | 0'81 | 0'82 | 0'83 |
| 3 | 0'78 | 0'80 | 0'80 |
| 4 | 0'76 | 0'78 | 0'80 |
| 5 | 0'75 | 0'78 | 0'78 |
| 6 | 0'75 | 0'76 | 0'76 |
| 7 | 0'74 | 0'75 | 0'75 |

*: El tiempo 0 corresponde al momento de la adición del antibiótico.

**5.1.3. Efecto del antibiótico sobre el *M. coralloides* D en crecimiento en medios con diversas concentraciones de ortofosfato.**

El efecto lítico del antibiótico sobre el *M. coralloides* D fue comprobado en medio CT normal que contiene ortofosfato 10 mM. Como ha sido ya citado, Fernandez-Vivas y colaboradores (1.983a) demostraron que concentraciones elevadas de ortofosfato inhiben totalmente el proceso de autolisis en *M. coralloides* D y, de otra parte, en esta Memoria (1.2.1) ha sido demostrado, igualmente, que concentraciones elevadas del citado ión inhiben la producción de antibiótico. Es por ello que se creyó oportuno comprobar el efecto de diversas concentraciones de ortofosfato sobre la lisis de *M. coralloides* D provocada por el antibiótico.

A tal fin se llevó a cabo una serie de experimentos en los que se comprobó la evolución de la densidad óptica (650 nm) de cultivos de *M. coralloides* D en medio CT con ortofosfato 1, 20, 30, y 40 mM, añadidos de 10 u/ml de antibiótico. Los resultados obtenidos se exponen en la tabla 22 y las figuras 13, 14 y 15 y demuestran que, a partir de la concentración 20 mM, el ión ortofosfato inhibe parcial o totalmente la lisis provocada por el antibiótico.

A efectos comparativos, en la figura 13 se incluye la gráfica correspondiente a la concentración 10 mM de ortofosfato obtenida anteriormente.

No se observó efecto aglutinante a partir de la concentración 30 mM.

**Tabla 22.** Efecto del antibiótico (10 u/ml) sobre la evolución de la densidad óptica (650 nm) de cultivos de *M. coralloides* D en medios con diversas concentraciones de ortofosfato.

| Tiempo** | Concentraciones de ortofosfato (mM/l) | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| (h) | 1 | | 20 | | 30 | | 40 | |
| | T* | A* | T* | A* | T* | A* | T* | A* |
| -0'5 | 0'22 | 0'22 | 0'26 | 0'26 | 0'18 | 0'18 | 0'20 | 0'20 |
| 0'0 | 0'23 | 0'23 | 0'28 | 0'28 | 0'19 | 0'19 | 0'20 | 0'20 |
| 0'5 | . | 0'19 | . | 0'26 | . | 0,19 | . | 0'20 |
| 1'0 | 0'25 | 0'10 | 0'31 | 0'25 | 0'21 | 0'19 | 0'21 | 0'20 |
| 1'5 | . | 0'07 | . | 0'23 | . | 0'19 | . | 0'20 |
| 2'0 | 0'28 | 0'06 | 0'35 | 0'21 | 0'23 | 0'19 | 0'22 | 0'20 |
| 3'0 | 0'30 | 0'05 | 0'39 | 0'20 | 0'25 | 0'19 | 0'23 | 0'20 |
| 4'0 | 0'32 | 0'04 | 0'44 | 0'20 | 0'27 | 0'20 | 0'24 | 0'21 |
| 5'0 | 0'33 | . | 0'48 | 0'20 | 0'30 | 0'20 | 0'26 | 0'21 |
| 6'0 | 0'33 | . | 0'50 | 0'21 | 0'32 | 0'20 | 0'27 | 0'21 |

*.- T: cultivos control; A: cultivos adicionados de antibiótico.

**.- El tiempo 0 corresponde al momento de adición del antibiótico.

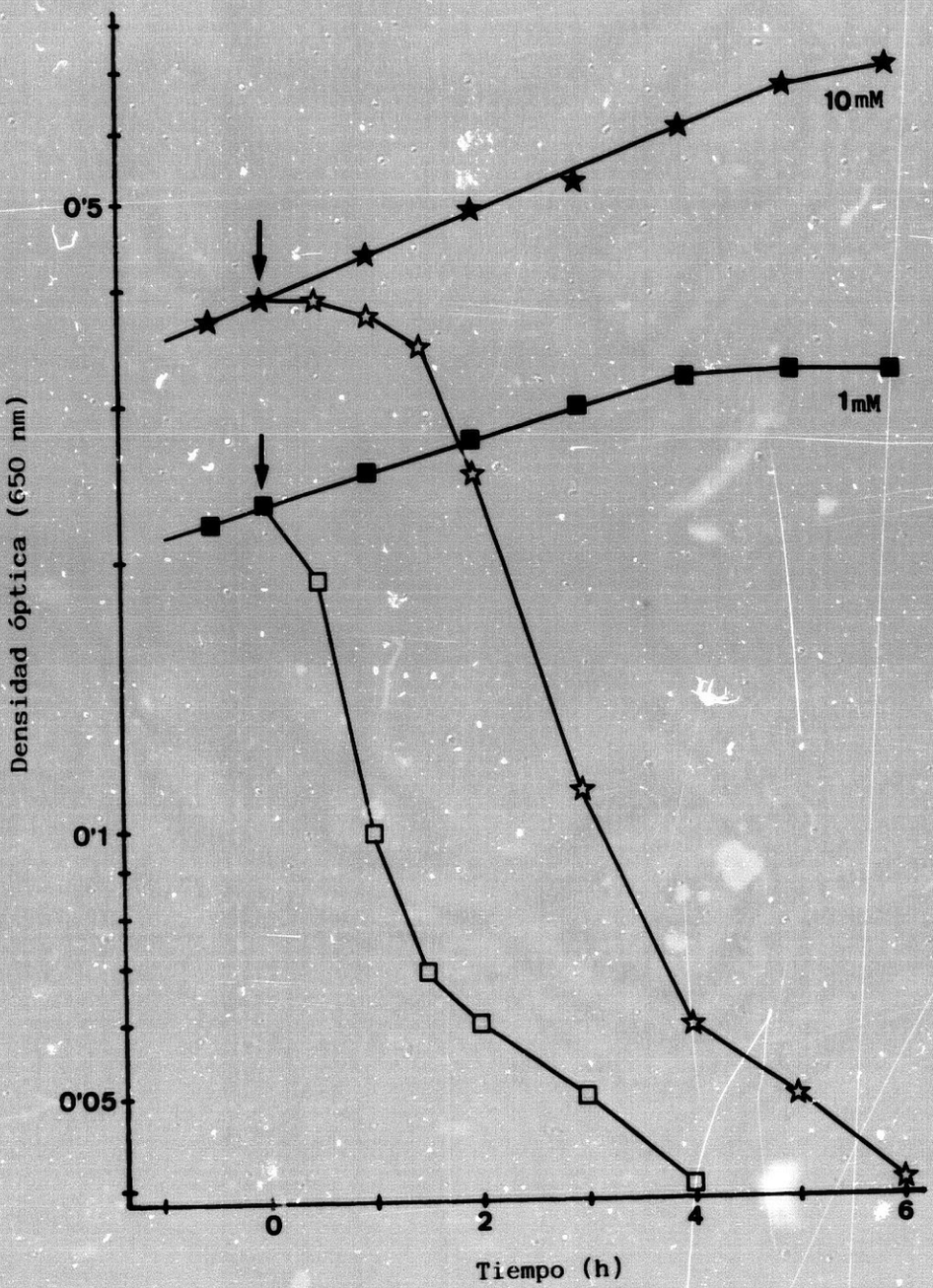


**Figura 13.** Evolución de la densidad óptica (650 nm) de cultivos de *M. coralloides* D sobre medios con ortofosfato 1 y 10 mM añadidos de 10 u/ml de antibiótico. Los símbolos llenos corresponden a los cultivos control; los vacios a los adicionados de antibiótico. La flecha indica el momento de la adición del antibiótico.

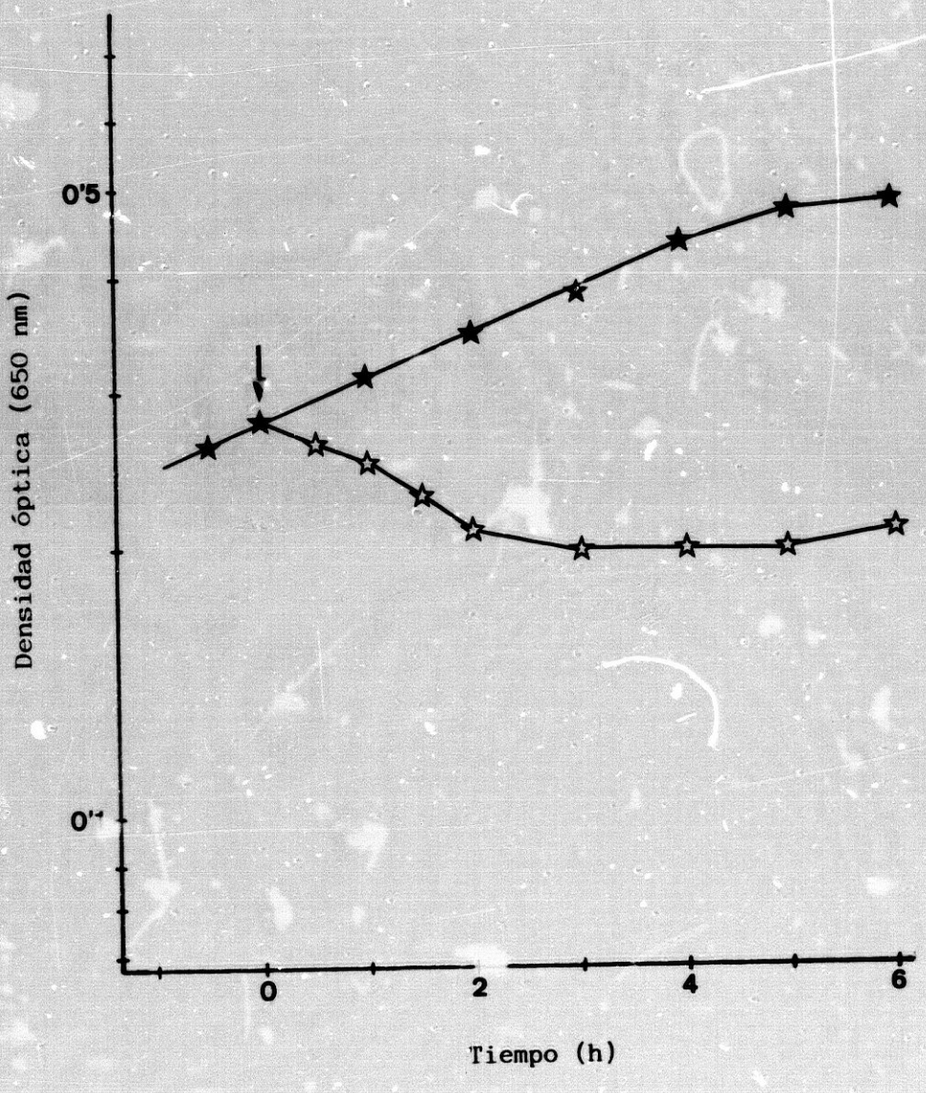


**Figura 14.** Evolución de la densidad óptica (650 nm) de cultivos de *M. coralloides* D sobre medios con ortofosfato 20 mM añadidos de 10 u/ml de antibiótico. Los símbolos llenos corresponden al cultivo control; los vacíos al adicionado de antibiótico. La flecha indica el momento de la adición del antibiótico.

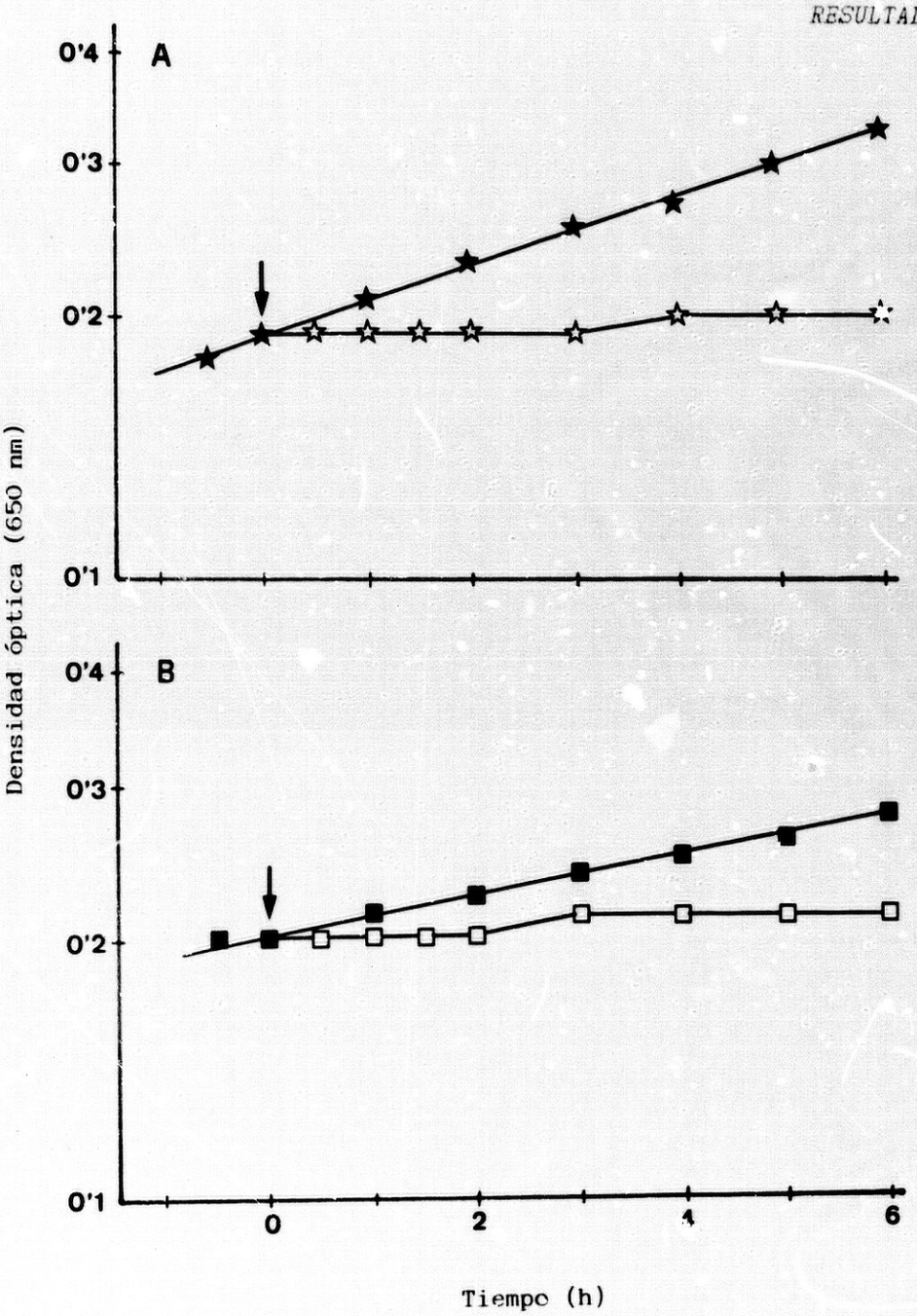


Figura 15. Evolución de la densidad óptica (650 nm) de cultivos de *M. coralloides* D sobre medios con ortofosfato 30 mM (A) y 40 mM (B), añadidos de 10 u/ml de antibiótico. Los símbolos llenos corresponden a los cultivos control; los vacíos a los adicionados de antibiótico. Las flechas indican el momento de la adición del antibiótico.

### 5.1.4. Determinación de la concentracion crítica de antibiótico desencadenante de la lisis y aglutinación de células de *M. coralloides* D en crecimiento.

La producción por *M. coralloides* D de un antibiótico con efecto autocida solamente es concebible si éste necesita alcanzar en el medio una concentración crítica para desencadenar la lisis. Al objeto de determinar dicha concentración se llevaron a cabo una serie de experiencias en las que se comprobó la evolución de la densidad óptica de cultivos de *M. coralloides* D, en medios con ortofosfato 10 mM, añadidos de 2, 4, 6, 8 y 10 u/ml de antibiótico. Con posterioridad se repitió la experiencia con concentraciones de 6, 7 y 8 u/ml de antibiótico.

Al objeto de evitar la interferencia del antibiótico producido en los cultivos objeto de ensayo, se partió de un cultivo de 48 horas de *M. coralloides* D sobre medio CT que fue centrifugado; las células se resuspendieron en un volumen igual de medio fresco precalentado y esta suspensión, distribuida en lotes adecuados, fue la que se empleó en las experiencias citadas.

Los resultados se exponen en las tablas 23 y 24 y la figuras 16 y 17, e indican que la lisis tiene lugar a partir de una concentración en el medio de 7 u/ml de antibiótico. Por el contrario, el fenómeno de aglutinación se observa a partir de concentraciones más bajas (4-5 u/ml).

**Tabla 23.** Evolución de la densidad óptica de cultivos de *M. coralloides* D, en medios con ortofosfato 10 mM, en presencia de diversas concentraciones de antibiótico.

| Tiempo** (h) | Antibiótico añadido (u/ml) 0 | 2 | 4 | 6 | 8 | 10 |
|---|---|---|---|---|---|---|
| -0'5 | 0'38 | 0'38 | 0'38 | 0'38 | 0'38 | 0'38 |
| 0'0 | 0'40 | 0'40 | 0'40 | 0'40 | 0'40 | 0'40 |
| 0'5 | . | 0'41 | 0'40 | 0'39* | 0'38* | 0'38* |
| 1'0 | 0'44 | 0'42 | 0'40 | 0'38* | 0'37* | 0'37* |
| 1'5 | . | 0'44 | 0'41 | 0'37* | 0'35* | 0'34* |
| 2'0 | 0'50 | 0'46 | 0'42* | 0'35* | 0'32* | 0'26* |
| 3'0 | 0'55 | 0'51 | 0'44* | 0'35* | 0'20* | 0'12* |
| 4'0 | 0'62 | 0'57 | 0'46* | 0'35* | 0'10* | 0'07* |
| 5'0 | 0'67 | 0'62 | 0'51* | 0'35* | 0'06* | 0'05* |
| 6'0 | 0'7. | 0'66 | 0'56* | 0'37* | 0'05* | 0'04* |

*: Células aglutinadas.

**: El tiempo 0 corresponde al momento de adición del antibiótico.

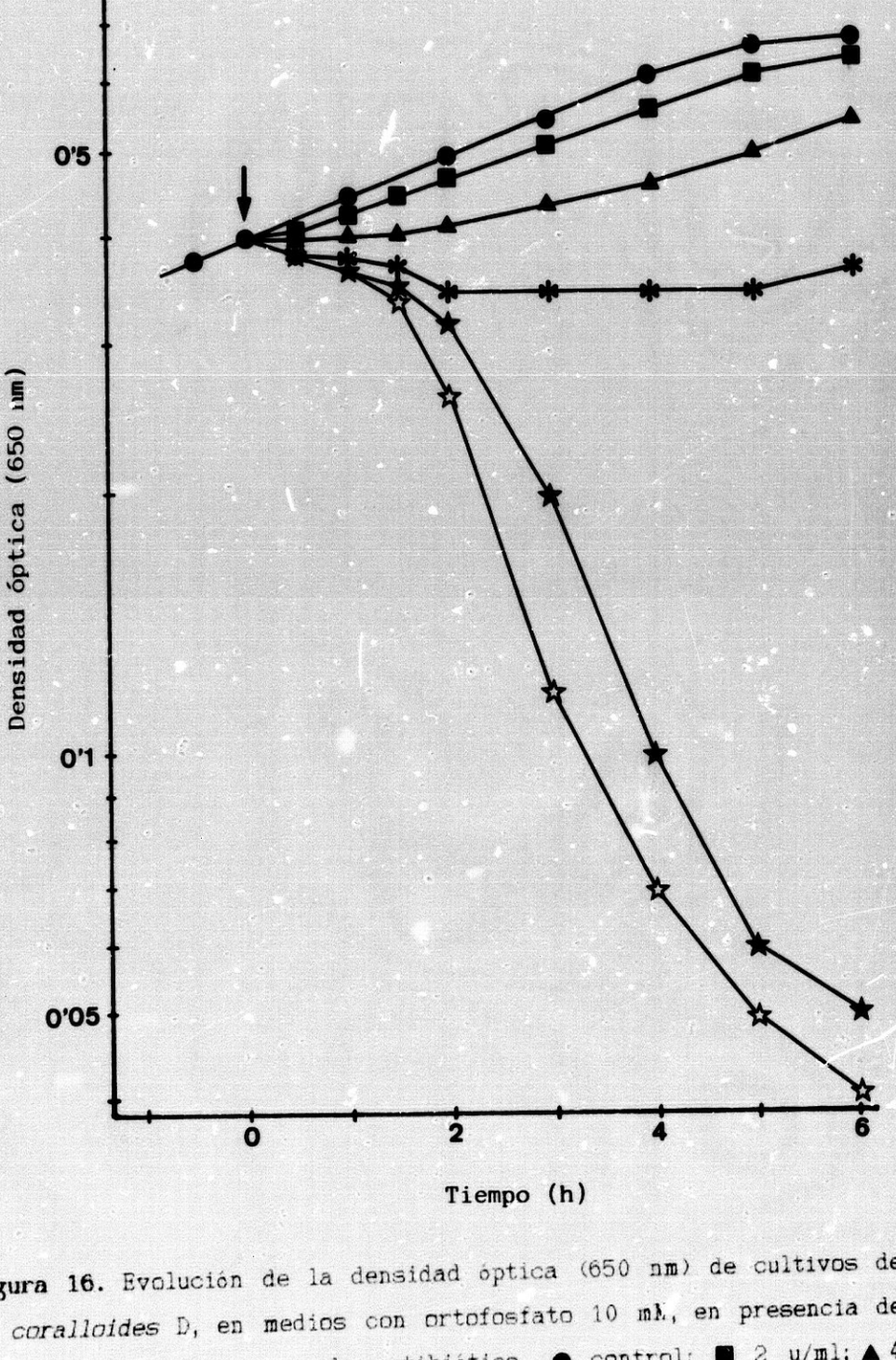


**Figura 16.** Evolución de la densidad óptica (650 nm) de cultivos de *M. coralloides* D, en medios con ortofosfato 10 mM, en presencia de diversas concentraciones de antibiótico. ● control; ■ 2 u/ml; ▲ 4 u/ml; ✱ 6 u/mnl; ★ 8 u/ml; ☆ 10 u/ml. La flecha indica el momento de la adición del antibiótico.

**Tabla 24.** Evolución de la densidad óptica (650 nm) de cultivos de ***M. coralloides*** D, en medios con ortofosfato 10 **mM**, en presencia de diversas concentraciones de antibiótico.

| Tiempo* | Antibiótico añadido (u/ml) | | | |
|---|---|---|---|---|
| (h) | 0 | 6 | 7 | 8 |
| -0'5 | 0'22 | 0'22 | 0'22 | 0'22 |
| 0'0 | 0'24 | 0'24 | 0'24 | 0'24 |
| 0'5 | . | 0'24 | 0'24 | 0'23 |
| 1'0 | 0'27 | 0'24 | 0'23 | 0'22 |
| 1'5 | . | 0'23 | 0'21 | 0'20 |
| 2'0 | 0'32 | 0'22 | 0'19 | 0'16 |
| 3'0 | 0'36 | 0'22 | 0'15 | 0'08 |
| 4'0 | 0'41 | 0'22 | 0'09 | 0'05 |
| 5'0 | 0'48 | 0'23 | 0'06 | 0'03 |
| 6'0 | 0'55 | 0'24 | 0'05 | . |

*: El tiempo 0 corresponde al momento de adición del antibiótico.

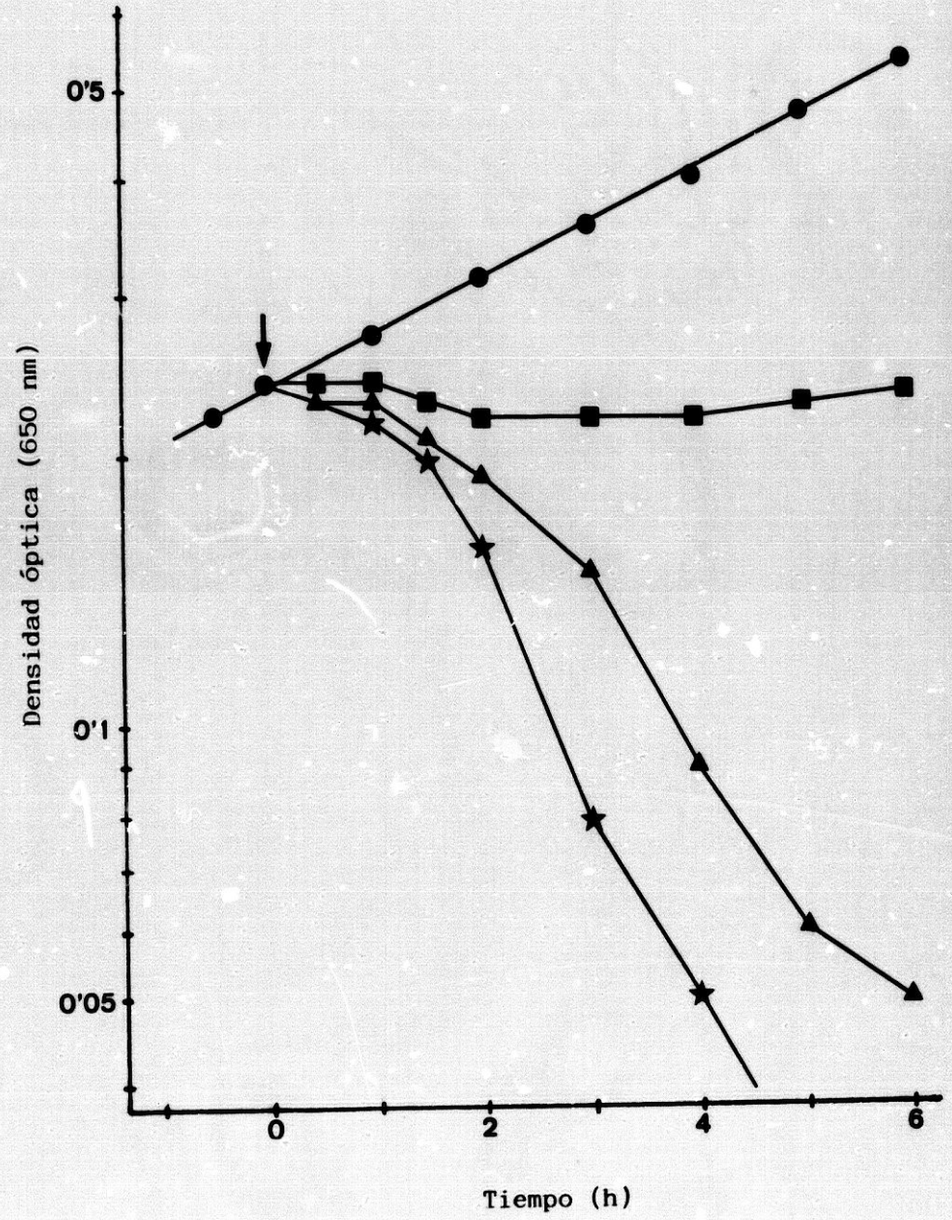


**Figura 17.** Evolución de la densidad óptica (650 nm) de cultivos de *M. coralloides* D, en medios con ortofosfato 10 mM, en presencia de diversas concentraciones de antibiótico. ● control; ■ 6 u/ml; ▲ 7 u/ml; ★ 8 u/ml. La flecha indica el momento de la adición del antibiótico.

## 5.2. Efecto del antibiótico sobre *M. xanthus*.

Al objeto de comprobar si el efecto del antibiótico sobre *M. coralloides* es especifico para éste o su acción se extiende a otras mixobacterias, se comprobó su efecto sobre cultivos de *M. xanthus* en crecimiento y sobre células en reposo de la citada bacteria.

### 5.2.1. Efecto del antibiótico sobre *M. xanthus* en crecimiento.

Un cultivo de *M. xanthus* (DK-101) en crecimiento exponencial sobre medio CT se dividió en dos lotes y, tras 30 minutos de incubación adicional a 30º en agitación continua, se añadió a uno de ellos 10 u/ml del antibiótico. Los dos cultivos se incubaron en iguales condiciones durante 24 horas más, determinándose la densidad óptica de los mismos a intervalos regulares de tiempo.

Los resultados se exponen en la tabla 25 y la figura 18 e indican que el antibiótico, a la concentración ensayada, detiene el crecimiento de *M. xanthus* y origina una lisis parcial del cultivo.

Igualmente fue observado que la adición del antibiótico provoca una aglutinación de las células de *M. xanthus*, de tal forma que éstas, en ausencia de agitación, sedimentan en forma de grandes flóculos que no se deshacen por agitación ulterior, quedando el medio transparente. Este fenómeno es especialmente patente entre las 2 y 4 horas después de la adición del antibiótico; con posterioridad a este tiempo la floculación es solamente parcial.

La observación microscópica de los cultivos añadidos de antibiótico demostró que éste no induce la formación de mixósporas, aunque sí se observaron formas más cortas que las usuales.

**Tabla 24.** Evolución de la densidad óptica (650 nm) de cultivos de *M. xanthus* añadidos de antibiótico.

| Tiempo* (h) | Antibiótico añadido (u/ml) 0 | 10 |
|---|---|---|
| -1 | 0'29 | 0'29 |
| 0 | 0'31 | 0'31 |
| 1 | 0'33 | 0'23 |
| 2 | 0'36 | 0'22 |
| 3 | 0'39 | 0'21 |
| 4 | 0'42 | 0'21 |
| 7 | 0'52 | 0'20 |
| 8 | 0'56 | 0'20 |
| 24 | 1'11 | 0'17 |

*: El tiempo 0 corresponde al momento de adición del antibiótico.

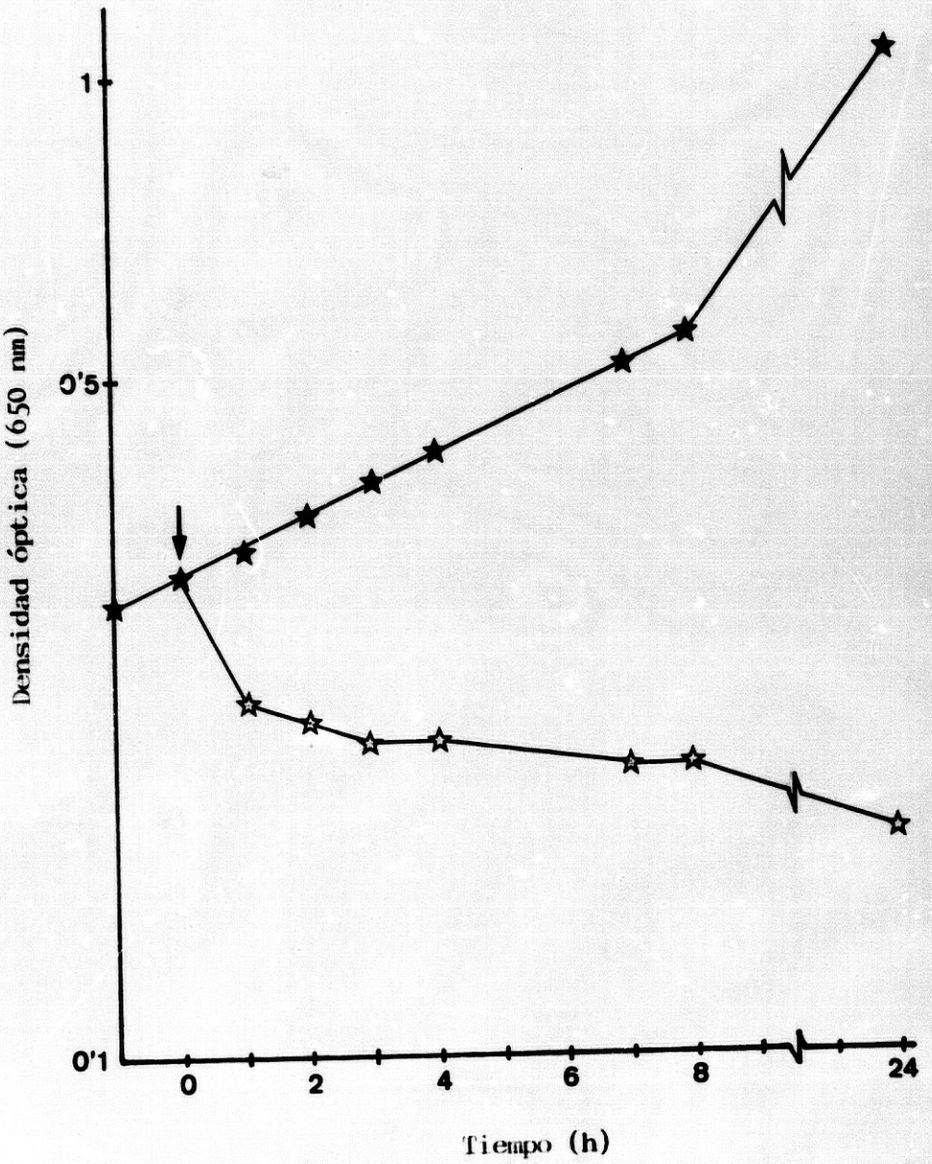


**Figura 18.** Evolución de la densidad óptica (650 nm) de cultivos de *M. xanthus* añadidos de antibiótico (10 u/ml). Los símbolos llenos corresponden al cultivo control; los vacios al adicionado de antibiótico. La flecha indica el momento de la adición del antibiótico.

### 5.2.2. Efecto del antibiótico sobre la viabilidad de células de *M. xanthus* en crecimiento.

Al igual que en el caso anterior, el *M. xanthus* (DK-101) fue cultivado en medio CT y cuando se alcanzó una densidad óptica a 650 nm de 0'3, equivalente aproximadamente a una concentración de células de $4.10^7$/ml, se adicionó antibiótico hasta una concentración final de 10 u/ml. A intervalos regulares de tiempo se tomaron muestras en las que, después de convenientemente diluídas, se determinó la concentración de células viables por siembra en medio CTA.

Los resultados se muestran en la tabla 25 y la figura 19 e indican que el antibiótico presenta un fuerte poder bactericida sobre el *M. xanthus* en crecimiento.

**Tabla 25.** Efecto del antibiótico (10 u/ml) sobre la viabilidad de células de *M. xanthus* en crecimiento.

| Tiempo (h) | Células viables/ml | |
|---|---|---|
| | Control | + antibiótico |
| 0 | $4'2.10^7$ | $4'2.10^7$ |
| 1 | $4'9.10^7$ | $1'0.10^7$ |
| 2 | $5'8.10^7$ | $2'3.10^6$ |
| 3 | $6'6.10^7$ | $1'4.10^5$ |
| 4 | $7'4..0^7$ | $1'0.10^4$ |
| 6 | $9'9.10^7$ | $6'4.10^1$ |
| 8 | $1'3.10^8$ | 0 |
| 24 | $4'6.10^8$ | 0 |

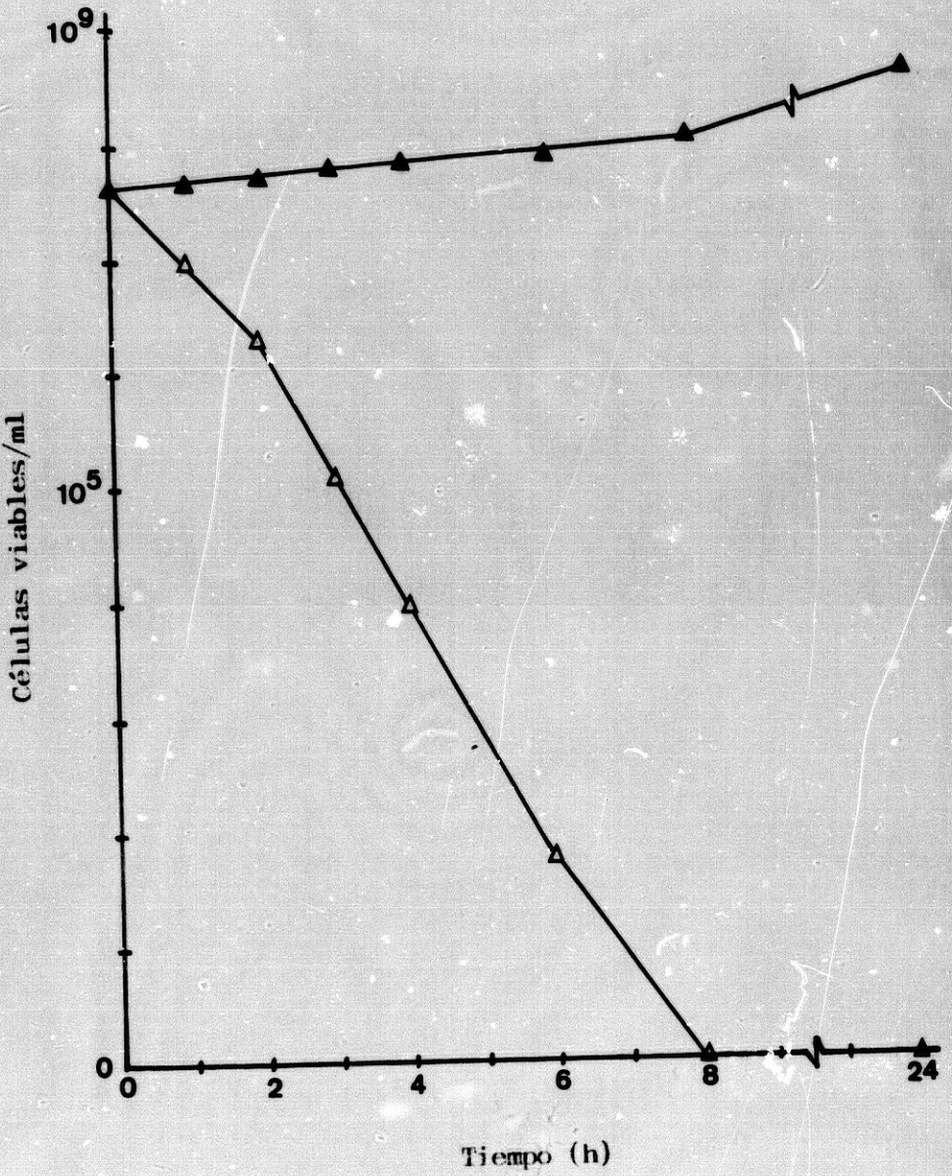


**Figura 19.** Efecto del antibiótico (10 u/ml) sobre la viabilidad de células de *M. xanthus* en crecimiento. Los simbolos llenos corresponden al cultivo control; los vacios al adicionado de antibiótico.

### 5.2.3. Efecto del antibiótico sobre células de *M. xanthus* en reposo.

Un cultivo en fase exponencial de *M. xanthus* (DK-101) sobre medio CT fue centrifugado y las células, lavadas una vez con solución salina, fueron resuspendidas en un volumen mitad del primitivo de tampón de fosfatos 10 mM, pH 7. La suspensión fue dividida en dos lotes que se incubaron a 30º y en agitación continua durante una hora, a fin de que las células completaran los ciclos celulares en que estuviesen engarzadas. Al cabo de dicho tiempo, un lote fue adicionado de 10 u/ml de antibiótico, utilizándose el segundo como control; la evolución de la densidad óptica a 650 nm fue seguida durante 8 horas más. Simultaneamente también se tomaron muestras en las que se determinó el número de células viables por ml.

Los resultados se exponen en las tablas 26 y 27 e indican que el antibiótico no ejerce ningún efecto lítico apreciable sobre las células en reposo de *M. xanthus* ni sobre la viabilidad de las mismas. No se observó tampoco ningún efecto aglutinante a lo largo del tiempo ensayado.

**Tabla 26.** Evolución de la densidad óptica (650 nm) de suspensiones de células de *M. xanthus* en presencia del antibiótico.

| Tiempo* (h) | Antibiótico añadido (u/ml) 0 | 10 |
|---|---|---|
| -1 | 0'64 | 0'64 |
| 0 | 0'60 | 0'61 |
| 1 | 0'60 | 0'60 |
| 2 | 0'60 | 0'60 |
| 3 | 0'58 | 0'60 |
| 4 | 0'58 | 0'59 |
| 6 | 0'55 | 0'56 |
| 8 | 0'54 | 0'54 |

*: El tiempo 0 corresponde al momento de la adición de antibiótico.

**Tabla 27.** Evolución del número de células viables ($.10^7$) de suspensiones de *M. xanthus* adicionadas de antibiótico.

| Tiempo* (h) | Antibiótico añadido (u/ml) 0 | 10 |
|---|---|---|
| -1 | 6'80 | 6'80 |
| 0 | 6'50 | 6'55 |
| 2 | 6'50 | 6'50 |
| 4 | 6'30 | 6'35 |
| 6 | 6'15 | 6'20 |
| 8 | 6'10 | 6'10 |

*: El tiempo 0 corresponde al momento de la adición de antibiótico.

## 6. ACTIVIDAD *IN VIVO* DEL ANTIBIOTICO.

### 6.1. Efecto del antibiótico sobre ratones infectados con *Listeria monocytogenes*.

Para la realización de estas experiencias se tomaron dos lotes de cinco ratones cada uno de la raza BLB/c, que se inocularon por vía intravenosa con $10^7$ células de *L. monocytogenes* procedentes de un cultivo reciente de esta bacteria sobre agar sangre.

Los ratones de uno de los lotes recibieron simultaneamente una dosis de 250 unidades del antibiótico por vía intraperitoneal, equivalente a 680 µg/ratón, es decir, aproximadamente unos 34 µg/g de peso. La administración del antibiótico se repitió a intervalos de 24 horas, hasta la muerte de los animales.

Todos los animales, testigos y administrados de antibiótico, murieron, con intervalos no significativos de horas, a los tres días de la inoculación.

La experiencia se volvió a repetir, empleando en este caso ratones de la raza suiza, aumentando la frecuencia de administración del antibiótico hasta dos inyecciones diarias de 680 µg/ratón. Los resultados, no obstante, fueron los mismos que en el caso anterior.

DISCUSION

Como ha sido expuesto en el Objeto del Trabajo y confirmado en el capítulo de Resultados, la presente memoria puede ser dividida en cuatro partes bien definidas: Producción del antibiótico; extracción y purificación; actividad biológica; y efecto *in vivo*. A la hora, por tanto, de llevar a cabo una discusión de los resultados obtenidos, se hará separadamente sobre cada una de las partes indicadas.

**PRODUCCION**

La producción de antibióticos por *M. coralloides* D ya fue ampliamente estudiada por Arias (1.977) en los aspectos tocantes al pH inicial y temperatura óptima, por lo que en esta memoria se ha considerado superíluo volver a tocar estos puntos, y desde el

principio se han utilizado los parámetros establecidos como óptimos por el autor citado: 28º de temperatura y pH inicial de 6'5.

Por lo que respecta al efecto favorecedor de la adición de glucosa sobre la producción de antibióticos, descrito igualmente por Arias (1.977), se ha confirmado en experiencias preliminares, no incluidas en Resultados, si bien se ha podido comprobar que una concentración de 0'5 por ciento ejerce el mismo efecto que la de 1'0. Es por ello que en los medios de producción de antibióticos se ha usado de manera habitual la concentración de 0'5 por ciento, si bien se ha conservado la de 1% en las experiencias comparativas sobre el efecto de las diversas fuentes de nutrientes y concentraciones de fosfatos sobre la producción de antibióticos.

En relación con la fuente de nutrientes orgánicos, que sirve tanto como fuente de nitrógeno como de carbono, Arias (1.977) sólo experimentó con caseína, casitone (Difco), hidrolizado ácido de caseína y asparagina, encontrando que los mejores rendimientos (alrededor de 5'5 u/ml en cultivos en agitación) se obtenían con casitone a la concentración de 0'5 g por ciento. En esta Memoria se han completado estos estudios con la comprobación del efecto sobre los rendimientos de antibióticos de otros tipos de peptonas y proteínas.

Como ha sido expuesto los mejores resultados, rendimientos de hasta 7'5 u/ml, se obtuvieron cuando se empleó tripticasa (BBL). Por lo que respecta al uso de proteínas baratas (probiones F y L), los resultados fueron decepcionantes, ya que los rendimientos que se obtuvieron fueron, aproximadamente, la mitad que cuando se emplea tripticasa.

En relación con el efecto de la concentración, y tal como Arias (1.977) había encontrado para el casitone, también en el caso de la

tripticasa ha sido encontrado que concentraciones superiores al 0'5 por ciento no incrementan los rendimientos.

Por último, ha sido también estudiado el efecto de la concentración de ión ortofosfato sobre la producción de antibióticos. Estos experimentos se llevaron a cabo en base a que Fernández-Vivas *et al.* (1.983a) habían comprobado que concentraciones elevadas del citado ión inhiben la autolisis de *M. coralloides* D en medios líquidos, por lo que *a priori* cabía pensar que concentraciones elevadas de ortofosfato, al prolongar la fase estacionaria, podrían favorecer la producción de antibióticos. Los resultados obtenidos, sin embargo, han demostrado todo lo contrario, puesto que concentraciones superiores a 20 mM inhiben total o parcialmente la producción.

Este hecho coincide con lo encontrado para otras bacterias productoras de antibióticos, en las que estos metabolitos secundarios se producen óptimamente en condiciones de déficit de fosfatos (Martín y Demain, 1.980). El empleo, sin embargo, de concentraciones de ortosfosfato inferiores a 10 mM se traduce en este caso en una disminución drástica de la producción de antibióticos. Esto no contradice lo anteriormente expuesto, ya que obedece simplemente a que a estas concentraciones de ortosfosfato los cultivos en medios líquidos de *M. coralloides* D sufren una autolisis prematura que interrumpe toda producción de antibióticos.

En el transcurso de estos experimentos también pudo comprobarse que el ión ortofosfato, aún a las concentraciones máximas empleadas, no inhibe la actividad del antibiótico.

A la vista de lo expuesto; y tal como se expone en Material y Métodos, el medio elegido para la producción de antibióticos ha sido el denominado TTG, de la siguiente composición: tripticasa 5 g,

glucosa 5 g y sulfato de magnesio 1 g, por litro de solución 10mM de fosfato potasico, a pH 6'5.

En un intento de aumentar la producción de antibióticos se llevó a cabo una selección de mutantes superproductoras de los mismos. Como ha sido expuesto, se seleccionaron cuatro mutantes (McLm 81, 83, 711 y 817) que en medios sólidos mostraron una gran capacidad de producción de antibióticos. Sorprendentemente, sin embargo, cuando se ensayo la producción de antibioticos por estos mutantes en medios liquidos, se obtuvieron rendimientos iguales o menores a los obtenidos con la raza madre. Al lado de estos resultados se pudo observar que los cultivos de estos mutantes sufrieron la autolisis típica del *M. coralloides* D veinticuatro e incluso cuarenta y ocho horas antes que los de la raza madre.

La interpretación de estos resultados es simple a la luz de lo expuesto en el apartado 5.1 del capitulo anterior que demuestra que el antibiótico producido por *M. coralloides* D actúa sobre la misma bacteria productora, como una señal desencadenante de la autolisis, cuando alcanza en el medio una concentración de 7 u/ml. Sobre esta base, los mutantes superproductores, aunque produzcan antibióticos en mayor cantidad y más rápidamente, lo único que provocan en medios líquidos es que se alcance más rapidamente la concentración crítica con la consiguiente lisis del cultivo y detención de toda producción ulterior de antibiótico. En medios sólidos el antibiótico difunde radial y continuamente a partir de la colonia, por lo que en las proximidades de la misma es difícil que se alcance la concentración crítica desencadenante de la autolisis, mientras que el halo circular en que se alcanzan concentraciones inhibidoras del crecimiento de *S. aureus* es mucho mayor que en el caso de la raza madre.

Como ha sido indicado, el comportamiento en medios líquidos de los mutantes superproductores, unido a los resultados obtenidos en

los experimentos descritos en el apartado 5.1, llevó a plantear la producción de antibióticos en un sistema abierto en que los mismos son drenados continuamente del medio mediante diálisis.

Los experimentos, descritos en el apartado 1.4.1 del capítulo anterior, fracasaron parcialmente, ya que el *M. coralloides*, aún cuando se considera carente de actividad celulolítica, degrado en alguna forma el material de los sacos de diálisis, de manera que al cabo de unos cinco días de incubación la mixobacteria es capaz de atravesarlos y crecer en los líquidos de diálisis.

No obstante, en estos experimentos se puso de manifiesto, tal como se esperaba, que los cultivos sometidos a diálisis no se lisan, prolongándose la fase de crecimiento hasta que se alcanzan densidades celulares cien veces mayores que en cultivos en sistemas cerrados. De otra parte, pudo también comprobarse que la cantidad total de antibióticos producidos fue mucho mayor en este caso que en los cultivos normales.

Otro intento, no descrito en el capítulo de resultados, para drenar del medio los antibióticos a medida que se producen consistió en efectuar los cultivos en presencia de un adsorbente de aquellos, concretamente florisil. Los experimentos constituyeron una fracaso total ya que el florisil, independientemente de que adsorba o no el antibiótico, adsorbe también, al parecer, nutrientes esenciales para el *M. coralloides*, de manera que éste no crece en su presencia.

Es de esperar, no obstante, que cuando se perfeccione un sistema de producción en el que los antibióticos sean drenados continuamente se puedan obtener altos rendimientos en la producción de los mismos mediante el uso de mutantes superproductoras.

Por ultimo, es necesario citar la produccion de antibióticos en cultivos sumergidos, mediante la cual se ha obtenido la totalidad del antibiótico empleado en este trabajo. Las condiciones de temperatura y aireación fueron las determinadas como óptimas por Arias *et al.* (1.979c) y como medio de cultivo se empleó el TTG. Sorprendentemente, las concentraciones máximas de actividad antibiótica obtenidas en esta modalidad de cultivo fueron sólo de unas 5 u/ml, frente a las 7'5 u/ml obtenidas en cultivos en agitación.

No se ha encontrado ninguna explicación razonable a este fenomeno, maxime teniendo en cuenta que las densidades celulares que se obtienen son similares a las que se obtienen en los cultivos sometidos a agitación.

**EXTRACCION Y PURIFICACION.**

La extracción y purificación del antibiótico mayoritario se fundamentó en los siguiente hechos puestos de manifiesto en las experiencias preliminares. 1) los antibióticos son solubles en eter de petroleo o heptano a pH ácido pero no a pH alcalino; 2) los antibióticos son muy solubles en soluciones acuosas a pH por encima de 6'5 e insolubles en las mismas a pH más bajo; 3) los antibióticos son adsorbidos casi totalmente en florisil y eluidos del mismo, en un 60% aproximadamente, mediante extracciones con mezclas acetona-agua a pH alcalino; 4) la sepiolita y bentonita no adsorben significativamente los antibióticos, pero si pigmentos y posiblemente otras sustancias presentes en los sobrenadantes.

De acuerdo con estos hechos y presuponiendo que los componentes minoritarios con actividad antibiótica son eliminados en su gran mayoría en las distintas etapas, se ha desarrollado el esquema de

extracción y purificación del antibiótico mayoritario que se detalla en el apartado 2.2 del capítulo anterior.

A primera vista dicho esquema puede parecer complicado y carente de ventajas sobre los formulados anteriormente por Arias y colaboradores (1.979c), ya que su rendimiento es similar al de aquellos.

Sin embargo, en la práctica este esquema de extracción y purificación presenta dos ventajas fundamentales: una, su carencia de manipulaciones de laboratorio engorrosas; otra, la gran homogeneidad de la preparación final, constituida por una sola especie de molécula orgánica o especies estructuralmente muy parecidas.

Efectivamente, en relación con el primer punto las manipulaciones a realizar se reducen a adsorciones sobre materiales sólidos, eluciones de adsorbatos, filtraciones y extracciones en embudos de decantación de pequeños volúmenes. Sólo en algunos casos, como sucede en la extracción de los extractos cetónicos con eter de petroleo, puede ser necesario acudir a la centrifugación para poder romper la emulsión.

En relación con el segundo punto, los resultados de la cromatografía en papel y en columna parecen indicar que el producto final obtenido es razonablemente homogeneo, ya que solamente aparece una mancha o pico con actividad. Aunque no han sido incluidos en Resultados, los espectros de resonancia magnética nuclear de protones realizados confirman este extremo dada la ausencia de picos de fondo, lo que indica que el producto final es una sola clase de molécula orgánica o una mezcla de moléculas de estructura química muy similar, en la que predomina mayoritariamente un componente.

## ACTIVIDAD BIOLOGICA.

Por lo que repecta al espectro antibacteriano del antibiótico purificado, las experiencias realizadas permiten concluir que, con excepción de mixobacterias, sólo son sensibles a su acción bacterias Gram-positivas. Protozoos, hongos y eubacterias Gram-negativas no fueron afectadas en su crecimiento por el antibiótico, incluso a concentraciones tan altas como 1'36 µg por disco.

Entre las bacterias Gram-positivas, las más sensibles fueron las pertenecientes a la familia *Micrococcaceae* (*Staphylococcus aureus* y *Micrococcus luteus*), seguidas por las especies de *Bacillus* y el *Streptococcus faecalis* y, a mayor distancia, por Corynebacterium glutamicus y Listeria monocytognes. Las micobacterias y nocardias ensayadas fueron insensible a su acción.

En relación con las mixobacterias, los ensayos en medios sólidos sobre medio CTA fueron negativos, incluso empleando discos con 1'36 µg de antibiótico. Sin embargo, cuando el efecto del antibiótico sobre *M. xanthus* y *M. coralloides* se ensayó en medios líquidos a concentraciones adecuadas, pudo comprobarse que las dos bacterias son sensibles a su acción, fuertemente bactericida. Posiblemente, lo que ocurre en medios sólidos es que al difundir el antibiótico a partir del disco no se alcanzan las concentraciones críticas necesarias para el efecto bactericida.

Dentro de las bacterias Gram-positivas, la más sensible fue, como queda expuesto, el *S. aureus*; es por ello que a la hora de investigar la forma de actuar del antibiótico y su mecanismo de acción se utilizó la citada bacteria.

De las experiencia realizadas se deduce que el antibiótico detiene de manera inmediata (una hora) el crecimiento de los cultivos de

*S. aureus*. Esta detención del crecimiento no fue acompañada de lisis celular significativa, al menos en el término de ocho horas que fue la duración de los experimentos.

Los ensayos sobre viabilidad del *S. aureus* sometido a la acción del antibiótico han demostrado que la detención del crecimiento va acompañada desde el primer momento por una disminución exponencial del número de celulas viables. Es decir, el antibiótico no solamente detiene el crecimiento de *S. aureus* sino que también presenta un fuerte efecto bactericida.

Ahora bien, dicho efecto bactericida solamente es ejercido sobre células en crecimiento. La adición del antibiótico a suspensiones de *S. aureus* en reposo o a cultivos de la citada bacteria adicionados de un antibiótico exclusivamente bacteriostático (cloranfenicol) no tiene efecto apreciable sobre la viabilidad de la bacteria.

Arias (1.977) encontró además que los antibióticos de *M. coralloides* D originaban una lisis exponencial del *S. aureus* cuando el ensayo se llevaba a cabo en medios más hipotónicos que los normales, por lo que llegó a la conclusión de que los antibióticos interferían con la biosintesis del peptidoglucano de la pared celular de las bacterias sensibles y que el efecto bactericida era consecuencia de la lisis de los protoplastos resultantes, como consecuencia del desequilibrio osmótico existente entre el exterior e interior de las células.

Como ha sido expuesto, no ha sido posible confirmar este extremo, ya que la adición del antibiótico a *S. aureus* en crecimiento sobre medio BHI diluido 1/5 no provocó lisis apreciable, sino la ya conocida detención inmediata del crecimiento. El fundamento de la discrepancia entre estos resultados y los obtenidos por Arias (1.977) no se conoce; Unicamente cabe suponer que, dado que el

proceso de extracción y purificación empleado por este autor fue distinto del empleado en este trabajo, el antibiótico mayoritario estuviese acompañado por otros responsables de la lisis, que en el presente caso habrían sido eliminados en el proceso de purificación.

*A priori*, por tanto, y teniendo en cuenta lo inmediato de la detención del crecimiento, la hipótesis de que el efecto primario del antibiótico radique en la inhibición de la síntesis del peptidoglucano no parece demasiado probable.

Efectivamente, ello fue confirmado por las experiencias en las que se comprobó el efecto del antibiótico sobre la incorporación de diferentes precursores radioactivos por *S. aureus*.

De los cinco tipos de experimentos realizados se derivan los siguientes hechos:

La incorporación de uridina tritiada, lo que equivale a decir la síntesis de ARNs, es interrumpida instantaneamente por la acción de 5 u/ml del antibiótico, de tal modo que a los seis minutos de la adición de éste la inhibición es prácticamente total.

La incorporación de leucina tritiada, es decir la síntesis de proteínas, es también interrumpida por la adición del antibiótico. En este caso, sin embargo, la inhibición no se hace total hasta los 17 minutos.

La incorporación de timidina tritiada, es decir la síntesis de ADN, también es afectada por la adición del antibiótico, pero en este caso la inhibición de dicha síntesis solamente se empieza a detectar a partir de los 17 minutos.

Finalmnte, la incorporacion de N-acetilglucosamina marcada con $^{14}C$ en las fracciones insolubles en acido tricloroacético 5% en frio y en caliente, indica que tanto la biosintesis de los componentes globales de la pared celular (ácidos teicoicos y peptidoglucano) como la de peptidoglucano es inhibida sólo parcialmente por la adicion del antibiótico durante el transcurso del experimento y que dicha inhibición empieza a ser significativa sólo a partir de los 17 minutos.

Los resultados descritos sugieren que la acción primaria del antibiótico consiste en una inhibición de de la síntesis de ARNs, lo que se traduce en la subsiguiente detención de la síntesis de proteinas que a su vez provoca a más largo plazo la detención de la síntesis del ADN e interfiere con la biosintesis de los componentes de la pared celular.

Lo expuesto coincide con lo encontrado por Reichenbach y su grupo (Irschik *et al.*, 1.983b; 1.985 y 1.987) para las mixopironinas, coralopironinas y sorangicinas, antibióticos que, de acuerdo con los autores citados, se comportan como fuertes inhibidores de la ARN polimerasa bacteriana.

Ahora bien, no deja de ser sorprendente que, dado este mecanismo de acción, el antibiótico se comporte como bactericida en lugar de como bacteriostático. Descartada la hipótesis apuntada por Arias (1.977) del estallido osmótico para explicar este efecto, ya que la inhibición de la síntesis de los componentes de la pared celular es tardía y solamente parcial, sólo cabe pensar que el bloqueo de la síntesis de ARN y proteinas que origina el antibiótico es irreversible y lleva, por tanto, a la muerte de las bacterias sensibles a su acción.

Finalmente, en relación con la actividad biológica del antibiótico, merece especial atención su efecto bactericida sobre mixobacterias y en especial sobre la propia bacteria productora.

Efectivamente, el efecto del antibiótico sobre el *M. coralloides* D, cuando se añade a concentraciones adecuadas, es espectacular, ya que provoca una detención inmediata del crecimiento, una aglutinación también inmediata y una lisis, patente ya a los 30 minutos de la adición del antibiótico, que se hace exponencial a las dos horas.

La síntesis suicida de una sustancia soluble que mata a la propia bacteria que la produce no tiene precedentes dentro de las mixobacterias. Es cierto que el grupo de Rosenberg (Varon *et al.*, 1.984 y 1.986) ha puesto de manifiesto en *M. xanthus* sustancias capaces de matar y lisar a esta bacteria, pero estas autocidas, como fueron denominadas por los autores citados, son ácidos grasos monoinsaturados, componentes estructurales de las células que no se liberan sino cuando la bacteria se lisa.

Como era de esperar el antibiótico no actúa a bajas concentraciones sobre el *M. coralloides*, ya que de lo contrario esta bacteria no tendría vida libre, sino que necesita acumularse en el medio hasta alcanzar concentraciones de 7 u/ml, equivalentes a 19 µg/ml, antes de ejercer su efecto lítico.

Esto, de una parte, permite, como ha sido visto, la producción y beneficio del antibiótico, pero, de otra, impide que en sistemas cerrados la producción pueda incrementarse por encima del límite señalado. Esto explica, como ha sido ya comentado, el fracaso de los intentos de mejorar la producción mediante el empleo de mutantes superproductoras.

Cualquier intento, por tanto, de incrementar la producción de antibiótico está destinada al fracaso a menos que aquél sea drenado a medida que se produzce, es decir a menos que se empleen sistemas abiertos.

Como ha sido comentado en la Introducción, la autolisis exponencial que lleva a la muerte de todas las células es típica del ciclo vegetativo de *M. coralloides* (Fernández-Vivas *et al.*, 1.983a); autolisis que se desencadena terminada la fase de crecimiento exponencial, tras una corta fase estacionaria. De cuerdo con Arias (1.977) y la experiencia acumulada a lo largo de esta Memoria, éste es el momento en que se alcanza la máxima concentración de antibiótico. La conclusión, pues, es obvia: el antibiótico constituye la señal desencadenante de la autolisis de los cultivos dispersos de *M. coralloides*, cuando alcanza la concentración crítica de 19 µg/ml. Ello coincide con lo propuesto en 1.983 por Arias y colaboradores, en el sentido de la existencia de un factor soluble, activador de la autolisis, que sería producido por la propia bacteria.

Como era de esperar, las concentraciones elevadas de ortofosfatos que inhiben la autolisis de los cultivos de *M. coralloides* (Fernández-Vivas *et al.*, 1.983a) inhiben también el desencadenamiento de la misma por el antibótico.

En cuanto al mecanismo por el que el antibiótico desencadena la citada autolisis, ha sido encontrado previamente (Fernández-Vivas *et al.*, 1.985) que los antibióticos que inhiben la síntesis de ARN o de proteínas desencadenan rápidamente el proceso de autolisis. Entonces, dado el mecanismo de acción que ha sido establecido para el antibiótico, su efecto autolítico sería una consecuencia de la detención de la síntesis de ARN y proteínas. Ahora bien, puesto que el antibiótico sólo ejerce este efecto sobre bacterias sensibles a su acción en crecimiento, era de esperar que fuera ineficaz sobre

suspensiones de células en reposo de *M. coralloides*, cosa que efectivamente ha sido encontrada.

La causa de que el efecto desencadenante de la autolisis no se ponga de manifiesto hasta que no se alcanzan concentraciones de antibiótico de 19 µg/ml cabe atribuirla bien a una cuestión de permeabilidad, condicionada por la membrana externa de la mixobacteria, bien a la necesidad de que se ocupen un determindo número de receptores para el antibiótico presentes en la superficie de la bacteria.

¿Que significación biológica puede atribuirse a la producción suicida del antibiótico por el *M. coralloides*?

Conviene recordar que el cultivo disperso de *M. coralloides* y por tanto el ciclo vegetativo que termina con la autolisis es artificial, puesto que las estirpes silvestres no crecen dispersas en medios líquidos y sobre medios sólidos llevan a cabo el ciclo de desarrollo que finaliza con la producción de cuerpos fructificantes y mixósporas. Pues bien, como ha sido descrito en la Introducción, durante este ciclo de desarrollo hasta el 80% de las células que se agregan se autolisan para hacer posible la diferenciación de las restantes (Wireman y Dworkin, 1.975 y 1.977). Es muy sugestivo, por tanto, suponer que el antibiótico sea también la señal que desencadena la citada autolisis en el ciclo de desarrollo, cuando la agregación de las células permite un incremento local en su concentración y que, por consiguiente, resulte imprescindible para que el ciclo de desarrollo se complete.

Esta hipótesis se refuerza si consideramos el otro efecto que el antibiótico ejerce sobre el *M. coralloides* D: la aglutinación de sus células. Este efecto es independiente del de inducción de la autolisis, se da a concentraciones menores y se produce también en

el caso de suspensiones de células en reposo. Pues bien, no hay que olvidar que precisamente el primer paso en el ciclo de desarrollo lo constituye la agregación de las células vegetativas y que dicha agregación está estimulada, al menos en parte, por señales químicas producidas por la propia bacteria. Resulta, pues, también muy susgestivo admitir que el antibiótico, a una concentración más baja que la necesaria para desencadenar la autolisis, constituye una de las señales de agregación del *M. coralloides*. Subsiguientemente, y como consecuencia de esta agregación, la concentración local de antibiótico aumentaría, con lo que se pasaría ya a la etapa de lisis.

Finalmente, ha sido también ensayado el efecto del antibiótico sobre otra mixobacteria, *M. xanthus*, al objeto de comprobar si los efectos antes citados son específicos para *M. coralloides* o se extienden a otras mixobacterias

Los resultados obtenidos indican que el *M. xanthus* es sensible a la acción del antibiótico, aunque se comporta de manera distinta que el *M. coralloides*. Efectivamente, el antibiótico, si bien detiene inmediatamente el crecimiento de *M. xanthus* y origina una muerte exponencial del mismo, no tiene el efecto desencadenante de la autolisis que ejerce en el caso de *M. coralloides*, ya que la lisis que se aprecia en el caso de *M. xanthus* es la de esperar en un cultivo que ha sido muerto por un agente bactericida. En este aspecto el efecto del antibiótico sobre el *M. xanthus* es similar al ejercido sobre *S. aureus*.

En relación con el efecto aglutinante, éste se da también en el caso de *M.xanthus*, si bien difiere en algunos aspectos, ya que en este caso el efecto es reversible y sólo se da en forma total entre las dos y cuatro horas después de la adición del antibiótico; de otra parte, en la aglutinación se forman grandes flóculos, distintos de los pequeños grumos formados en el caso de *M. coralloides*.

De acuerdo con lo expuesto se llega a la conclusión de que por lo que respecta al desencadenamiento de la autolisis el antibiótico constituye una señal especifica para *M. coralloides*. Por lo que respecta al efecto aglutinante, éste es máximo e irreversible para *M. coralloides* pero se ejerce también sobre *M. xanthus*. Ahora bien, aún cuando la señal sea especifica para *M. coralloides*, dada la proximidad de las dos especies ensayadas, la estructura química de las envolturas externas debe ser bastante similar, por lo que no es de extrañar esta aglutinación cruzada.

**EFECTO *IN VIVO*.**

En 1.977, Arias ensayó la actividad *in vivo* de los antibióticos producidos por *M. coralloides* D. De una parte, pudo comprobar que la administración diaria a ratones por vía intraperitoneal de 500 unidades de antibiótico, durante siete días, no provocó ningún síntoma que indicara alteración o trastornos fisiológicos, por lo que llegó a la conclusión de que los antibióticos eran atóxicos para el ratón. De otra parte, comprobó el efecto producido por la administración de antibióticos sobre la evolución de abcesos provocados en ratones mediante la administración por vía subcutanea de una mezcla de *S. aureus* y alúmina, observando que dicha administración reducía el tamaño de los abcesos, por lo que concluyó que los antibióticos eran activos *in vivo*.

A la hora de estudiar el efecto *in vivo* del antibiótico purificado en este trabajo, se ha considerado superfluo repetir los ensayos de toxicidad, ya que la dosis empleada por Arias que resultó ser atóxica (un total de aproximadamente 10 mg/ratón, equivalente a unos 0'5 mg/g de peso, en el transcurso de una semana) se consideró lo suficientemente elevada como para comprobar dicho extremo.

Si en cambio se ha considerado oportuno repetir la comprobación del efecto bactericida del antibiótico *in vivo*, ya que el método del control de abcesos producidos por *S. aureus* en ratón, empleado por Arias, al no ser de tipo "todo o nada", se presta a interpretaciones subjetivas que pueden hacer dudosos los resultados.

Como ha sido expuesto los resultados obtenidos en este último estudio han sido decepcionantes: el antibiótico, aún a dosis tan altas como 68 µg por gramo de peso y día, no defiende al ratón de la infección producida por la inoculación experimental de *Listeria monocytogenes*.

En principio, por tanto, no ha podido ser confirmada la actividad *in vivo* del antibiótico. Estos resultados, sin embargo, deben tomarse con cierta reserva dado que la sensibilidad de la citada bacteria al antibiótico *in vitro* es escasa. Desgraciadamente no ha sido posible ensayar *in vivo* el efecto del antibiótico sobre la bacteria patógena más sensible a su acción, *S. aureus*, dado que todos los esfuerzos realizados para provocar de manera reproducible infecciones por esta bacteria en los ratones han fracasado. Queda, por tanto, la duda de si con esta bacteria podrán obtenerse resultados positivos que confirmen los obtenidos por Arias.

# CONCLUSIONES

1ª.- Se han determinado las condiciones óptimas en cuanto a nutrientes y modalidad de cultivo para la producción de antibióticos por *M. coralloides* D.

2ª.- Se ha diseñado un esquema de extracción y purificación del antibiótico mayoritario que permite obtener éste con un alto grado de pureza y un rendimiento del 30-31 % sobre la actividad antibiótica total inicial.

3ª.- El antibiótico purificado es activo *in vitro* exclusivamente sobre bacterias Gram-positivas, con exclusión de nocardias y micobacterias, así como sobre las propias mixobacterias.

4ª.- El antibiótico purificado tiene un efecto bactericida sobre las bacterias en crecimiento sensibles a su acción.

5ª.- El efecto bactericida del antibiótico es consecuencia de la inhibición de la síntesis de ARNs y secundariamente de la de proteínas y ADN.

6ª.- El antibiótico, a concentraciones iguales o superiores a los 19 µg/ml, constituye una señal desencadenante de la autolisis de la propia bacteria productora. A concentraciones menores, 10-13 µg/ml, origina la agregación de las células de la citada bacteria.

7ª.- Se considera que la producción de antibiótico por ***M. coralloides*** puede jugar un importante papel en el ciclo de desarrollo de esta bacteria, al intervenir en la regulación de los procesos de agregación y autolisis de la misma.

8ª.- Se considera que esta acción es específica para ***M. coralloides*** y no se extiende a otras mixobacterias.

9ª.- Las experiencias realizadas no han permitido confirmar que el antibiótico posea actividad *in vivo*.

# BIBLIOGRAFIA

**Arias, J.M.** 1.977. "Estudios sobre un antibiótico producido por *Myxococcus coralloides*". Tesis doctoral. Facultad de Ciencias. Universidad de Granada.

**Arias, J.M. & Montoya, E.** 1.978." Dispersed growth and cell lysis in *Myxococcus coralloides*" D. Microbios Letters **5**: 81-84.

**Arias, J.M. & Montoya, E.** 1.982. "Influencia de la luz sobre los ciclos de vida de *Myxococcus coralloides*". Microbiología Española **35**: 13-20.

**Arias, J.M.; Rodriguez, C. & Montoya, E.** 1.979a. "Production and partial characterization of an antibiotic produced by *Myxococcus coralloides*". J. Antibiot. (Tokio) **32**: 205-211.

**Arias, J.M.; Rodriguez, C. & Montoya, E.** 1.979b. "Biological activity of an antibiotic produced by *Myxococcus coralloides*". Microbios **24**: 123-131.

**Arias, J.M.; Almendral, J.M. & Montoya, E.** 1.979c. "Two methods of large-scale extraction of an antibiotic produced by *Myxococcus coralloides*". Microbios **25**: 19-23.

**Arias, J.M.; Fernández-Vivas, A. & Montoya, E.** 1.983. "Evidence for an activating substance related to autolysis in *Myxococcus coralloides* D". Arch. Microbiol. **134**: 164-166.

**Bacon, K. & Rosenberg, E.** 1.967. "Ribonucleic acid synthesis during morphogenesis in *Myxococcus xanthus*". J. Bacteriol. **94**: 1.883-1.889.

**Bacon, K.; Clutter, D.; Kottel, R.H.; Orlowski, M. & White, D.** 1.975. "Carbohydrate accumulation during myxospore formation in *Myxococcus xanthus*". J. Bacteriol. **124**: 1.635-1.636.

**Beebe, J.M.** 1.943. "Studies on the myxobacteria. 3. The utilization of carbohydrates". Iowa State Coll. J. Sci. **17**: 227-240.

**Bretscher, A.P. & Kaiser, D.** 1.978. "Nutrition of *Myxococcus xanthus*, a fruiting myxobacterium". J. Bacteriol. **133**: 763-768.

**Brockman, E.R. & Boyd, W.L.** 1.963. "Myxobacteria from soils of the Alaskan and Canadian artic". J. Bacteriol. **86**: 605-606.

**Brown, N.L.; Buchard, R.P.; Morris, D.V.; Parish, J.H.; Stow, N.D. & Tsopanakis, C.** 1.976. "Phage and defective phages of strains of *Myxococcus*". Arch. Microbiol. **108**: 271-279.

**Buchard, R.P. & Dworkin, M.** 1.966. "Light induced lysis and carotenogenesis in *Myxococcus xanthus*". J. Bacteriol. **91**: 535-545.

**Buchard, A.C.; Buchard, R.P. & Kloetzel, J.A.** 1.977. "Intracellular periodic structures in the gliding bacterium *Myxococcus xanthus*". J. Bacteriol. 132: 666-672.

**Burnham, C.G.; Collart, S.A. & Highison, B.W.** 1.981. "Entrapment and lysis of the Cyanobacterium *Phormidium luridum* by aqueous colonies of *Myxococcus xanthus* PCO2". Arch. Microbiol. **129**: 285-294.

**Campos, J.M. & Zusman, D.R.** 1.985. "Regulation of development in *Myxococcus xanthus*: effect of 3':5' cyclic AMP, ADP y nutrition". Proc. Natl. Acad. Sci. USA 72: 513-522.

**Cumsky, M. & Zusman, D.R.** 1.979. "Myxobacterial hemagglutinin, a development-specific lectin of *Myxococcus xanthus*". Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76: 5.505-5.509.

**Cumsky, M. & Zusman, D.R.** 1.981. "Binding properties of myxobacterial hemagglutinin". J. Bio. Chem. **256**: 12.596-12.599.

**Couche, P.** 1.969. "Morphology and morphogenesis of *Sorangium compositum*". J. Appl. Bacteriol. 32: 24-29.

**Dhundale, A.R.; Furnichi, T.; Inouye, S. & Inouye, M.** 1.985. "Distribution of multicopy single-stranded DNA among myxobacteria and related species". J. Bacteriol. **164**: 914-920.

**Dworkin, M.** 1.962. "Nutritional requeriments for vegetative growth of *Myxococcus xanthus*". J. Bacteriol. **84**: 250-257.

**Dworkin, M.** 1.963. "Nutritional regulation of morphogenesis in *Myxococcus xanthus*". J. Bacteriol. **86**: 67-72.

**Dworkin, M.** 1.969. "Sensitivity of gliding bacteria to actinomycin D". J. Bacteriol. **98**: 851-852.

**Dworkin, M.** 1.972. "The myxobacteria: New direction in studies of procaryotic development". CRC Crit. Rev. Microbiol.: pp. 453-472.

**Dworkin, M.** 1.973. "Cell-cell interaction in the myxobacteria". En "Microbial Differentiation, Soc. Gen. Microbiol. Symp." J.M. Asworth & J.E. Smith, eds. Cambridge Univ. Press. Cambridge. vol. **23**, pp. 125-142.

**Dworkin, M. & Gibson, S.M.** 1.964. "A system for studying microbial morphogenesis: Rapid formation of microcysts in *Myxococcus xanthus*". Science **146**: 243-244.

**Elander, R.P.; Mabe, J.A.; Hamill, R.H. & Gorman, M.** 1.968. "Metabolism of tryptophans by *Pseudomonas aureofaciens*". Appl. Microbiol. **16**: 753-758.

**Fautz, E.; Rosenfelder, G. & Grotjahn, L.** 1.979. "Iso-branched 2- and 3-hydroxy fatty acids as characteritics lipid constituents of some gliding bacteria". J. Bacteriol. **140**: 852-858.

**Fautz, E.; Grotjahn, L. & Reichenbach, H.** 1.981. "2 and 3-hydroxy fatty acids as valuable chemosystematic markers in gliding bacteria". En "The *Flavobacterium - Cytophaga* Group". H. Reichenbach & O.B. Weeks, eds. Verlag Chemie. Weinheim. pp. 127-133.

**Fernández-Vivas, A.** 1.983. "Aportaciones al estudio de la autolisis en *Myxococcus coralloides* D". Tesis Doctoral. Universidad de Granada.

**Fernández-Vivas, A.; Arias, J.M. & Montoya, E.** 1.983a. "Autolysis in *Myxococcus coralloides* D". FEMS Microbiol. Letters **20**: 97-101.

**Fernández-Vivas, A.; Arias, J.M. & Montoya, E.** 1.983b. "Detection of guanosine 5'-diphosphate-3'-diphosphate in *Myxococcus coralloides* D vegetative cells". FEMS Microbiol. Letters **20**: 17-22.

**Fernández-Vivas, A.; Arias, J.M. & Montoya, E.** 1.985. "Lysis induced by uncoupling agents in *Myxococcus coralloides* D". FEMS Microbiol. Letters **27**: 99-102.

**Filer, D.; Kindler, S.H. & Rosenberg, E.** 1.977. "Myxospore coat synthesis in *Myxococcus xanthus*: Enzymes associated with uridine 5' diphosphate-N-acetylgalactosamine formation during myxopore development". J. Bacteriol. **131**: 745-750.

**Finck, G.** 1.950. "Biologische und stoffwechselphysiologische studien aus Myxococcaceen". Arch. Mikrobiol. **15**: 358-388.

**Fluegel, W.** 1.963. "Fruiting chemotaxis in *Myxococcus fulvus* (Myxobacteria)". Proc. Minn. Acad. Sci. **32**: 120-123.

**Fytlovitch, S.; Nathan, P.D.; Zafriri, D. & Rosenberg, E.** 1.983. "Amino acid precursors of *Myxococcus xanthus* antibiotic TA". J. Antibiot. (Tokio) **36**: 1.525-1.530.

**Gerth, K.; Irschik, H.; Reichenbach, H. & Trowitzsch, W.** 1.980. "Myxothiazol, an antibiotic from *Myxococcus fulvus* (Myxobacterales). I. Cultivation, isolation, physico-chemical and biological properties". J. Antibiot. (Tokio) **33**: 1.474-1.479.

**Gerth, K.; Trowitzsch, W.; Wray, V.; Hofle, G.; Irschik, H. & Reichenbach, H.** 1.982a. "Pyrrolnitrin from *Myxococcus fulvus* (Myxobacterales)". J. Antibiot. (Tokio) **35**: 1.101-1.103.

**Gerth, K.; Irschik, H.; Reichenbach, H. & Trowitzsch, W.** 1.982b. "The myxovirescins, a family of antibiotics from *Myxococcus virescens* (Myxobacterales)". J. Antibiot. (Tokio) **35**: 1.454-1.459.

**Gerth, K.; Jansen, R.; Reifenstahl, G.; Höfle, G.; Irschik, H.; Kunze, B.; Reichenbach, H. & Thierbach, G.** 1.983. "The myxalamids, new antibiotics from *Myxococcus xanthus* (Myxobacterales). I. Production, physico-chemical and biological properties, and mechanism of action". J. Antibiot. (Tokio) **36**: 1.150-1.156.

**Gill, J.S. & Dworkin, M.** 1.986. "Cell surface antigens during submerged development of *Myxococcus xanthus*, examined with monoclonal antibodies". J. Bacteriol. **168**: 505-511.

**Gilmore, D.F. & White, D.** 1.985. "Energy-dependent cell cohesion in myxobacteria". J. Bacteriol. **161**: 113-117.

**Gnosspelius, G.** 1.978a. "Myxobacterial slime and proteolytic activity". Arch. Microbiol. **116**: 51-59.

**Gnosspelius, G.** 1.978b. "Purification and properties of an extracellular protease from *Myxococcus virescens*". J. Bacteriol. **133**: 17-25.

**González, F.; Arias, J.M. & Montoya, E.** 1.987. "Phosphatase activities in the life cycle of *Myxococcus coralloides* D". J. Gen. Microbiol. **133**: 2.327-2.332.

**Hagen, D.C.; Bretscher, A.P. & Kaiser, D.** 1.978. "Synergism between morphogenetic mutants of *Myxococcus xanthus*". Dev. Biol. **64**: 284-296.

**Hanson, C.W. & Dworkin, M.** 1.974. "Intracellular and extracellular nucleotides and related compounds during the development of *Myxococcus xanthus*". J. Bacteriol. **118**: 486-496.

**Harcke, E.; Hüttermann, A. & Kühlwein, H.** 1.971. "Studies on lytic activities of *Chondrococcus coralloides* (Myxobacterales).I. purification and some properties of the bacteriolytic and proteolytic activity". Arch. Microbiol. **77**: 86-95.

**Harcke, E.; Hüttermann, A. & Kühlwein, H.** 1.972. "Studies on lytic activities of *Chondrococcus coralloides* (Myxobacterales).II. Identification of the bacteriolytic enzyme as a muramidase". Arch. Microbiol. 85: 6-12.

**Hart, B.A. & Zahler, S.A.** 1.966. "Lytic enzymes produced by *Myxococcus xanthus*". J. Bacteriol. **92**: 1.632-1.637.

**Haskâ, G.** 1.974. "Extracellular lytic enzymes of *Myxococcus virescens*. IV. Purification and characterization of a D-alanyl-ε-N-lysine endopeptidase". Physiol. Plant. **31**: 252-256.

**Haskâ, G, & Stahl, S.** 1.971. "Variants of *Myxococcus virescens* exhibiting dispersed growth. Growth and production of extracellular enzymes and slime". Physiol. Plant. **24**: 136-142.

**Hirsch, H.J.** 1.977. "Bacteriocins from *Myxococcus fulvus* (Myxobacterales)". Arch. Mikrobiol. **115**: 45-49.

**Hodgkin, J. & Kaiser, D.** 1.977. "Cell-to-cell stimulation of movement in non-motile mutants of *Myxococcus*". Proc. Natl. Acad. Sci. USA **74**: 2.938-2.942.

**Hodgkin, J. & Kaiser, D.** 1.979a. "Genetics of gliding motility in *Myxococcus xanthus* (Myxobacterales): genes controlling movements of single cells". Mol. Gen. Genet. **171**: 167-172.

**Hodgkin, J. & Kaiser, D.** 1.979b. "Genetics of gliding motility in *Myxococcus xanthus* (Myxobacterales): two gene systems control movement". Mol. Gen. Genet. **171**: 177-191.

**Höfle, G.; Kunze, B.; Zorzin, C. & Reichenbach, H.** 1.984. "Stigmatellin A und B - zwei neue Antibiotika aus *Stigmatella aurantiaca* (Myxobacterales)". Liebig Ann. Chem. **1.984**: 1.883-1904.

**Inouye, M.; Inouye, S. & Zusman, D.R.** 1.979a. "Gene expression during development of *Myxococcus xanthus*: Pattern of protein synthesis". Dev. Biol. 68: 579-591.

**Inouye, M.; Inouye, S. & Zusman, D.R.** 1.979b. "Biosynthesis and self-assembly of protein S, a development specific protein of *Myxococcus xanthus*". Proc. Natl. Acad. Sci. USA **76**: 209-213.

**Inouye, S.; Thomas, R. & Inouye, M.** 1.985. "Microtubulin-like organelle from *Myxococcus xanthus*". 12th International Conf. Biol. Myxobacteria. California. p. 50.

**Irschik, H. & Reichenbach, H.** 1.985. "An unusual pattern of carbohydrate utilization in *Corallococcus (Myxococcus) coralloides* (Myxobacterales)". Arch. Microbiol. **142**: 40-44.

**Irschik, H.; Gerth, K.; Kemmer, T.; Steinmetz, H. & Reichenbach, H.** 1.983a. "The myxovalargins, new peptide antibiotics from *Myxococcus fulvus* (Myxobacterales)". J. Antibiot. (Tokio) **36**: 6-12.

**Irschik, H.; Gerth, K.; Höfle, G.; Kohl, W. & Reichenbach, H.** 1.983b. "The myxopyronins, new inhibitor of bacterial RNA synthesis from *Myxococcus fulvus* (Myxobacterales)". J. Antibiot. (Tokio) **36**: 1.651-1.658.

**Irschik, H.; Jansen, R.; Höfle, G.; Gerth, K. & Reichenbach, H.** 1.985. "The corallopyronins, new inhibitors of RNA synthesis from *Myxobacteria*". J. Antibiot. (Tokio) **38**: 145-152.

**Irschik, H.; Jansen, R.; Gerth, K.; Höfle, G. & Reichenbach, H.** 1.987. "The sorangicins, novel and powerful inhibitors of eubaterial RNA polymerase isolated from *Myxobacteria*". J. Antibiot. (Tokio) **40**: 7-13.

**Jackson, R.L. & Wolfe, R.S.** 1.968. "Composition, properties and substrate specificities of myxobacter AL-1 protease". J. Biol. Chem. **243**: 870-888.

**Jahn, E.** 1.915. "*Myxobacteriales.* Krytogamenflora der Mark Brandenburg". V Heft. p. 187-206.

**Jahn, E.** 1.924. "Beiträge zur Botanischen Protistologie. I. Die Polyangiden". Gebr. Borntraeger. Leipzig. p. 107.

**Jansen, R.; Reifenstahl, G.; Gerth, K.; Reichenbach, H. & Höfle, G.** 1.983. "Myxalamide A, B, C, und D, eine Gruppe homologer Antibiotika aus *Myxococcus xanthus* Mx x12 (Myxobacterales)". Liebig Ann. Chem. 1.983: 1.081-1.095.

**Jansen, R.; Sheldrick, W.S. & Höfle, G.** 1.984. "Die absolute Konfiguration der Myxalamida A und B". Liebig Ann. Chem. **1.984**: 78-84.

**Jurasek, L. & Whitaker, D.R.** 1.965. "Lytic enzymes of *Sorangium* sp. A comparison of some physical properties of the a y b lytic proteases". Can. J. Microbiol. **43**: 1.955-1.960.

**Kaiser, D.** 1.979. "Social gliding is correlated with the presence of pili in *Myxococcus xanthus*". Proc. Natl. Acad. Sci. USA **74**: 5.952-5.956.

**Kaiser, D. & Crosby, C.** 1.983. "Cell movement and its coordination in swarms of *Myxococcus xanthus*". Cell Motility **3**: 227-245.

**Kaiser, D.; Manoil, C. & Dworkin, M.** 1.979. "Myxobacteria : cell interactions, genetics and development". Annu. Rev. Microbiol. **33**: 595-639.

**Katto, H.** 1.955. "Notes on myxobacteria". Ecol. Rev. **14**: 25-28

**Katz, W. & Strominger, J.L.** 1.967. "Structure of the cell wall of *M. lysodeikticus*. II. Study of the structure of the peptides produced after lysis with the Myxobacterium enzyme". Biochemistry **6**: 930-937.

**Keller, K.H.; Grady, M. & Dworkin, M.** 1.983. "Surface tension gradients: Feasible model for gliding motility in *Myxococcus xanthus*". J. Bacteriol. **155**: 1.358-1.366.

**Kletter, B. & Henis, Y.** 1.963. "Comparative studies on the growth of myxobacteria on bacterial suspensions". Can. J. Microbiol. **9**: 557-584.

**Kleinig, H.** 1.972. "Membranes from *Myxococcus fulvus* (Myxobacterales) containing carotenoid glucosides. I. Isolation and composition". Biochim. Bioph. Acta **274**: 489-49.

**Kohl, W.; Gloe, A. & Reichenbach, H.** 1.983a. "Steroids from myxobacterium *Nannocystis exedens*". J. Gen. Microbiol. **129**: 1.629-1.635.

**Kohl, W.; Irschik, K.; Reichenbach, H. & Höfle, G.** 1.983b. "Myxopyronin A und B - zwei neue Antibiotika aus *Myxococcus fulvus* Stamm Mx f50". Liebig Ann. Chem. **1.983**: 1.656-1.667.

**Kunze, B.; Höfle, C. & Reichenbach, H.** 1.987. "The auradrins, new quinoline antibiotics from myxobacteria: Production, physico-chemical and biological properties". J. Antibiot. (Tokyo) **40**: 258-265.

**Kunze, B.; Reichenbach, H.; Augustiniak, H. & Höfle, G.** 1.982. "Isolation and identification of althiomycin from *Cystobacter fuscus* (Myxo-bacterales)". J. Antibiot. (Tokio) **35**: 635-636.

**Kunze, B.; Kemmer, T.; Höfle, G. & Reichenbach, H.** 1.984. "Stigmatellin, a new antibiotic from *Stigmatella aurantiaca* (Myxobacterales). I. Production, physico-chemical and biological properties". J. Antibiot. (Tokio) **37**: 454-461.

**Lindegren, C.C.; Nagai, S. & Nagai, H.** 1.958. "Induction of respiratory deficiency by manganese, coper, cobalt and nickel". Nature **182**:446-448.

**Loebeck, M.E. & Klein, H.P.** 1.956. "Substrates for *Myxococcus virescens* with special reference to eubacterial fractions". J. Gen. Microbiol. **14**: 281-289.

**Ludwig, W.; Schleifer, K.H.; Reichenbach, H. & Stackebrandt, E.** 1.983. "A phylogenetic analysis of the myxobacteria *Myxococcus fulvus*, *Stigmatella aurantiaca*, *Cystobacter fuscus*, *Sorangium cellulosum* and *Nannocystis exedens*". Arch. Microbiol. **135**: 58-62.

**MacRae, T.H. & McCurdy, H.D.** 1.976. "The isolation and characterization of gliding motility mutants in *Myxococcus xanthus*". Can. J. Microbiol. **22**: 1.282-1.292.

**Mandel, M. & Leadbetter, E.R.** 1.965. "Deoxyribonucleic acid base composition of myxobacteria". J. Bacteriol. **70**: 1.795-1.796.

**Manoil, C. & Kaiser, D.** 1.980a. "Accumulation of guanosine tetraphosphate and guanosine pentaphosphate in *Myxococcus xanthus* during starvation and myxospore formation". J. Bacteriol. **141**: 297-304.

**Manoil, C. & Kaiser, D.** 1.980b. "Guanosine pentaphosphate and guanosine tetraphosphate accumulation and induction of *Myxococcus xanthus* fruiting body development". J. Bacteriol. **141**: 305-315.

**Manoil, C. & Kaiser, D.** 1.980c. "Purine-containing compounds, including cyclic adenosine 3'5'-monophosphate, induce fruiting of *Myxococcus xanthus* by nutritional imbalance". J. Bacteriol. **141**: 374-377.

**Margalith, P.** 1.962. "Bacteriolytic principles of *Myxococcus fulvus*". Nature **196**: 1.335-1.336.

**Martin, J.F. & Demain, A.L.** 1.980. "Control of antibiotics biosynthesis". Microbiol. Rev. 44: 230-251.

**Martinez-Cañamero, M.M.** 1.986. "Desoxirribonucleasas producidas por *Myxococcus coralloides* D". Memoria de Licenciatura. Facultad de Ciencias. Universidad de Granada.

**Mason, O.J. & Powelson, D.** 1.958. "Lysis of *Myxococcus xanthus*". J. Gen. Microbiol. **19**: 65-70.

**Mayer, H. & Reichenbach, H.** 1.978. "Restriction endonucleases: General survey procedure and survey of gliding bacteria". J. Bacteriol. **136**: 708-713.

**McCurdy, H.D.** 1.969. "Studies on the taxonomy of the Myxobacterales. I. Record of Canadian isolates and survey of methods". Can. J. Microbiol. **15**: 1.453-1.461.

**McCurdy, H.D.** 1.974. *"Myxobacterales"*. En "Bergey's Manual of Determinative Bacteriology". R. Buchanan & N. Gibbons eds. The Williams and Wilkins Co. Baltimore. pp. 76-98.

**McCurdy, H.D. & MacRae, T.H.** 1.974. "Xanthacin. A bacteriocin of *Myxococcus xanthus* fb". Can. J. Microbiol. **20**: 131-135.

**McCurdy, H.D. & Wolf, S.** 1.967. "Deoxyribonucleic acid base composition of fruiting Myxobacterales". Can. J. Microbiol. **13**: 1.707-1.708.

**McVittie, A.; Messik, F. & Zahler, S.A.** 1.962. "Development biology of *Myxococcus*". J. Bacteriol. **84**: 546-551.

**Miyashiro, S.; Yamanaka, S.; Takayama, S. & Shibai, H.** 1.988. "Novel macrocyclic antibiotics: Megovalicins A, B, C, D, G and H. I. Screening of antibiotics-producing myxobacteria and production of megovalicins". J. Antibiot. (Tokyo) **41**: 433-438.

**Mizrahi, A.; Arnan, J.; Miller, G.; Liron, Z.; Mana, M.; Batus, Y & Rosenberg, E.** 1.976. "Scaling-up of process for production of antibiotic of *Myxococcus xanthus* TA". J. Appl. Chem. Biotechnol. **26**: 160-166.

**Morris, D.W. & Parish, J.M.** 1.976. "Restriction in *Myxococcus virescens*". Arch. Mikrobiol. **108**: 227-230.

**Morrison, C.E & Zusman, D.R.** 1.979. "*Myxococcus xanthus* mutants with temperature-sensitive, stage-specific defects: Evidence for independent pathways in development". J. Bacteriol. **140**: 1.036-1.042.

**Muñoz, J.; Arias, J.M. & Montoya, E. 1.984.** "Production and properties of a bacteriocin from *Myxococcus coralloides* D". J. Appl. Bacteriol. **57**: 69-74.

**Nelson, E.C. & Jones, K.M.** 1.970. "Culture isolation of agents of primary meningoencephalitis". J. Parasitol. **56**: 284-289.

**Nicaud, J.M.; Breton, A.; Younes, G. & Guespin-Michel, J.** 1.984. "Mutants of *Myxococcus xanthus* impaired in protein secretion: an approach to study of a secretory mechanism". Appl. Microbiol. Biotechn. **20**: 344-350.

**Nishida, M.; Matsubara, T. & Watanabe, H.** 1.965. "Pyrrolnitrin, a new antifungal antibiotic". J. Antibiot. (Tokio) **18**: 211-219.

**Noren, B.** 1.953a. "Studies on the myxobacteria. II. Bacteriolytic activity". Sven. Botan. Tidskr. **47**: 309-332.

**Noren, B.** 1.953b. "On the production of antibiotics by myxobacteria". Sven. Botan. Tidskr. **49**: 282-294.

**Noren, B.** 1.955. "Studies on myxobacteria. III. Organic Factors in nutrition". Särtryck Bot. Notiser **108**: 81-134.

**Noren, B. & Raper, K.B.** 1.962. "Antibiotic activity of myxobacteria in relation to their bacteriolytic capacity". J. Bacteriol. **84**: 157-162.

**Orndorff, P.E. & Dworkin, M.** 1.980. "Separation and properties of the cytoplasmatic and outer membranes of vegetative cells of *Myxococcus xanthus*". J. Bacteriol. **141**: 914-927.

**Oxford, A.E.** 1.947. "Observations concerning the growth and metabolic activities of myxococci in a simple protein-free liquid medium". J. Bacteriol. **53**: 129-138.

**Oxford, A.E. & Singh, B.N.** 1.946. "Factors contributing to bacteriolytic effect of species of *Myxococcus* upon viable eubacteria". Nature **158**: 645-647.

**Passador, L. & McCurdy, H.D.** 1.985. "Cyclic nucleotides and development of *Myxococcus xanthus*: analysis of mutants". Curr. Microbiol. 12: 289-297.

**Pérez-López, J.A.; Rodriguez, C. & Montoya, E.** 1.978. "Repression of proteolytic enzymatic system in *Myxococcus xanthus*". Microbios Letters **6**: 27-31.

**Pestka, S. & Brot, N.** 1.971. "Studies on the formation of tranfer ribonucleic acid-ribosome complexes. IV. Effect of antibiotics on steps of bacterial protein synthesis: some new ribosomal inhibitors of translocation". J. Biol. Chem. **246**: 7.715-7.722.

**Peterson. E.A.; Gillespie, D.C. & Cook, F.D.** 1.966. "A wide spectrum antibiotic produced by a specie of *Sorangium*". Can. J. Microbiol. **12**: 221-230.

**Qualls, G.T. & White, D.** 1.982. "Development cell cohesion in *Stigmatella aurantiaca*". Arch. Microbiol. **131**: 334-337.

**Qualls, G.T.; Stephens, K. & White, D.** 1.978. "Light-stimulated morphogenesis in the fruiting myxobacterium *Stigmatella aurantiaca*". Science **201**: 444-445.

**Reichenbach, H.** 1.965. "Rhytmische Vorgânge bei der Schwarmentfaltung von Myxobacterien". Berichte der deutschen Botanischen Gesellschaft **78**: 102-105.

**Reichenbach, H.** 1.966. "*Myxococcus* spp. (Myxobacterales). Schwarmentwicklung und Bildung von Protocysten". Publikationen zu wissenschaftlichen Filmen. Göttingen 1A: 557-578.

**Reichenbach, H.** 1.981. "Taxonomy of the gliding bacteria". **Annu. Rev.** Microbiol. 57: 339-364.

**Reichenbach, H.** 1.986. "The myxobacteria: common organisms with uncommon behaviour". Microbiol. Scien. **3**: 268-274.

**Reichenbach, H. & Dworkin, M.** 1.981. "The order Myxobacterales". En "The Prokaryotes· A Handbook on habitats, isolation and identification of bacteria". M.P. Starr; H. Stolp; H.G. Truper; A Balows & H.G. Schlegel eds. Springer-Verlag, Berlin. pp. 328-355.

**Ringel, S.M.: Greenough, R.C.; Roener, S.; Connor, D. & von Strandtmann, M.** 1.977. "Ambruticin, a new antifungal antibiotic". J. Antibiot. (Tokio) **30**: 371-375.

**Rodriguez, C. & Montoya, E.** 1.980. "Enzimas proteoliticos y bacteriolíticos producidos por *Myxococcus xanthus*". Anales de Edafología y Agrobiología **39**: 169-176.

**Rodriguez, C.; Arias, J.M. & Montoya, E.** 1.979. "Demonstration of cell surface enzymes with esterase activity in *Myxococcus xanthus*". Microbios Letters **8**: 129-132.

**Rosenberg, E. & Varon, M.** 1.984. "Antibiotics and lytic enzymes". En "Myxobacteria: development and cell interactions" E. Rosenberg ed. Springer-Verlag. New York. pp. 109-125.

**Rosenber, E.; Vaks, B. & Zuckerberg, A.** 1.973a. "Bactericidal action of an antibiotic produced by *Myxococcus xanthus*". Antimicrob. Agents Chemother. **4**: 507-513.

**Rosenberg, E.; Filer, D.; Zafriti, D. & Kindler, S.H.** 1.973b. "Aspartokinase activity and the development cycle of *Myxococcus xanthus*". J. Bacteriol. **115**: 29-34.

**Rosenberg, E.; Keller, K.H. & Dworkin, M.** 1.977. "Cell density-dependent growth of *Myxococcus xanthus* on casein". J. Bacteriol. **129**: 770-777.

**Rosenberg, E.; Fytlovitch, S.; Carmeli, S. & Kashman, Y.** 1.982. "Chemical properties of *Myxococcus xanthus* antibiotic TA". J. Antibiot. (Tokio) **35**: 788-793.

**Rosenfelder, G.; Luderitz, O. & Westphal, O.** 1.974. "Composition of lipopolysaccharides from *Myxococcus fulvus* and other fruiting and non-fruiting myxobacteria". Eur. J. Biochem. **44**: 411-420.

**Rudd, K. & Zusman, D.R.** 1.979. "Rifampin resistant mutants of *Myxococcus xanthus* defective in development". J. Bacteriol. **137**: 295-300.

**Ruiz-Rodriguez, C.** 1.980. "Enzimas lipásicos de *Myxococcus xanthus* MD4". Memoria de Licenciatura. Facultad de Farmacia. Universidad de Granada.

**Sakakibara, H.; Naganawa, H.; Ohno, M.; Maeda, K. & Umezawa, H.** 1.974. "The structure of althiomycin". J. Antibiot. (Tokio) **27**: 897-899.

**Schlingmann, M.; Faust, U. & Präve, P.** 1.982. "Aufarbeitung und Isolierung funktioneller Bioprotein". En "Mikrobiellem Proteingewinnung und Biotechnologie". Symposium 1.980. Prave, P.; Schügerl, K. & Zucker, H. eds. Verlag Chemie, Weinheim Deerfield Beach: 117-124.

**Schmid-Lorenz, W. & Kühlwein, H.** 1.968. "Intracelluläre Bewegungsorganellen der Myxobacterien". Arch. Mikrobiol. **60**: 95-98.

**Schröder, J. & Reichenbach, H.** 1.970. "The fatty acid composition of vegetative cells and myxospores of *Stigmatella aurantiaca* (Myxobacterales)". Arch. Mikrobiol. **71**: 384-390.

**Shimkets, L.J.** 1.984. "Nutrition, Metabolism, and initiation of development". En "Myxobacteria: development and cell interactions". E. Rosenberg ed. Springer-Verlag. New York. pp. 91-107.

**Shimkets, L.J.** 1.986a. "Correlation of energy-dependent cell cohesion with social motility in *Myxococcus xanthus*". J. Bacteriol. **166**: 837-841.

**Shimkets, L.J.** 1.986b. "Role of cell cohesion in *Myxococcus xanthus* fruiting body formation". J. Bacteriol. **166**: 842-846.

**Shimkets, L.J.** 1.987. "Control of morphogenesis in myxobacteria". CRC Critical Rev. Microbiol. **14**: 195-227.

**Shimkets, L.J. & Dworkin, M.** 1.981. "Excreted adenosine is a cell density signal for the initiation of fruiting body formation in *Myxococcus xanthus*". Dev. Biol. **84**: 51-60.

**Shimkets, L.J. & Kaiser, D.** 1.982a. "Murein components rescue developmental sporulation of *Myxococcus xanthus*". J. Bacteriol. **152**: 462-470.

**Shimkets, L.J. & Kaiser, D.** 1.982b. "Induction of coordinate cell movement in *Myxococcus xanthus*". J. Bacteriol. **152**: 451-462.

**Singh, B.N.** 1.947. "Myxobacteria in soil and composts: their distribution, number and lytic action on bacteria". J. Gen. Microbiol. **1**: 1-10.

**Solntseva, L.I.** 1.940. "La biologia de las mixobacterias. I. Mixococos". Mikrobiologiya **9**: 217-231.

**Solntseva, L.I.** 1.941. "La biologia de las mixobacterias. II. Géneros *Mellitangium* and *Chondromyces*". Mikrobiologiya **10**: 505-512.

**Soriano, S.** 1.947. "The flexibacterales and their systematic position". Antonie van Leeuwenhoek **12**: 215-222.

**Soriano, S.** 1.973. "Flexibacteria". Ann. Rev. Microbiol. **27**: 155-170.

**Sørhaug, T.** 1.974. "Glycerol ester hydrolase, lipase of *Myxococcus xanthus* Fb". Can. J. Microbiol. **20**: 611-615.

**Stanier, R.Y.** 1.942. "The Cytophaga group: a contribution to the biology of myxobacteria". Bact. Rev. **6**: 143-165.

**Stanier, R.Y.** 1.957. "Order VIII. *Myxobacterales*". En "Bergey's Manual of Determinative Bacteriology" (7th edition) R.S. Breed; E.G.D. Murray & A.R. Smith eds. The Williams and Wilkins Co. Baltimore. pp. 854-891.

**Stephens, K. & White, D.** 1.980. "Morphogenetic effects of light and guanine derivatives on the fruiting myxobacterium *Stigmatella aurantiaca*". J. Bacteriol. **144**: 322-326.

**Stephens, K.; Hegeman, G.D. & White, D.** 1.932. "Pheromone produced by the myxobacterium *Stigmatella aurantiaca*". J. Bacteriol. **149**: 739-747.

**Sudo, S.Z. & Dworkin, M.** 1.972. "Bacteriolytic enzymes produced by *Myxococcus xanthus*". J. Bacteriol. **110**: 236-245.

**Sutherland, D.W. & Smith, M.L.** 1.973. "The lipopolysaccharides of fruiting and non-fruiting myxobacteria". J. Gen. Microbiol. **74**: 259-266.

**Sutherland, D.W. & Thomson, S.** 1.975. "Comparison of polysaccharides produced by *Myxococcus* strains". J. Gen. Microbiol. **89**: 124-132.

**Takayama, S.; Yamanaka S.; Miyashiro, S.; Yokokawa, Y. & Shibai, H.** 1.988. "Novel macrocyclic antibiotics: Megovalicins A, B, C, D, G and H. II. Isolation and chemical structure of megovalicins". J. Antibiot. **41**: 439-445.

**Thaxter, R.** 1.892. "On the Myxobacteraceae, a new order of Schizomycetes". Botan. Gazette **17**: 389-406.

**Thierbach, G. & Michaelis, G.** 1.982. "Mitochondrial and nuclear myxothiazol resistance in *Saccharomyces cerevisiae*". Mol. Gen. Genet. **186**: 501-506.

**Thierbach, G. & Reichenbach, H.** 1.981a. "Myxothiazol, a new antibiotic interfering with respiration". Antimicrob. Agents Chemother. **19**: 504-507.

**Thierbach, G. & Reichenbach, H.** 1.981b. "Myxothiazol, a new inhibitor of the cytocrome b-c$_1$ segment of respiratory chain". Biochem. Biophys. Acta **638**: 282-289.

**Thierbach, G. & Reichenbach, H.** 1.983. "The effect of the new antibiotic myxothiazol on the respiration of *Paracoccus denitrificans*". Arch. Microbiol. **134**: 104-107.

**Tipper, D.J.; Strominger, J.L. & Ensign, J.C.** 1.967. "Structure of the cell wall of *S. aureus*, strain Copenhagen. VII. Mode of action of the bacteriolytic peptidase from Myxobacter and the isolation of intact cell wall polysaccharides". Biochemistry **6**: 906-920.

**Trowitzsch, W.; Reifenstahl, G.; Wray, V. & Gerth, K.** 1.930. "Myxothiazol, an antibiotic from *Myxococcus fulvus* (Myxobacterales). II. Structure elucidation". J. Antibiot. (Tokio) **33**: 1.480-1.490.

**Trowitzsch, W.; Wray, V.; Gerth, K. & Höfle, G.** 1.982. "Structure of myxovirescin A, a new macrocyclic antibiotic from gliding bacteria". J. Chem. Soc. Chem. Commun. 1.340-1.342.

**Tsai, C.S.; Whitaker, D.R.; Jurasek, K.L. & Gillespie, D.C.** 1.965. "Lytic enzymes of *Sorangium* sp. Action of the α and β-lytic proteases on two bacterial mucopeptides". Can. J. Biochem. **43**: 1.971-1.983.

**Umbarger, H.E.** 1.968. "Amino acid biosynthesis and its regulation". Ann. Rev. Biochem. **47**: 533-606.

**Vaks, B.; Zuckerberg, A. & Rosenberg, E.** 1.974. "Purification and partial characterization of an antibiotic produced by *Myxococcus xanthus*". Can. J. Microbiol. **20**: 155-161.

**Varon,M.; Cohen, S. & Rosenberg, E.** 1.984. "Autocides produced by *Myxococcus xanthus*". J. Bacteriol. **160**: 1.146-1.150.

**Varon, M.; Tietz, Z. & Rosenberg, E.** 1.986. "*Myxococus xanthus* autocide AM I". J. Bacteriol. **167**: 356-361.

**Voelz, H.G. & Dworkin, M.** 1.962. "Fine structure of *Myxococcus xanthus* during morphogenesis". J. Bacteriol. **84**: 943-952.

**Voelz, M.; Voelz, V. & Ortigoza, R.O.** 1.966. "The polyphosphate overplus phenomenon in *Myxococcus xanthus* and its influence on the architecture of the cell". Arch. Mikrobiol. **53**: 371-388.

**Ware, J.C. & Dworkin, M.** 1.973. "Fatty acids of *Myxococcus xanthus*". J. Bacteriol. 115: 253-261.

**Watson, D.F. y Dworkin, M.** 1.968. "Comparative intermediary metabolism of vegetative cells and microcysts of *Myxococcus xanthus*". J. Bacteriol. **96**: 1.456-1.473.

**Whitaker, D.R.** 1.965. "Lytic enzymes of *Sorangium* sp. Isolation and enzymatic properties of the α and β-lytic proteases". Can. J. Biochem. **43**: 1.935-1.954.

**White**, D. 1.975. "Myxospores of *Myxococcus xanthus*. En "Spores VI". P. Gerhardt, H.L. Sadoff & R.N. Costilow eds. American Society for Microbiology. Washinton D.C. pp. 44-51.

**White, D.; Dworkin, M. & Tipper, D.J.** 1.968. "Peptidoglycan of *Myxococcus xanthus*: Structure and relation to morphogenesis". J. Bacteriol. **95**: 2.186-2.197.

**Wingard, M.; Matsueda, G. & Wolfe, R.S.** 1.972. "Myxobacter AL-1 protease. II: Specific peptide bond cleavage on the amino side of lysine". J. Bacteriol. **112**: 940-949.

**Wireman, J.W.** 1.979. "Developmental induction of *Myxococcus xanthus* myxospores". J. Bacteriol. **140**: 147-153.

**Wireman, J.W. & Dworkin, M.** 1.975. "Morphogenesis and developmental interactions in myxobacteria". Science **189**: 516-522.

**Wireman, J.W. & Dworkin, M.** 1.977. "Developmentally induced autolysis during fruiting body formation by *Myxococcus xanthus*". J. Bacteriol. **129**: 796-802.

**Woods, N.A.** 1.948. "Studies on the myxobacteria". Master Thesis. Washington University. Seatle. Washington.

**Yee, T & Inouye, M.** 1.981. "Reexamination of the genome size of myxobacteria, including the use of a new method for genome size analysis". J. Bacteriol. **145**: 1.257-1.265.

**Yee, T. & Inouye, M.** 1.982. "Two-dimensional DNA electrophoresis applied to the study of DNA methylation and the analysis of genome size in *Myxococcus xanthus*". J. Mol. Biol. **154**: 181-196.

**Yee, T. & Inouye, M.** 1.984. "Genome of *Myxococcus xanthus*". En "Myxobacteria. Development and cell interactions". E. Rosenberg ed. Springer-Verlag. New York. pp. 69-90.

**Zafriri, D.; Rosenberg, E. & Mirelman, D.** 1.981. "Mode of action of *Myxococcus xanthus* antibiotic TA". Antimicrob. Agents Chemother. **19**: 349-351.

**Zusman, D.R.** 1.984. "Developmental program of *Myxococcus xanthus*". En "Myxobacteria. Development and cell interactions". E. Rosenberg ed. Springer-Verlag. New York. pp. 185-213.